



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**“PRODUCCIÓN DE QUITINA DESACETILASA FÚNGICAS Y SU  
APLICACIÓN EN LA DESACETILACIÓN DE BIOPOLÍMEROS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**M. en B. Angélica Patricia Ramos Puebla**

**Directora de tesis: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto**

**ASESORES:**

**Dra. Claudia Patricia Larralde Corona**  
Centro de Biotecnología Genómica Instituto Politécnico Nacional. Tamaulipas, México.

**Dr. Laurent David**  
Université Claude Bernard Lyon 1. Lyon, Francia

**México D.F., a 6 de Junio del 2016**

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y en la Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamientos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT No. 237292) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Secretaría de Economía (FINNOVA/CONACYT No. 224962).

Los productos de reacción obtenidos de la desacetilación de biopolímeros fueron caracterizados en la Université Claude Bernard Lyon 1(Lyon, Francia) bajo la asesoría del Prof. Dr. Laurent David, gracias a la beca mixta otorgada por CONACYT a Angélica Patricia Ramos Puebla para realizar una estancia en dicha institución.

Iztapalapa, D.F. a 6 de Junio del 2016.

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa

aprobó la tesis

**“PRODUCCIÓN DE QUITINA DESACETILASA FÚNGICAS Y SU APLICACIÓN  
EN LA DESACETILACIÓN DE BIOPOLÍMEROS”**

que presentó

M.B. Angelica Patricia Ramos Puebla

**Comité Tutorial:**

Directora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesora: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona  
Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa Tamaulipas

Asesor: Dr. Laurent David  
Université Claude Bernard Lyon 1(Lyon, Francia)

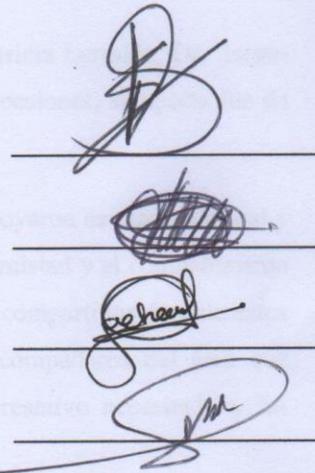
**Jurado:**

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Vocal: Dra. Neith Aracely Pacheco López

Vocal: Dr. Gabriel Viguera Ramírez



## AGRADECIMIENTOS

A DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa, llenarme de salud y rodearme siempre de personas excepcionales.

No tengo palabras para agradecer TODO el apoyo recibido, las enseñanzas y las experiencias que me dejó el trabajar en el laboratorio de biopolímeros. Doy mi más sincero agradecimiento a quien en un momento de flaqueza me tendió la mano, el apoyo incondicional y la confianza de un proyecto a pesar de las circunstancias en las que nos conocimos. Gracias por alentarme en los momentos difíciles y en los cuales uno pierde la confianza en sí mismo, por motivarme a seguir adelante y a superarme día a día. Por ser un ejemplo de un camino a seguir. Muchas gracias Dra. Keiko.

A mis asesores, la Dra. Patricia Larralde y al Profesor Laurent, quienes aportaron sus conocimientos y dedicación a este proyecto, particularmente agradezco el apoyo del Profesor Laurent y Stéphane por haberme recibido en su laboratorio y por el apoyo que recibí en todos los aspectos, por la paciencia, consejos y los aportes a este trabajo durante mi estancia.

A mis padres y hermanos quienes me han apoyado en cada paso de mi vida, en especial a mi madre quien siempre ha estado al lado del camino que he decidido recorrer, en las experiencias buenas y las no tan buenas.

A mi jurado y revisores de tesis la Dra. Neith Pacheco, Dra. Patricia Larralde, Dr. Sergio Huerta, Dr. Gabriel Viguera, gracias por los comentarios y correcciones, su aporte fue de gran ayuda para la presentación idónea del trabajo.

A mis compañeros del laboratorio quienes más de una vez me apoyaron de manera moral y laboral, por hacer del laboratorio un ambiente agradable, por la amistad y el compañerismo brindado, por todos los momentos dentro y fuera del laboratorio compartidos durante estos dos años de convivencia. No por menos importantes, a mis compañeros del área que siempre pudieron darme un consejo o proporcionarme algún reactivo necesitado y las

experiencias dentro y fuera de la UAM: Adriana, Ulises, Carmen, Wylma, Eduardo, Facundo, Lizeth, Jess, Raúl, Marisol y Omar.

Quiero especialmente darle las gracias por la amistad brindada, el apoyo moral y laboral que siempre tuve de mis compañeros Jesús y Mariana, quienes más de una vez me acompañaron en la travesía a la UNAM, por las desveladas juntos y los momentos compartidos, los quiero chicos.

Al Dr. Miquel por permitirnos trabajar por momentos en su espacio de trabajo y proporcionarme las facilidades para el uso de equipos y reactivos, de igual manera a los compañeros quienes en más de una ocasión se dieron un tiempo para enseñarme el uso de equipos.

También le doy gracias a CONACyT por el apoyo que me otorgo mientras estuve dentro de mi posgrado, porque sé que sin su ayuda este trabajo no podría haberse realizado.

No puedo terminar sin antes decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen creer y valorar a las personas que nos rodean  
MIL GRACIAS.

*“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”*

*(Albert Einstein)*

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
PRODUCCIÓN DE CDA FÚNGICAS Y SU APLICACIÓN EN LA DESACETILACIÓN DE BIOPOLÍMEROS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA TESIS	2
ANTECEDENTES	4
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	5
Quitina desacetilasa (CDA)	6
Formación de pared celular	7
Síntesis de la pared del quitosano	7
Mecanismo de ataque-defensa	8
Producción y purificación de CDA	9
Efecto de inductores	11
Sistemas de producción enzimática	13
Sistema de operación en continuo	13
Sistema de operación por lote	14
Sistema de operación por lote alimentado	15
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
CAPÍTULO 1. Efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la	18

producción CDA en un cultivo sumergido	
1.1 INTRODUCCIÓN	19
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	20
1.2.1 Microorganismo	20
1.2.2 Propagación de <i>C. gloeosporioides</i> y obtención de esporas	20
1.2.3 Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de CDA	20
1.2.4 Efecto de la fuente de carbono en la producción de CDA	21
1.2.5 Determinación de actividad CDA	22
1.2.6 Determinación de proteína total	22
1.2.7 Análisis estadístico	23
1.3 RESULTADOS	23
1.3.1 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de CDA	23
1.3.2 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de CDA	26
1.4 CONCLUSIÓN	29
CAPÍTULO 2: LA ADICIÓN DE ÁCIDO ABSCÍSICO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE CDA DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EN CULTIVO SUMERGIDO	30
2.1 INTRODUCCIÓN	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.2.1 Microorganismo	32
2.2.2 Condiciones del cultivo sumergido sumergido	32
2.2.3 Determinación del efecto de amino azúcares y fitohormonas sobre la actividad CDA de <i>C. gloeosporioides</i>	33
2.2.4 Producción de CDA de <i>C. gloeosporioides</i> con ABA añadido en biorreactor por lote y lote alimentado	33
2.2.5 Determinación de pH, producción de biomasa, actividad CDA, azúcares totales y contenido de proteína	34
2.2.6 Esporas germinadas	34

2.2.7 Análisis SEM	35
2.2.8 Extracción de quitina de la pared del hongo y determinación de su fracción acetilada ( $F_A$ )	35
2.2.9 Análisis estadístico	36
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
2.3.1 Selección de fitohormonas y amino azúcares sobre la producción de CDA	36
2.3.2 Cultivos discontinuos y de alimentación por lotes para la producción de CDA	37
2.3.3 Producción de actividad CDA en lotes alimentados	43
2.3.4 Purificación de quitina de las paredes celulares del hongo en cultivo discontinuo alimentado con ABA añadido	45
2.4 CONCLUSIÓN	47
CAPÍTULO 3: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CDA EXTRACELULAR DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	48
3.1 INTRODUCCIÓN	49
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.2.1 Microorganismo y condiciones de producción enzimática	51
3.2.2 Determinación de la actividad enzimática	51
3.2.3 Determinación de proteína	52
3.2.4 Purificación de la enzima CDA	52
3.2.5 Determinación del peso molecular y detección de la actividad CDA	53
3.2.6 Caracterización de la enzima CDA	53
3.2.6.1 Efecto del pH	54
3.2.6.2 Efecto de la temperatura	54
3.2.6.3 Tiempo de reacción	54
3.2.6.4 Determinación de la concentración óptima de sustrato	54
3.2.7 Actividad desacetilasa sobre diferentes sustratos	55

3.2.8 Determinación del peso molecular	56
3.2.9 Análisis estadístico	56
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.3.1 Purificación y estimación del peso molecular de la CDA	57
3.3.2 Caracterización de la actividad CDA	60
3.3.2.1 Efecto del pH	60
3.3.2.2 Efecto de la temperatura	61
3.3.2.3 Efecto de la concentración del sustrato	62
3.3.3 Actividad CDA sobre diferentes sustratos	63
3.4 CONCLUSIÓN	68
CONCLUSIÓN GENERAL	69
PERSPECTIVAS	70
TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS	71
PUBLICACIONES EN REVISTAS INDIZADAS	71
CONGRESOS INTERNACIONALES	71
CONGRESOS NACIONALES	71
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	73
ANEXOS	81
1. Determinación de CDA	81
2. Determinación de proteína	83
3. Actividad CDA a pH constante de 3.5 y 7	85
4. Espectros de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ RMN) de los diferentes sustratos empleados	86
5. Espectros de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ RMN) a diferentes tiempos de reacción, utilizando quitosano reacetilado con DA=69 % como sustrato	90

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
1.Fuentes de nitrógeno controles	91
2.Fuentes de nitrógeno con hoja de limón	93
3.Fuentes de nitrógeno con hoja de limón por tiempos	95
4.Fuentes de carbono controles	97
5.Inductores	99
6.Medio GAM y GAM con ABA	101
7.Lotes alimentados	103
8.Reacciones con quitosano con DA=69 % a los diferentes tiempos de reacción	105
9.Reacción con quitosano con DA=57 % a los 30 min de reacción	107
10.Reacción con HA a los 30 min	109
11.Reacción con quitina tratada con expansión rápida con freón y fibrilado a los 300 min de reacción	112

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reacción de desacetilación de la quitina por acción de la enzima CDA 6
- Figura 1.1. Cinética de producción de CDA de *C. gloeosporioides* con las diferentes fuentes de nitrógeno en cultivo sumergido. a) Controles y b) Adición del inductor hoja de limón. Donde para ambas gráficas SAC+AG (círculo sólido), SAC+Urea (círculo vacío), SAC+NaNO<sub>3</sub> (triángulo sólido), (SAC+NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (triángulo vacío) 26
- Figura 1.2. Cinética de producción de CDA de *C. gloeosporioides* con las diferentes fuentes de carbono en cultivo sumergido. a) Controles y b) Adición del inductor hoja de limón. Donde para ambas gráficas SAC+AG (círculo sólido), SAC+Urea (círculo vacío), GLC+AG (triángulo sólido), GLC+Urea (triángulo vacío) 29
- Figura 2.1. Cinética de actividad CDA en SmC de *C. gloeosporioides* con fitohormonas (23 mg L<sup>-1</sup>): GA (triángulo sólido), ABA (cuadrado sólido), IAA (triángulo vacío) y amino azúcares: NacGlc (0.36g L<sup>-1</sup>) (círculo sólido) y Glc (0.77 g L<sup>-1</sup>) (círculo vacío). Puntos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (p<0.05) 38
- Figura 2.2. Cinética de producción de biomasa (cuadrado vacío), azúcares totales (triángulo sólido), actividad CDA (círculo sólido) y pH (equis) de *C. gloeosporioides* en SmC: a) Control y b) Medio suplementado con ABA 41
- Figura 2.3. Porcentajes de esporas germinadas de *C. gloeosporioides* en GAM 42

(círculo sólido) y GAM con ABA añadido (círculo vacío). Las esporas germinadas fueron determinadas hasta las 24 h después de la inoculación. Cada punto representa la media de tres experimentos con 200 observaciones por experimento. CDA en GAM (cuadrado sólido) y GAM con ABA añadido (cuadrado vacío)

Figura 2.4. Micrografías electrónicas de barrido de las esporas de *C. gloeosporioides* en GAM (izquierda) y GAM con ABA añadido (derecha) para 1,4,9,12,16 y 24 h. C,CS,PC,G y GL significan conidios, conidios septados, conidios polarizados, tubos germinales y esporofitos, respectivamente. 43

Figura 2.5. Cinética de producción de biomasa y azúcares totales (a) y actividad CDA (b) de *C. gloeosporioides* en SmC GAM con ABA añadido en lotes alimentados (círculos); GAM con ABA añadido en lotes alimentados con inóculo añadido ( $1 \times 10^7$  esporas  $\text{g nutriente}^{-1}$ ) (triángulos) símbolos sólidos son para azúcares y CDA, círculos vacíos para biomasa. Las flechas muestran cuando la alimentación comenzó. Puntos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ). 45

Figura 2.6. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de quitina purificada de la pared celular de *C. gloeosporioides* en GAM (a) y SmC por lote alimentado con inóculo y medio fresco suplementado con ABA (b), disueltas en DCI concentrado a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . La resonancia del protón H-1 del glucofuranosil oxazoliniumion está denotada con un asterisco. 47

Figura 3.1. Purificación de la CDA. A) Purificación de la enzima CDA en la columna HiLoad<sup>TM</sup> 16/600, Superdex<sup>TM</sup> 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA). La muestra que contiene la CDA (5 mL, 25 mg de proteína) eluida a un flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$  aparece en el tiempo de retención 115-125 min, el contenido de proteína se determinó por UV a 280 nm. B) Purificación de la 59

enzima CDA en DEAE Sepharosa (Bio-Rad). La muestra que contiene la CDA (0.5 mL), eluida a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  aparece en tiempo de retención 10-12 min, el contenido de proteína se determinó por UV a 280 nm.

Figura 3.2. Determinación de peso molecular (SDS-PAGE) y de actividad sobre etilenglicol quitina (Zimograma). A) SDS - PAGE de la enzima en los diferentes pasos de purificación, M: Marcador (Bio-Rad), EC: extracto crudo, PM: Separación de la muestra por peso molecular en la columna HiLoad™ 16/600, Superdex™ 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA), IA: separación de la muestra por intercambio aniónico en la columna Biorad (EUA); B) Zimograma de la enzima en los diferentes pasos de purificación, EC: extracto crudo, PM: separación de la muestra por peso molecular en la columna HiLoad™ 16/600, Superdex™ 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA), IA: separación de la muestra por intercambio aniónico en la columna Biorad (EUA) 60

Figura 3.3. Efecto del pH en la actividad CDA utilizando diferentes sustratos. Determinación de pH óptimo empelando como sustrato etilenglicol quitina a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (EGC, círculo sólido). Determinación de pH óptimo empelando como sustrato quitosano reacetilado con un DA=69 % a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (QDA69%, círculo vacío) 62

Figura 3.4. Efecto de la temperatura en la actividad CDA utilizando diferentes sustratos. Determinación de temperatura óptima empelando como sustrato etilenglicol quitina a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (EGC, círculo sólido). Determinación de temperatura óptima empelando como sustrato quitosano reacetilado con un DA=69 % a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (QDA69%, círculo vacío). 63

Figura 3.5. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad CDA utilizando diferentes sustratos. Determinación de la concentración óptima de 64

sustrato empelando etilenglicol quitina (EGC, círculo sólido). Determinación de la concentración óptima de sustrato quitosano reacetilado con un DA=69 % (QDA69%, círculo vacío).

Figura 3.6. Actividad de desacetilación determinado sobre el quitosano reacetilado con un DA=69 % a diferentes tiempos de reacción, ajustado al modelo de Gompertz. pH de la reacción (círculo sólido). Grado de desacetilación del producto de reacción obtenido (círculo vacío). Peso molecular del producto de reacción obtenido (triángulo sólido).

68

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Métodos generales de purificación de quitinas desacetilasas	10
Tabla 1.1 Composición del medio de cultivo empleado para la producción de CDA de <i>C. gloeosporioides</i>	21
Tabla 3.1 Purificación de la CDA de <i>C. gloeosporioides</i>	58
Tabla 3.2 Caracterización de los productos de reacción: %DA y peso molecular	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
ABA	Ácido abscísico
SAC	Sacarosa
GLC	Glucosa
GAM	Medio glucosa-ácido glutámico
HL	Hoja de limón
C/N	Relación carbono-nitrógeno
CDA	Quitina desacetilasa
$F_A$	Fracciones acetiladas
DA	Grado de acetilación
DDA	Grado de desacetilación
H RMN	Resonancia magnética nuclear
QDA69%	Quitosano reacetilado con 69 % de acetilación
QDA57%	Quitosano reacetilado con 57 % de acetilación
HA	Ácido hialurónico
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
NaNO <sub>3</sub>	Nitrito de sodio
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio
AG	Ácido glutámico
SmC	Cultivo sumergido
IAA	Ácido indol acético
NacGlc	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
Glc	Glucosamina
EGC	Etilenglicol quitina
SEM	Microscopia electrónica de barrido
DCI	Ácido clorhídrico deuterado
TMPS	Ácido 3- (trimetilsilil) propiónico
$V_{max}$	Velocidad máxima
$P_{max}$	Producto máximo de desacetilación

## RESUMEN

*Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo fitopatógeno causante de la antracnosis de frutos en climas tropicales y subtropicales, mucho se ha estudiado sobre la patogénesis de este hongo con el fin de disminuir la infección hacia los cultivos, son pocos los reportes que actualmente existen sobre su producción de enzimas quitina desacetilasa (CDA). Estas enzimas son requeridas para su actividad patogénica y para el desarrollo del mismo. En virtud de lo anterior, en esta tesis de doctorado se estudiaron diversos factores que afectan la producción de dichas proteínas, como lo son, la fuente de carbono y nitrógeno, inductores, el pH y el sistema de producción enzimática empleado. También se determinó la actividad de las quitinas desacetilasas después de ser purificadas sobre diferentes sustratos, tales como quitosano reacetilados con un DA del 57 y 69 %, una quitina modificada químicamente, N-acetil glucosamina y ácido hialurónico.

El tipo de la fuente de nitrógeno y de carbono influyeron significativamente sobre la producción de CDA, mostrando mayores actividades cuando se utilizó glucosa y ácido glutámico, de la misma manera el uso del ácido abscísico como inductor de la actividad favoreció la producción de estas enzimas obteniendo 9.5 veces ( $1.05 \text{ U mg proteína}^{-1}$ ) más con respecto al control ( $0.11 \text{ U mg proteína}^{-1}$ ), posteriormente se observó que el pH del medio de cultivo afectó de manera significativa la producción de la enzima mostrando mayores actividades a pH ácido que a pH neutro. Es importante resaltar que estas altas producciones de enzima se vieron acompañadas de una reducción de la fase lag durante el desarrollo del hongo, observándose que el proceso de germinación y la elongación de las hifas de *C. gloeosporioides* se presentó a menores tiempos en comparación del control (12 h). La modificación al sistema de producción enzimática, pasando de un sistema cerrado a un sistema por lote alimentado incrementó la producción de la CDA. El aumento en la producción de estas enzimas modificó la composición de las paredes celulares de los hongos como fue evidente después de extraer quitina y analizar las fracciones acetiladas ( $F_A$ ). Las quitinas desacetilasas producidas por *C. gloeosporioides* fueron capaces de desacetilar la quitina cuando se añadió ácido abscísico al medio de cultivo ( $F_A=0.79$ ) mientras que el control mantuvo una alta  $F_A$  de 0.90.

Por otra parte la purificación de la enzima se llevó a cabo precipitando con sulfato de amonio a un 80 % de saturación, cromatografía de exclusión molecular y por intercambio aniónico, obteniendo una actividad específica de  $2.9 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  (8.5 veces más que lo obtenido en el extracto crudo). La enzima purificada presentó un peso molecular aparente de 50 kDa, detectándose actividad sobre etilenglicol quitina en el zimograma realizado. La temperatura óptima fue de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y el pH óptimo fue de 3, cuando la etilenglicol quitina y un quitosano reacetilado con DA=69 % fueron utilizados como sustratos, presentando una concentración óptima para cada sustrato de  $12.5$  y  $15 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente. La CDA presentó actividad significativa sobre quitosanos reacetilados y sobre una quitina tratada previamente con la técnica despresurización rápida con freón en estado supercrítico y fibrilación, los productos obtenidos de la reacción fueron analizados por resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H RMN}$ ) y por cromatografía de exclusión molecular. Los resultados indican que la actividad de la enzima tuvo un efecto importante sobre el grado de acetilación (DA) en los productos de reacción, disminuyendo en un 36.5 % el grado de acetilación del quitosano reacetilado al 69 % y un 17 % sobre la quitina, mientras que los pesos moleculares de las muestras disminuyeron de manera no significativa.

**ABSTRACT**

*Colletotrichum gloeosporioides* is a phytopathogenic fungus that causes anthracnose in fruit of tropical and subtropical climates; the pathogenesis of this fungus has been extensively studied in order to decrease infection to crops, however there are scarce reports on the production of chitin deacetylase enzymes. These enzymes play an important role in phytopathogenic process. Therefore, in this dissertation various factors affecting the production of these proteins were studied, such as the source of carbon and nitrogen, inducers, pH and the submerged culture system. The hydrolytic activity of chitin deacetylase after purification on different substrates such as reacylated chitosan with a DA of 57 and 69 %, chitin, ethylene glycol chitin, N-acetyl glucosamine and hyaluronic acid was determined

The nitrogen and carbon source significantly affected the production of chitin deacetylase, showing the highest activity when glutamic acid and glucose were employed as nitrogen and carbon source respectively. As well, a beneficial effect was observed with addition of abscisic acid as an inducer of activity, which favored the production of these enzymes increasing up to 9.5-fold more activity ( $1.05 \text{ U mg protein}^{-1}$ ) than the control ( $0.11 \text{ U mg protein}^{-1}$ ). In addition, the pH of the culture medium displayed significantly effect on the production of the enzyme showing higher activity at acidic pH than neutral pH. Importantly, these high yields of enzyme were accompanied by a reduction of lag phase during development of the fungus, noting that the process of germination and hyphal elongation of *C. gloeosporioides* showed shorter time compared than control. The change of enzyme production culture, from a closed to a fed-batch system, significantly increased the production of chitin deacetylase. The increase in production of chitin deacetylases might have changed the chitin in fungal cell wall, therefore after extraction acetylation fraction was determined. NMR analyzes of these biopolymers produced from biomasses obtained in systems with enhanced production of chitin deacetylases, lower acetylated fraction of chitin was detected when abscisic acid was added to the culture medium ( $F_A=0.79$ ) than control ( $F_A=0.90$ ).

Once the production conditions were selected, purification of the enzyme was carried out by salting out (ammonium sulfate 80 % saturation), followed by size exclusion and anionic

exchange, obtaining 8.5-fold higher activity than crude extract. The purified enzyme showed an apparent molecular weight of 50 kDa, its activity was detected on zymograms with ethylene glycol chitin. The optimal temperature and pH were determined as 37 °C and 3, respectively with ethylene glycol chitin and chitosan reacylated with DA=69 % as substrates. In a range of substrate concentration, the highest activity was detected at 12.5 and 15 mg mL<sup>-1</sup> for ethylene glycol chitin and reacylated chitosan (DA=60%), respectively. Chitin deacetylase presented significant activity on reacylated chitosans and chitin (previously treated with rapid depressurization from supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane and fibrillation), the products obtained from the reaction were analyzed by nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and gel permeation chromatography. The results indicated that the enzyme activity had a significant effect on the degree of acetylation of the reaction products, reducing 36.5 % degree of acetylation of reacylated chitosan at 69 % and 17 % of chitin, while the decreases of molecular weight of the samples were not significantly different.

“PRODUCCIÓN DE QUITINA  
DESACETILASA FÚNGICAS Y SU  
APLICACIÓN EN LA  
DESACETILACIÓN DE  
BIOPOLÍMEROS”

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Con la finalidad de cumplir con el objetivo principal que fue evaluar la producción y actividad de la CDA de *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido, modificando las fuentes de nitrógeno y carbono, además de la adición de inductores al medio y modificando el sistema de producción enzimática, para posteriormente purificar, caracterizar y evaluar la actividad de la enzima en la desacetilación de biopolímeros, los resultados de la tesis se presentan en el siguiente orden:

Inicialmente se presentarán algunos fundamentos básicos, para entender el desarrollo de los siguientes capítulos, además se presentará la justificación, la hipótesis y los objetivos del trabajo.

En el primer capítulo se analizó el efecto la fuente de nitrógeno, la fuente de carbono y la hoja de limón (adicionada como inductor al sistema de producción enzimática) sobre la producción y actividad de CDA de *C. gloeosporioides*. Se determinó la actividad CDA sobre etilenglicol quitina como respuesta a la producción de CDA de *C. gloeosporioides* en cultivos sumergidos, evaluando el efecto de la fuente de nitrógeno, utilizando urea, ácido glutámico, nitrato de sodio o sulfato de amonio. Asimismo se evaluó el efecto de la fuente de carbono sobre la actividad desacetilasa utilizando sacarosa o glucosa y el efecto que tiene la hoja de limón sobre la CDA producida por *C. gloeosporioides*

En el segundo capítulo se analizó el efecto de inductores, el efecto del pH, el sistema de producción enzimática empleado sobre la actividad CDA, además de la extracción de quitina de las paredes de *C. gloeosporioides* y la determinación de sus fracciones acetiladas. La determinación de la actividad sobre etilenglicol quitina como respuesta a la producción de CDA en cultivos sumergidos, evaluando en sistemas cerrados el efecto de inductores, fue realizada por De Santiago (2011), utilizando ácido abscísico, ácido indol acético, hoja de limón, *N*-acetil-*D*-glucosamina, glucosamina o ácido giberélico. Así mismo, se evaluó el efecto del pH sobre la producción de CDA manteniendo el pH constante a 3.5 ó 7, además de evaluar la modificación del sistema continuo, lote alimentado con medio fresco o lote alimentado con medio fresco más inóculo, sobre la

producción de la enzima CDA. Por otra parte se estudiaron las etapas de crecimiento de *C. gloeosporioides*, para evaluar el efecto del ácido abscísico y la relación que éste presenta sobre el desarrollo del hongo, la producción de quitinas desacetilasas y la composición de la pared celular del microorganismo el cultivo sumergido.

En el tercer capítulo se llevó a cabo la producción de CDA en un sistema de lote alimentado, se realizó una purificación homogénea de la enzima extracelular producida por *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido, la cual fue caracterizada y su actividad evaluada sobre diferentes sustratos, purificando y caracterizando los productos de reacción obtenidos. La producción de la CDA se llevó a cabo por lote alimentado adicionando medio fresco más inóculo al biorreactor, la producción fue evaluada determinado la actividad sobre etilenglicol quitina. La purificación se llevó a cabo precipitando con sulfato de amonio seguida de una separación por peso molecular y de intercambio aniónico. La enzima purificada fue caracterizada en cuanto a peso molecular y se determinaron los factores óptimos de reacción: pH, temperatura, concentración enzima-sustrato, tiempo de reacción sobre etilenglicol quitina y un quitosano reacetilado con un DA al 69 % (QDA69%). Asimismo, se determinó la actividad de la CDA utilizando como sustratos quitosano reacetilado al 57 % (QDA57%), QDA69%, ácido hialurónico comercial (HA; H.T.M.) y una quitina tratada previamente con expansión rápida con freón y fibrilado (tratamiento realizado por Villa-Lerma et al, 2016), los productos se analizaron por H RMN (determinación de DA) y SEC (determinación de peso molecular).

Finalmente, se presenta una conclusión general sobre los principales resultados obtenidos de estos estudios y las perspectivas sobre la temática abordada.

# **ANTECEDENTES**

### *Colletotrichum gloeosporioides*

*Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo fitopatógeno de las plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo, ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales. La sintomatología se presenta en las hojas, pecíolos y/o tallos, inicialmente las hojas infectadas presentan puntos rojizos, las lesiones crecen en forma irregular y se unen entre sí ocasionando necrosis total en la hoja. (Pérez et al., 2003)

De manera general las etapas de desarrollo de las especies de *Colletotrichum* pueden separarse en: 1) deposición en las superficie del hospedante, 2) fijación de la conidia en la superficie, 3) germinación de la conidia, 4) producción del apresorio, 5) penetración de la epidermis de la planta, 6) crecimiento y colonización del tejido del hospedante y 7) producción de acérvulos y esporulación (Rodríguez et al., 2013).

En *Colletotrichum spp*, *Magnaporthe grisea* y *Colletotrichum graminicola* se producen túbulos germinales que tienen la función de percibir la superficie, secretar enzimas degradadoras de la pared celular vegetal y ejercer presión sobre el sustrato donde crece (Kwon et al., 1991; Vargas et al., 2012) posteriormente estos túbulos germinales se desarrollan en apresorios. Existen reportes que indican que no todos los aislamientos de *C. gloeosporioides* forman apresorio, sino que pueden penetrar directamente con ayuda del tubo germinativo. Se ha reportado la síntesis de gloeosporona, terpeno perteneciente al grupo de las lactonas, que funciona como auto-inhibidor de la germinación de conidias y de apresorios de *C. gloeosporioides* (Cascino et al., 1990; Kim et al., 1999).

El pH es un parámetro que influye de manera importante en el desarrollo de la enfermedad, ya que sus variaciones de acuerdo con la fenología del fruto sirven como una barrera y un mecanismo de defensa contra fitopatógenos. De la misma manera en que el pH puede defender a la planta o fruto, también puede ayudar al desarrollo del fitopatógeno, en la literatura se reporta que *C. gloeosporioides* esporula en pH de 4.0-5.5 (Deshmukh et al., 2012) de esta manera el fitopatógeno supera la barrera del exocarpio y las esporas germinadas melanizan el apresorio, no sólo por la reducción del pH que se tiene en el

mesocarpio si no por la alta concentración de compuestos anti fúngicos presentes en los frutos inmaduros (Prusky et al., 2001).

### QUITINA DESACETILASA (CDA)

Las CDAS (EC 3.5.1.41) son enzimas pertenecientes a la familia de las carbohidrato esterasas, que catalizan la conversión de quitina a quitosano por desacetilación de  $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina, generando unidades de glucosamina y ácido acético (Zhao et al., 2010).

Figura 1

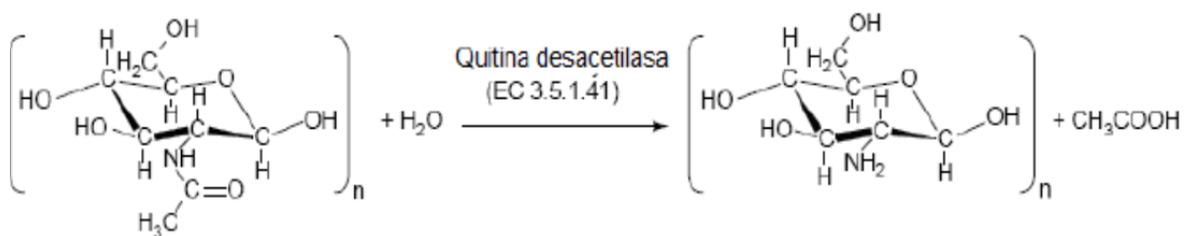


Figura 1. Reacción de desacetilación de la quitina por acción de la enzima CDA (Tsigos et al., 2000)

Las CDA son glicoproteínas que pueden encontrarse en el medio de cultivo o en el periplasma, (Araki e Ito, 1975; Gao et al., 1995), las encontradas en el medio son secretadas durante un período que corresponde a un rol biológico específico y en los hongos puede ser secretada en diferentes períodos (Zhao et al., 2010). Las más estudiadas son las producidas por algunos hongos como: *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Rhizopus nigricans*, *Metharrizium anisopliae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Colletotrichum lindemuthianum* (Araki e Ito, 1975; Christodoulidou et al., 1996; Tsigos et al., 2000; Blair et al., 2006; Jeraj et al., 2006; Chatterjee et al., 2009; Zhao et al., 2010) las cuales han sido identificadas, purificadas y caracterizadas, Pacheco et al., 2013 reporto una CDA producida por *Colletotrichum gloeosporioides*. Las CDA también han sido identificadas en bacterias del familia *Vibrionaceae* y en algunos insectos (Toprak et al., 2008; Arakane et al., 2009).

En todos los microorganismos mencionados anteriormente se ha encontrado que las CDA pueden tener un peso molecular de entre 24 - 150 kDa y presentar un pH de 4.5-12.0 según el microorganismo. (Tsigos et al., 2000; Zhao et al., 2010; Pacheco et al., 2013).

En la actualidad ha aumentado el interés en estas enzimas, debido a que es posible su aplicación para obtención de oligómeros de quitosano de diferentes tamaños, los cuales han tenido una considerable atención en la industria farmacéutica y el campo biomédico, debido a sus características favorables, tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, acción antimicrobiana y la no toxicidad en animales (Nicolella et al., 2000).

Además de esto las CDA se han relacionado a posibles funciones biológicas, dependiendo del microorganismo y de los factores ambientales en los que se desarrolle:

#### ♣ **Formación de pared celular**

En *Saccharomyces cerevisiae* se identificaron dos genes que son necesarios durante el proceso de esporulación de la levadura: la formación de la ascospora requiere la actividad coordinada de dos enzimas CDA. Christodoulidou et al., (1996) produjeron mutantes con genes dañados para estas enzimas, las cepas mutantes y las silvestres esporularon de igual manera, pero las cepas mutantes presentaron una sensibilidad a enzimas hidrolíticas  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -glucuronido sulfatasa las cuales son utilizadas para el rompimiento de la pared celular de levaduras, lo que indicó que la acción de las CDA en la formación de la pared celular en *S. cerevisiae* les confiere resistencia a condiciones de estrés.

#### ♣ **Síntesis de la pared de quitosano**

La biosíntesis de la pared celular de quitosano en *Mucor rouxii* es llevada a cabo por la acción coordinada de la quitina sintasa y la CDA: mientras que la quitina sintasa polimeriza residuos de *N*-acetil-D-glucosamina a partir del sustrato activado (uridina 5-difosfo-*N*-acetil-D-glucosamina), la CDA hidroliza el enlace *N*-acetamido de las cadenas nacientes de

quitina, actuando de manera más eficiente sobre la quitina naciente que sobre una quitina microfibrilar formada previamente (Davis y Bartnicki, 1984).

#### ♣ **Mecanismo de ataque - defensa**

Las especies de *Colletotrichum* al ser hongos fitopatógenos que durante la infección a un hospedero evaden hidrolasas producidas por la planta mediante la conversión de su quitina a quitosano por efecto de las CDA, las hacen potenciales productores de estas enzimas (Blair et al., 2006), además de considerar que estas glicoproteínas tienen un papel muy importante en el ataque y defensa de sistemas biológicos (Zhao et al., 2010), esto es debido a que la quitina se encuentra generalmente en la superficie de las paredes celulares de los túbulos germinales y apresorios (estructuras de infección especializadas) de hongos fitopatógenos y algunas quitinasas y glucanasas se expresan en el tejido de la planta y son secretadas a la pared celular o a la vacuola. (Deising y Siegrist, 1995; El Gueddari et al., 2002). Otro claro ejemplo de este rol de defensa y ataque, es el observado en los insectos, las CDA modifican la quitina de la cutícula del insecto así como la modificación de sus propias paredes celulares como defensa de las quitinasas del insecto (Nahar et al., 2004), la quitina de la superficie expuesta de las paredes celulares de algunos hongos, es desacetilada a quitosano por acción de las CDA durante la penetración y el crecimiento invasivo dentro del tejido del huésped, esta conversión de quitina en quitosano durante el crecimiento intercelular protege las hifas del hongo patógeno de ser hidrolizadas por las quitinasas extracelulares de la planta.

Durante la patogénesis una de las estrategias del hongo es desarrollar apresorios para entrar al hospedero y ganar acceso a las fuentes de nutrientes dentro de las células de la planta. Las señales químicas, como iones potasio y calcio, azúcares simples, gradientes de pH y de temperatura inducen la formación de apresorios (Hoch y Staples, 1991).

Además de estos factores, existen otros compuestos que ayudan al proceso de infección, tal es el caso de las fitohormonas, las cuales han mostrado aumentar con ácido abscísico la susceptibilidad a la infección de *Colletotrichum actutatum* en pimientos (Hwang et al., 2008), mientras que diversos autores reportan la producción de grandes cantidades de ácido

indol acético durante la fase biotrófica de la infección causada *Colletotrichum gloeosporioides* (Robinson et al., 1998; Maor et al., 2004; Hwang et al., 2008).

### **Producción y purificación de CDA**

Las enzimas CDA han sido aisladas y purificadas del micelio de los hongos *Mucor rouxii*, *Absidia Coerulea*, *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae* y de extractos líquidos del hongo *Scopulariopsis brevicaulis*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Metarhizium anisopliae*, *Mortierella sp.*, en la literatura también se encuentran diferentes microorganismos en los cuales las CDAs han sido encontradas y estudiadas pero no han sido purificadas totalmente, entre ellas podemos encontrar *Rhizopus circinans* y *nigricans*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Flammulina velutipes*, *Schizosaccharomyces pombe*, (Pacheco et al., 2013; Zhao et al., 2010; Ghormade et al., 2010).

Las enzimas generalmente son producidas en cultivo sumergido y han sido empleados diferentes sustratos: extracto de malta, extracto de levadura, glucosa, polipeptona, peptona, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, ácido glutámico, tiamina, ácido nicotínico, partículas de quitina, entre otros, temperaturas de 22-28 °C, pH de 4.5 - 5.8 para su obtención. (Gao et al., 1995; Desing & Siegrist, 1995; Tsigos & Bouriotis, 1995; Tokuyasu et al., 1996; Cai et al., 2006; Pacheco et al., 2013)

El cultivo en medio sólido también ha sido utilizado en la producción de enzimas CDA, De Santiago (2011), estudio la producción de CDA sobre soportes inertes como el poliuretano y la agrolita, donde evaluaron diferentes microorganismos, relación de carbón-nitrógeno y efecto de inductores, obteniendo  $0.296 \pm 0.053$  U/g SSI con *C. gloeosporioides*, una relación carbono-nitrógeno de 13.5 y ácido abscísico como mejor inductor a concentraciones de 23 mg L<sup>-1</sup>, la enzima obtenida de este trabajo no fue purificada pero si presentó actividad biológica en zimograma usando etilenglicol quitina como sustrato y presentando pesos moleculares de 23, 50 y 150 kDa en SDS-PAGE.

En el 2013 Pacheco et al., informo sobre una CDA extracelular, purificada parcialmente de *C. gloeosporioides*, la cual presentó una actividad específica de 0.018 U mg de proteína<sup>-1</sup>,

la cual fue obtenida a las 96 h de cultivación a pH 6, reportando un peso molecular de 170 y 35 kDa por medio de zimograma.

La purificación de la enzima se ha llevado generalmente con una primera precipitación con sulfato de amonio al 80 % y posteriormente se han empleado la cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio aniónico, interacción hidrofóbica, obteniéndose enzimas purificadas con diferentes características de peso molecular, temperaturas y pH óptimos de reacción, efectos de metales y especificidad de sustrato.

La diferencia de rendimientos durante la purificación, probablemente se deba a la acción sinérgica de varias isoformas y a la pérdida de actividad durante el proceso de purificación (Duo-Chuan, 2006). Un resumen de las estrategias de purificación de CDAs de hongos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos generales de purificación de quitinas desacetilasas

<b>Microorganismo</b>	<b>Metodología de purificación</b>	<b>Referencia</b>
<i>Mucor rouxii</i>	1. Cromatografía de intercambio iónico (CM cellulose)	Araki & Ito, 1975
	2. Concentración de enzima (Collodion bag)	
	3. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE cellulose)	
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	1. Ultrafiltración y dializado	Tsigos & Bouriotis, 1995
	2. Cromatografía de intercambio aniónico (Q Sheparose fast flow)	
	3. Ultrafiltración	
	4. Cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S300 HR)	
	5. Diálisis	
	6. Cromatografía de intercambio catiónico (Mono S)	
<i>Absidia coerulea</i>	1. Cromatografía hidrofóbica (Butyl	Gao et al.,

	Toyopearl-650M)	1995
	2. Diálisis	
	3. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE Toyopearl-650M)	
	1. Cromatografía hidrofóbica (Butyl Toyopearl-650M)	
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	2. Cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose fast flow)	Tokuyasu et al., 1996
	3. Cromatografía de intercambio aniónico (Resource-Q)	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1. Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25)	Cai et al., 2006
	2. Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-100)	
	3. Diálisis y liofilización	

Es importante destacar que las características de las enzimas que han sido purificadas se ven marcadas por la fuente de extracción ya que se ha reportado que las enzimas extraídas del periplasma (intracelulares) generalmente presentan una inhibición al acético mientras las extraídas del medio de cultivo (extracelulares) no presentan esta sensibilidad. (Zhao et al., 2010; Ghormade et al., 2010). Los pesos moleculares de las CDAs han sido encontrados en un intervalo de 25-80 kDa, en algunos casos se ha encontrado de 150 kDa tal es el caso de *C. lindemuthianum*, mientras que la temperatura y pH óptimos se presentan de 50-60 °C y valores de 4.5–6.0 para enzimas intracelulares y de 7-12 para las CDAs extracelulares. (Zhao et al., 2010; Ghormade et al., 2010).

## EFECTO DE INDUCTORES

En la literatura no hay reportes del uso de inductores para aumentar la actividad CDA, pero existen estudios donde han usado fitohormonas con la finalidad de aumentar el quitosano

de la pared celular de diferentes hongos, asimismo, otros autores han informado que las fitohormonas promueven un mayor y rápido crecimiento de *C. gloeosporioides* sobre el hospedero, por lo cual estos estudios están involucrados de manera indirecta con la actividad CDA del hongo, tal como se explicó en la sección mecanismo ataque-defensa, asimismo, es sabido que las fitohormonas pueden acelerar o retardar la senescencia en frutos y flores (Elad, 1988, 1997; Hwang et al., 2008; Chatterjee et al., 2008, 2009)

En *R. stolonifer* se ha adicionado quitosano al medio de cultivo a concentraciones de 3 mg mL<sup>-1</sup>, obteniendo un incremento de CDA. Los autores atribuyen este incremento al carácter policatiónico del quitosano, debido a que con polianiones y moléculas neutras no observaron un efecto inductor en la producción de enzimas (El Ghaouth et al., 1992)

Chatterjee et al., (2008) encontraron que la presencia de hormonas tales como ácido giberélico, ácido indol-3 acético, ácido indol-3 butírico y kinetina, aumentan el contenido de quitosano del micelio de *R. oryzae* con respecto al control (1.7-14.3 %), obteniendo como mejor inductor el ácido giberélico a concentraciones de 0.1 mg L<sup>-1</sup>, aumentando el 50 % de quitosano en la pared celular, por otra parte observaron que las hormonas ácido indol-3 acético, ácido indol-3 butírico y kinetina (2-3 mg L<sup>-1</sup>) mejoran la actividad CDA de *R. oryzae* de 1.07 hasta 1.23 veces y puede ser una de las razones de aumento de producción de quitosano. Posteriormente estos mismos autores en el 2009, reportaron la producción de quitosano por *M. rouxii* en un medio de melaza y sales con adición de hormonas vegetales tales como ácido indol acético, ácido indol butírico, ácido giberélico y kinetina obteniendo como resultado el incremento en la producción de quitosano en un 43.78 % cuando el ácido giberélico fue añadido a 3 mg L<sup>-1</sup>, así mismo, el ácido indol acético aumentó la producción en un 36 % a una concentración óptima de 1 mg L<sup>-1</sup>.

Por otra parte Maor et al., (2004) reportaron que *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* es capaz de metabolizar el triptófano durante la fase biotrófica y necrotrófica de la infección con el fin de producir ácido indol acético mediante el intermediario indol acetamida. Lo que sugiere que durante la interacción hongo-planta, el hongo produce estas fitohormonas para inhibir la respuesta y suprimir la expresión de los genes de defensa de la planta.

Hwang et al., (2008) observaron en pimientos que la adición de la fitohormona ácido abscísico en heridas de hojas previamente inoculadas con *Colletotrichum acutatum* incrementó la antracnosis aumentando el tamaño de la herida así como la incidencia de la enfermedad en frutos. Lo que ha sugerido que el ácido abscísico exógeno suprime los mecanismos de defensa del pimiento haciéndolo susceptible a la enfermedad.

## **SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA**

Un sistema fermentativo se define como el volumen de reacción limitado por un contenedor físico (biorreactor). Donde se lleva a cabo la degradación biológica anaerobia de moléculas orgánicas mediante la acción de ciertas enzimas que actúan directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras.

En base a su alimentación, los biorreactores se pueden operar en: continuo, semicontinuo, lote y lote alimentado.

### **► Sistema de operación en continuo.**

En el sistema de operación en continuo se añade al biorreactor una solución rica en nutrientes ( $S_0$ ) la cual se inocula con microorganismos ( $X_0$ ). Una vez inoculado el biorreactor se comienza a suministrar un flujo continuo de alimentación  $F$  ( $S_a$ ). En los sistemas continuos, el flujo de salida (efluente) del biorreactor es igual al flujo de entrada. El flujo de alimentación  $F$  ( $S_a$ ) está compuesto por los nutrientes del medio de cultivo o sustrato, mientras que el efluente  $F$  ( $S_f$ ,  $X_f$ ,  $P_f$ ) contiene el sustrato residual, la biomasa, así como los productos obtenidos (Zeng et al., 2001).

Si se tiene un mezclado homogéneo en el biorreactor, las condiciones son uniformes y esporádicamente se alcanza el estado estacionario (estado de equilibrio dinámico) (Atkinson, 2008). El estado estacionario se define como una condición de estabilidad en la que varios factores permanecen constantes a través del tiempo, entre ellos el volumen de operación y las concentraciones de biomasa, de sustrato y de producto (Hernández, 2003)

**Ventajas:** En la práctica, el sistema continuo provee una pequeña fluctuación de nutrientes, metabolitos y biomasa (Zeng et al., 2001). Este método permite a los microorganismos crecer en condiciones de estado estacionario en el que el crecimiento ocurre a una velocidad constante. Se logra mantener un estado fisiológico estable en el que se mantiene a la población microbiana en un estado de máxima productividad siempre y cuando los tiempos de retención hidráulicos a los que se opere el sistema no sean mayores a la velocidad específica de crecimiento (Galíndez & Ruíz, 1994; Hernández, 2003).

**Desventajas:** Puede presentarse contaminación en la alimentación continua del reactor o durante la operación. Esto obligaría a parar el proceso, desechar el producto y a volver a alcanzar el estado estacionario, lo cual puede tomar varias semanas. El proceso continuo requiere costos de inversión y operación elevados, además de que es inflexible cuando se trata de obtener diferentes productos (López et al., 2002).

#### ► Sistema de operación por lote.

En el sistema de producción enzimática por lote inicialmente se añade al biorreactor una solución rica en nutrientes (concentración de sustrato,  $S_0$ ) la cual se inocula con microorganismos (concentración de biomasa,  $X$ ) que producen un determinado producto de interés (concentración de producto,  $P$ ). (Hernández, 2003). La multiplicación celular cesa por limitación de nutrientes y/o acumulación de productos tóxicos de excreción celular. Una vez que se ha alcanzado el nivel deseado ( $S$ ,  $X$ ,  $P$ ), el biorreactor se vacía, se lava, se esteriliza y el proceso se repite. Los cambios en los componentes del medio de cultivo dentro del biorreactor producen a su vez cambios en el metabolismo celular (Harvey & Douglas, 1997; Gummadi, 2007).

**Ventajas:** Bajo riesgo de contaminación, flexibilidad operacional cuando el fermentador se utiliza para distintos productos, manejo eficiente entre lote y lote y costos de operación bajos (Nielsen et al., 2003; Rao, 2005; Gummadi, 2007).

**Desventajas:** Tiempos muertos largos que se presentan al momento de vaciar, limpiar y esterilizar el biorreactor para la siguiente producción, el control y optimización del proceso se vuelven complejos y existe el riesgo de mayor variabilidad entre lotes (Nielsen et al., 2003; Atkinson, 2008).

► **Sistema de operación por lote alimentado.**

Esta técnica se define como un cultivo en batch donde se alimenta continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) del microorganismo, este tipo de sistema es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa o algún metabolito específico, pero el medio que contiene los metabolitos es retirado una vez finalizada cada corrida (no hay salida continua).

**Ventajas:** Frente a los otros modos de operación: se puede controlar voluntariamente la velocidad y concentración de la alimentación, cuando se busca la inhibición del crecimiento por sustrato o productos formados es un buen sistema.

**Desventajas:** Al existir una alta concentración de sustrato se puede producir inhibición del crecimiento, efecto de la glucosa, metanol, ácido acético, compuestos aromáticos, entre otros, puede existir contaminación del reactor en la alimentación.

Aunque actualmente también existe el sistema de producción en sólido para la obtención de biomasa o metabolitos secundarios, en los que se emplean sistemas inertes, las enzimas producidas a escala industrial han sido obtenidas generalmente en cultivo líquido, debido a las ventajas que proporciona este tipo de cultivo como el control de temperatura, pH, O<sub>2</sub>, concentración y disponibilidad de sustratos.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad ha crecido el interés por estudiar a fondo la producción, purificación y la caracterización de enzimas de microorganismos que pudieran utilizarse en la industria. En el caso de *C. gloeosporioides*, debido a que es un fitopatógeno los estudios se han centrado principalmente en la fabricación de pesticidas; sin embargo, los frutos y plantas producen fitohormonas tales como ácido abscísico, ácido giberélico y ácido indol-3-acético, las cuales desempeñan un papel importante en el desarrollo de la infección, generando desequilibrios hormonales en la fase temprana, aumentando así la susceptibilidad e inhibiendo la expresión de moléculas de defensa del hospedero haciendo más eficaz la antracnosis generada por *Colletotrichum sp.*, aunado a esto *C. gloeosporioides* es capaz de producir quitinas desacetilasas como mecanismo de defensa (comienzan a desacetilar parcialmente la quitina de sus propias paredes celulares) contra las quitinasas generadas por el hospedero, obteniéndose así productos parcialmente desacetilados. (Nahar et al., 2004; Blair et al., 2006; Zhao et al., 2010).

Actualmente no existen reportes sobre las condiciones óptimas de producción de CDA, ni el uso de fitohormonas como inductores de la actividad CDA producidas por *C. gloeosporioides*, razón por la cual, en este trabajo se propuso estudiar la producción, purificación y caracterización de las CDA de *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido empleando diferentes sistemas de producción enzimática bajo condiciones de inducción.

## HIPÓTESIS

La adición de inductores en el medio de cultivo, además del empleo de diferentes sistemas de producción, *C. gloeosporioides* será capaz de producir una mayor cantidad de enzimas CDA, las cuales al ser purificadas y caracterizadas, presentarán una mayor actividad específica y podrán emplearse en la desacetilación de biopolímeros.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la producción de la CDAs de *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido, modificando las fuentes de nitrógeno y carbono, adicionando inductores y empleando sistemas cerrado y de lote alimentado; para su posterior purificación y caracterización en la desacetilación de biopolímeros.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- ♣ Evaluar el efecto de la fuente de carbono y nitrógeno sobre la producción y actividad CDA de *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido.
- ♣ Evaluar el efecto de añadir hoja de limón, fitohormonas y aminoazúcares como inductores de la producción de CDA *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido en un sistema cerrado.
- ♣ Incrementar la producción enzimática mediante el empleo de un lote alimentado y adición de inductor.
- ♣ Estudiar el efecto de los inductores sobre la composición de las paredes celulares y el desarrollo de *C. gloeosporioides*.
- ♣ Purificar a homogeneidad la enzima CDA producida por *C. gloeosporioides* y caracterizar
- ♣ Evaluar la actividad de la enzima CDA purificada sobre biopolímeros y caracterizar los productos de reacción.

## **CAPÍTULO 1:**

# **EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CDA EN UN CULTIVO SUMERGIDO**

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Una producción eficiente de biomasa y de los metabolitos de interés que sintetiza un microorganismo depende en gran medida de la composición del medio de cultivo en el que crece, además de un adecuado balance entre todos los nutrientes. Las fuentes de nitrógeno y carbono usadas y la relación carbono-nitrógeno (C/N) son factores importantes que afectan la formación del micelio, el desarrollo del microorganismo y los metabolitos de interés (Torres et al., 2011), además de otros factores como la temperatura y pH pueden afectar de la misma manera.

La glucosa, es la fuente de carbono comúnmente usada seguida de la fructosa y manosa, a menudo éstas requieren una fase de adaptación en el microorganismo, aunque los hongos pueden utilizar otras fuentes de carbono como sacarosa, lactosa, maltosa y polisacáridos como almidón, celulosa, pectina, entre otros (Griffin, 1981). Todos los organismos vivos requieren de una fuente de nitrógeno necesaria para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos, en su gran mayoría los hongos prefieren fuentes de nitrógeno orgánicos (urea), aunque en algunos medios se encuentran fuentes inorgánicas donde se deben adicionar aminoácidos (glutamato y asparagina, entre otros) (Griffin, 1981).

Las enzimas CDAs han sido producidas por varios hongos como: *Mucor roxii*, *Metharhizium anisopliae*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* *Rhizopus nigricans* ( Tsigos & Bouriotis, 1995, Win et al., 2001, Nahar et al., 2004; Jeraj et al., 2006; Ghormade et al., 2010) entre otros, utilizando diversas fuentes de carbono, entre las reportadas se encuentran glucosa, sacarosa, quitina coloidal y fructosa, mientras las fuentes de nitrógeno encontradas en la literatura han sido  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extracto de levadura, malta y ácido glutámico (Araki e Ito, 1975; Gao et al., 1995; Tsigos & Bouriotis, 1995; Tokuyasu et al., 1996; Cai et al., 2006).

El objetivo de este capítulo fue evaluar la producción de enzimas CDA del fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivo sumergido, modificando la fuente de nitrógeno y carbono, ya que se busca incrementar la actividad específica de la enzima CDA.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1 Microorganismo

La cepa utilizada fue *Colletotrichum gloeosporioides* que fue aislado de frutos infectados de limón (*var Eureka*), y fue proporcionada de la colección del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (Reynosa, Tamaulipas).

### 1.2.2 Propagación de *C. gloeosporioides* y obtención de esporas

Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 28 °C durante 5 días para su esporulación. Las esporas se colectaron con ayuda de un agitador magnético y solución de Tween 80 (0.1 % p v<sup>-1</sup>) estériles; se colocaron los matraces sobre una parrilla de agitación hasta el desprendimiento de éstas. La suspensión concentrada de esporas se filtró a través de Nylal estéril para separar los restos de micelio. Por último, la cuantificación de las esporas se realizó con una cámara de Neubauer.

### 1.2.3 Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de CDA

Se inocularon  $1 \times 10^7$  esporas g de nutriente<sup>-1</sup> en un biorreactor (Applikon B.V. Holland) que contenía 1.6 L de medio líquido (Tabla 1.1), variando la fuente de nitrógeno.

Tabla 1.1. Composición del medio de cultivo empleado para la producción de CDA de *C. gloeosporioides*

Reactivo	g L <sup>-1</sup>
Sacarosa	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.018
FeSO <sub>4</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0.01

<b>MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0.003
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0.4
<b>Tiamina*</b>	0.01
<b>Ácido nicotínico*</b>	0.01

\*Son adicionados después de esterilizar el medio a una temperatura ambiente.

Las fuentes de nitrógeno utilizadas para cada experimento fueron: ácido glutámico (6.6 g L<sup>-1</sup>), urea (1.57 g L<sup>-1</sup>), NaNO<sub>3</sub> (4.44 g L<sup>-1</sup>) y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.45 g L<sup>-1</sup>), manteniendo la relación C/N (13.8) la cual ha mostrado ser la mejor para este microorganismo (De Santiago, 2011)

El medio líquido se suplementó con hoja de limón (1.5 g L<sup>-1</sup>, adicionado después de la esterilización, a una temperatura ambiente). La cinética duró 7 días a 28 °C, 1vvm y 100 rpm, se tomaron muestras cada 24 h, las cuales fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C para la determinación de la actividad CDA y proteína.

#### **1.2.4 Efecto de la fuente de carbono en la producción de CDA**

Se inocularon  $1 \times 10^7$  esporas g de nutriente<sup>-1</sup> en un biorreactor de 3 L (Applikon B.V. Holland) que contenía 1.6 L de medio líquido (Tabla 1.1), utilizando las fuentes de nitrógeno que resultaron ser las mejores en el experimento efecto de la fuente de nitrógeno y se varió la fuente carbono cambiando la sacarosa por glucosa, pero manteniendo constante la cantidad empleada.

El medio líquido se suplementó con hoja de limón (1.5 g L<sup>-1</sup>, adicionado después de la esterilización, a una temperatura ambiente). La cinética duró 7 días a 28 °C, 1vvm y 100 rpm, se tomaron muestras cada 24 h, las cuales fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C para la determinación de la actividad CDA y proteína.

### 1.2.5 Determinación de actividad CDA

Se cuantificó la actividad CDA de las muestras, mediante el método propuesto por Kauss & Bauch (1988). Es un método espectrofotométrico, en el que se usa una curva estándar con glucosamina en distintas concentraciones (Anexo 1). La etilenglicol quitina (EGC) funciona como sustrato para las enzimas, lo que libera es acetato con lo que se determina la actividad con respecto a la curva patrón.

La reacción se lleva a cabo incubando 100  $\mu\text{L}$  de EGC ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) con 50  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático crudo y se empleó una solución de tetraborato de sodio 50 mM, pH 8.5 a 37 °C por 30 min. La reacción se detuvo con la adición de 250  $\mu\text{L}$  bisulfito de potasio (5 %, p v<sup>-1</sup>) y 250  $\mu\text{L}$  nitrito de sodio (5 %, p v<sup>-1</sup>), se dejó reposar 15 min después de los cuales se agregó 250  $\mu\text{L}$  sulfamato de amonio (12.5 %, p v<sup>-1</sup>), después 5 min se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  del agente cromóforo 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (0.5 %, p v<sup>-1</sup>). Los tubos se pusieron a ebullición por 3 min y se enfriaron con agua fría y enseguida se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de cloruro férrico (0.5 %, p v<sup>-1</sup>), se midió la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm en espectrofotómetro (GENESYS 6, Thermo Spectronic).

Por cada determinación se hicieron testigos, por lo cual la absorbancia empleada para los cálculos es la absorbancia de la muestra menos la absorbancia del testigo de la misma.

La cuantificación de la actividad se obtuvo a partir de la curva estándar y se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de producir un 1  $\mu\text{mol}$  de acetato de la etilenglicol quitina por minuto (Nahar et al., 2004).

### 1.2.6 Determinación de proteína total

Se determinó por la técnica colorimétrica de Lowry-Peterson. Para la cuantificación de proteína total, se suma la determinación de proteína soluble y la proteína insoluble y estas se llevaron a cabo de la siguiente manera:

➤ Proteína soluble

Se agregó 1 mL de extracto crudo enzimático en cada tubo, posteriormente se adicionó 0.5 mL de reactivo A (Anexo 2), se incubó durante 10 min a 30 °C, después se agregó 1 mL de reactivo B (Anexo 2) se agita en un vórtex y se incuban 30 min a 30 °C. Posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración con sero albúmina bovina como estándar (Anexo 2).

➤ Proteína insoluble

La determinación se hizo tomando 0.2 g de biomasa húmeda y se adicionaron 5 mL de ácido fosfórico (0.15 M), se agitaron vigorosamente en vórtex y se pusieron a ebulir durante 7 min a baño maría, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante se realizó la cuantificación de la proteína, tal como se procedió con la determinación de proteína soluble.

### 1.2.7 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados con un análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey Kramer, con el fin de determinar diferencias significativas en la producción de CDA con las diferentes variantes realizadas en cada experimento ( $p < 0.05$ ), usando el programa estadístico NCSS, 2007 (PASS and GESS, USA). Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

## 1.3 RESULTADOS

### 1.3.1 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de CDA

Para la primera parte se mantuvo la fuente de carbono constante (sacarosa, SAC) para cada combinación empleada, cuando se utilizaron el ácido glutámico (AG), el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la urea como fuentes de nitrógeno no se presentó diferencia significativa entre sí, pero el

empleó de  $\text{NaNO}_3$  mostro tener una producción de CDA significativamente menor ( $0.28 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ), (Figura 1.1a), las mayores producciones de CDA se obtuvieron a las 48 h con AG y urea ( $0.64$  y  $0.50 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ). Con el mismo diseño experimental pero añadiendo la hoja de limón, las actividades CDA en todos los experimentos aumentaron de manera significativa con respecto a los controles (sin hoja de limón), (Figura 1.1b), se muestra en ambas figuras el mismo comportamiento de producción de CDA, al presentar 2 picos de actividad CDA a diferentes tiempos, siendo uno significativamente mayor que el otro.

El experimento con la hoja de limón añadida mostró de igual manera una mayor producción de CDA con ácido glutámico y urea siendo estas de  $0.7766$  y  $0.8062 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  respectivamente, presentando una diferencia en cuanto al tiempo de producción con respecto al control, siendo estos tiempos mayores que en los controles, ya que el AG obtuvo la mayor producción a las 72 h mientras la urea lo presentó a las 120 h, estadísticamente no hay una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Análisis Estadístico 1)

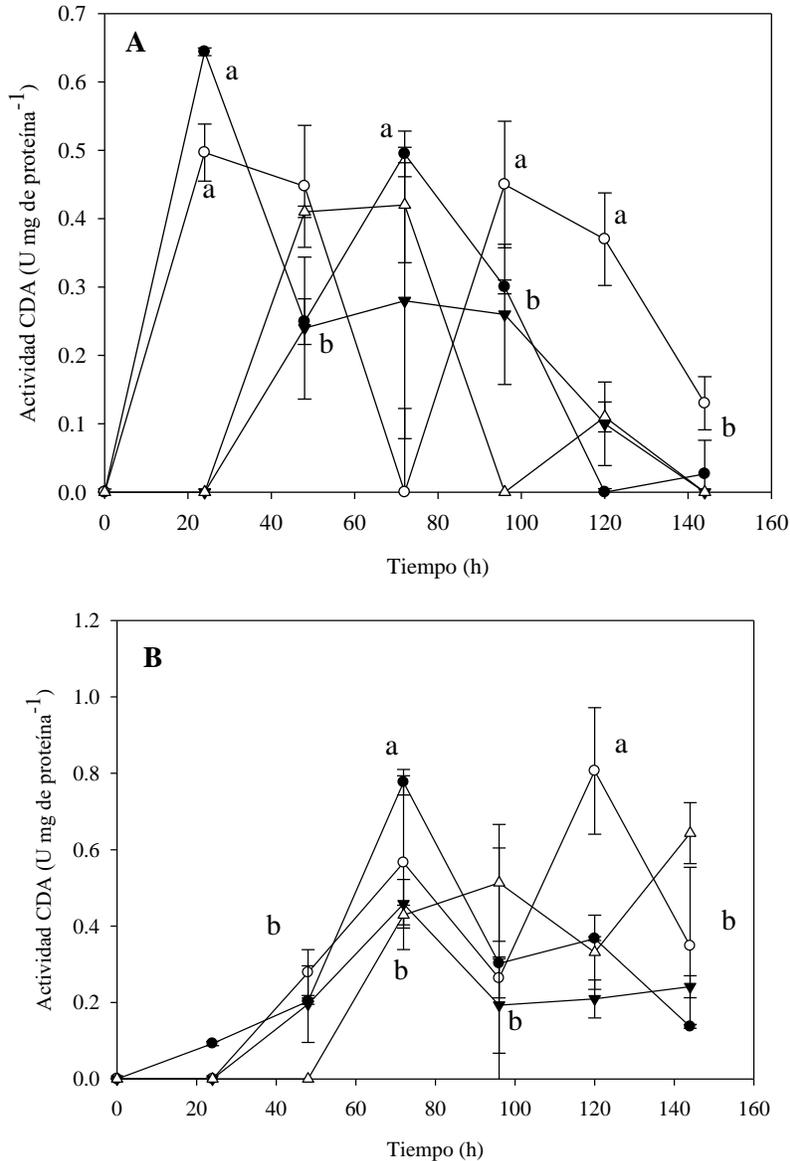


Figura 1.1. Cinética de producción de CDA de *C. gloeosporioides* con las diferentes fuentes de nitrógeno en cultivo sumergido. A) Controles y B) Adición del inductor hoja de limón. Donde para ambas gráficas SAC+AG (círculo sólido), SAC+Urea (círculo vacío), SAC+NaNO<sub>3</sub> (triángulo sólido), (SAC+NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (triángulo vacío). Letras diferentes denotan diferencia significativa (P<0.05)

De acuerdo al análisis estadístico no hubo diferencia significativa en los tratamientos SAC + AG y SAC + Urea aun cuando la hoja de limón fue añadida al sistema, pero si la hubo entre los tiempos de producción, siendo, significativamente diferentes los tiempos de las 72 h y 120 h respectivamente. (p<0.05) (Análisis Estadístico 2)

Existen reportes en los cuales el ácido glutámico ha sido principalmente utilizado como fuente de nitrógeno para el crecimiento de *C. gloeosporioides* con la producción de diferentes concentraciones de CDA excretadas al medio (Tsigos et al., 2000). Tsigos & Bouriotis, (1995) emplearon ácido glutámico para producir, purificar y caracterizar la enzima CDA de *C. lindemuthianum*. Deshmukh et al., (2012) usaron la urea para evaluar la esporulación de *C. gloeosporioides*, la cual se clasificó de acuerdo con el número de conidios, obteniendo de 51-100, lo cual fue clasificado como una esporulación justa.

La interacción SAC + Urea podría ser la mejor condición debido al costo que implica el AG, pero es importante hacer énfasis que la condición SAC + AG produce la mayor actividad específica 48 h antes que el tratamiento SAC + Urea, por lo que representa una ventaja para producir la enzima a mayor escala y considerando que se emplea un sistema de producción enzimática por lote (cerrado, sin entradas ni salidas) la reducción de 120 h a 72 h implicaría que en 1 semana se puede obtener el doble de producción de enzima. A pesar de lo encontrado en la literatura y el beneficio que puede tener la reducción de tiempos de producción, experimentalmente no se encontraron diferencias entre estos tratamientos por lo cual, se decidió usar estas dos fuentes modificando la fuente de carbono, para así poder determinar la mejor.

### **1.3.2 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de CDA**

Se evaluaron dos fuentes de carbono: sacarosa y glucosa (GLC), alternando para cada caso la fuente de nitrógeno. Cuando se llevó a cabo la interacción SAC + AG y GLC + AG para ambos casos se obtuvieron valores de actividad enzimática mayores a  $0.05 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ , mostrando un máximo de actividad de  $0.644 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  con el uso de SAC + AG, mayor a lo reportado por Pacheco (2009). A pesar de que la glucosa es conocida como represor catabólico para diferentes enzimas quitinolíticas e inducibles (Kauss & Bauch, 1988), en el presente trabajo, el uso de GLC + AG produjo la mayor actividad CDA mostrando un máximo de  $0.79 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  a las 96 h (Figura 1.2a), mientras las interacción GLC + Urea mostró un aumento con respecto a la actividad

presentada anteriormente, de hecho presenta una disminución de la actividad obteniendo 0.23 U mg de proteína<sup>-1</sup>.

En la literatura se encuentra reportado que la mejor fuente de carbono para el crecimiento de *C. gloeosporioides* es la xilosa seguida de glucosa y posteriormente la sacarosa (Deshmukh et al., 2012), lo cual coincide con lo obtenido en este trabajo, mientras Yang et al., (2000) reportaron la glucosa como la mejor fuente de carbono para el crecimiento de *C. musae*.

Al adicionar hoja de limón (HL) al medio de cultivo como inductor de la actividad CDA, se presentan actividades mayores a los controles, lo cual corrobora que la hoja de limón sirve como inductor de la actividad CDA, obteniéndose la mayor actividad con la interacción GLC+AG+HL siendo esta de 1.15 U mg de proteína<sup>-1</sup> y mostrando diferencia significativa con respecto a la combinación SAC+ AG + HL, el mismo patrón cinético fue observado con el uso de la urea, mostrando mayor actividad con la interacción GLC + Urea + HL, presentando 0.49 U mg de proteína<sup>-1</sup>.

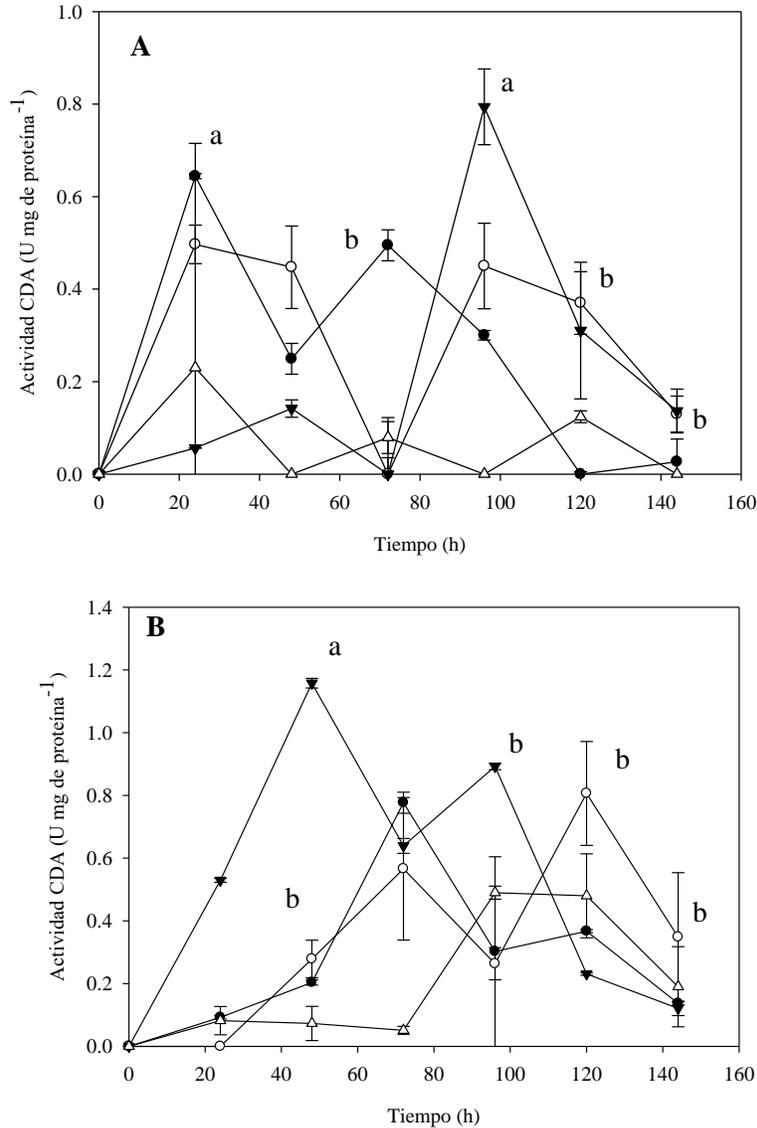


Figura 1.2. Cinética de producción de CDA de *C. gloeosporioides* con las diferentes fuentes de carbono en cultivo sumergido. A) Controles y B) Adición del inductor hoja de limón. Donde para ambas gráficas SAC+AG (círculo sólido), SAC+Urea (círculo vacío), GLC+AG (triángulo sólido), GLC+Urea (triángulo vacío). Letras diferentes denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Algunos autores que han utilizado glucosa como fuente de carbono para la producción de CDA Tokuyasu et al., (1996) reportaron  $0.019 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  para *Colletotrichum lindemutianum* después de 18 días de cultivo, por su parte Tsigos et al., (1995) produjeron alrededor de  $0.002 \text{ U mg of proteína}^{-1}$  después de 72 h de cultivo también para *C. lindemutianum*. De Santiago, (2011), obtuvo alrededor de 0.8 U de CDA; sin embargo, este

valor fue por gramo de sustrato soluble. Cuando se utilizó fructosa y quitina coloidal como fuentes de carbono, los valores reportados fueron menores a  $0.055 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  (Pacheco, 2009).

#### **1.4 CONCLUSIÓN**

El uso de ácido glutámico y urea como fuentes de nitrógeno en cultivo sumergido incrementaron 3 veces la actividad desacetilasa que cuando se usaron el nitrito de sodio y el sulfato de amonio, cuando se evaluó la fuente de carbono la actividad se vio favorecida con el uso de glucosa y ácido glutámico mostrando un máximo de actividad de  $0.79 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  a las 96 h. En todos casos la actividad CDA se vio favorecida con la hoja de limón añadida al medio de cultivo, aumentando casi 2 veces la producción, siendo importante resaltar que además aceleró la producción de las enzimas, obteniéndose mayores actividades en menores tiempos con respecto a los tratamientos sin hoja añadida, por lo cual esto sugirió que algún compuesto encontrado en la hoja de limón tiene un efecto inductor sobre la producción CDA de *C. gloeosporioides*. El medio glucosa, ácido glutámico y hoja de limón, es un medio adecuado para una mayor producción de la enzima CDA al obtenerse  $1.15 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ .

## **CAPÍTULO 2:**

# **LA ADICIÓN DE ÁCIDO ABSCÍSICO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE CDA DE *Colletotrichum gloeosporioides* EN CULTIVO SUMERGIDO**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Las fitohormonas son moléculas orgánicas que desempeñan el papel de mensajeros y son importantes para el desarrollo de la planta. Estos compuestos biológicos interactúan dentro de un equilibrio de una manera sinérgica o antagónica en respuesta al estrés biótico y abiótico (Hartung, 2010). Ciertos patógenos inducen con éxito enfermedades a través de su capacidad para suprimir o inducir un error en el mecanismo de defensa de las plantas. La susceptibilidad de los órganos de la planta, especialmente en frutas y flores, por la invasión de microorganismos fitopatógenos aumenta con el envejecimiento y la maduración. Algunas fitohormonas, tales como etileno, aceleran la senescencia y aumentar la susceptibilidad, mientras que los que retrasan la senescencia, tales como citoquinina y giberelina, tienden a aumentar la resistencia (Hwang et al., 2008).

Las fitohormonas pueden causar desequilibrios hormonales en la fase temprana de la infección debido al desarrollo de la planta. Los microorganismos fitopatógenos pueden producir desequilibrio durante el proceso de la enfermedad por la producción de sus propias fitohormonas. Este efecto ha sido bien documentado con *Colletotrichum gloeosporioides*, que es capaz de producir ácido indol-3-acético (IAA) a partir de triptófano (Robinson et al., 1998). El IAA también se ha producido en la planta por este hongo y a altas concentraciones inhibe la expresión de moléculas de defensa de las plantas (Maor et al., 2004). Por lo tanto, la manipulación de la fitohormona podría crear un entorno adecuado para el crecimiento de hongos en la planta, según lo informado por Ulfers et al., (2015), que aplica ácido abscísico (ABA) exógenamente en una mutante de cebada con un defecto en la biosíntesis de ABA reduciendo así la resistencia contra el hongo *Magnaporthe oryzae*. En otro estudio, la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* se aceleró con la presencia de ácido abscísico y giberélico en pimientos. Estas fitohormonas aceleran o retrasan la senescencia de fruta y aumentan la susceptibilidad a la antracnosis y también estimulan o inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos (Cleland & Tanaka, 1982; Blair et al., 2006; Iriti & Faoro, 2008). Por otra parte, la producción de enzimas degradadoras durante el proceso de fitopatogénesis es favorecida como parte del mecanismo de resistencia de la planta. Los hongos fitopatógenos, a su vez, evaden las hidrolasas de la

planta desacetilando parcialmente la quitina de su pared celular mediante la acción de la enzima CDA tal como se detectó en *C. lindemuthianum* (Blair et al., 2006).

La función de añadir fitohormonas al medio de cultivo de hongos es poco clara y hay pocos informes sobre la estimulación o el nulo efecto del ABA sobre el crecimiento del micelio (Hartung et al., 2010). Además, se determinaron incrementos del contenido de quitosano en las paredes celulares de *Rhizopus oryzae* y *Mucor rouxii* cuando se cultivan en medios suplementados con giberelinas, IAA, ácido butírico y kinetina (Chatterjee et al., 2008; 2009). A pesar de estos informes no existe información sobre el efecto de fitohormonas externas en el crecimiento de *C. gloeosporioides* y la producción de CDA.

En este sentido, se estudiaron los efectos de la fitohormona sobre los procesos de germinación y de la producción de biomasa, así como la producción de CDA al adicionar ácido abscísico (ABA) en un cultivo discontinuo por lote alimentado. Además, la quitina de la pared celular del hongo fue aislada y caracterizada con el fin de determinar si hay un papel de la actividad CDA sobre la composición química de la biomasa cuando el hongo se cultivó con ABA añadido al medio de cultivo.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Microorganismo

La cepa *Colletotrichum gloeosporioides* CF-6 fue aislada de frutos y hojas infectadas de limón, (*Citrus limón var Eureka*), perteneciente a la colección del Centro de Biotecnología Genómica of Instituto Politécnico Nacional (México). La cepa fue sembrada en agar papa dextrosa. La suspensión de esporas fue obtenida después de 7 días por agitación mecánica con una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % (v v<sup>-1</sup>).

### 2.2.2 Condiciones de producción de CDA

La composición del medio líquido (GAM) para la producción CDA fue la siguiente (g L<sup>-1</sup>): 15 g L<sup>-1</sup> de glucosa, 6.6 g L<sup>-1</sup> de ácido glutámico, 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O,

1.8 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.4 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  suplementado con 1 mg de tiamina y 1 mg de ácido nicotínico (Tsigos & Bouriotis, 1995; Pacheco et al., 2013).

### **2.2.3 Determinación del efecto de amino azúcares y fitohormonas sobre la actividad CDA de *C. gloeosporioides***

Para la evaluación del efecto de los inductores, la fermentación sumergida se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio GAM. El medio fue inoculado con  $1 \times 10^7$  esporas g de nutriente<sup>-1</sup> y fue incubado a 28 °C. Se tomaron muestras por triplicado cada 24 h por un período de 96 h. Las muestras fueron filtradas y el sobrenadante fue usado como extracto crudo de enzimas, mientras la biomasa obtenida fue colectada para su determinación por peso seco. El medio fue suplementado con diferentes compuestos incluyendo 0.36 g L<sup>-1</sup> de *N*-acetil-*D*-glucosamina (NacGlc), 0.77 g L<sup>-1</sup> de glucosamina (Glc), 23 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA), 23 mg L<sup>-1</sup> de ácido abscísico (ABA) o 23 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol acético (IAA), las concentraciones fueron establecidas de acuerdo a lo reportado previamente por De Santiago (2011).

### **2.2.4 Producción de CDA de *C. gloeosporioides* con ABA añadido en biorreactor por lote y por lote alimentado**

La suspensión de esporas ( $1 \times 10^7$  esporas g de nutriente<sup>-1</sup>) fue inoculada en un biorreactor (Applikon B.V. Holland) que contenía 1.6 L de GAM sin (control) o con la adición de ABA (23 mg L<sup>-1</sup>) en cultivos discontinuos, se incubó a 28 °C, 1 vvm y 100 rpm. Posteriormente, basándose en los resultados, se realizaron cultivos sumergidos por lote alimentado (SmC), estos se llevaron a cabo mediante la alimentación de GAM fresco (600 mL) a las 48 h con o sin adición de más inóculo ( $1 \times 10^7$  esporas g de sustrato seco inicial<sup>-1</sup>). Se tomaron muestras cada 24 h durante 144 h, determinado pH, actividad CDA, contenido de proteína, contenido de azúcares totales y producción de biomasa.

### **2.2.5 Determinación de pH, producción de biomasa, actividad CDA, azúcares totales y contenido de proteína**

El pH de las muestras fue medido con un potenciómetro (pH 210 HANNA, Italia). Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm y 4 °C durante 25 min. Para la cuantificación de biomasa, esta fue colectada, lavada con agua desionizada, filtrada (Whatman 40, USA) y secada a 100 °C durante toda la noche. El sobrenadante obtenido fue usado como extracto crudo de enzimas para su futuro análisis. La actividad CDA fue determinada del extracto crudo de enzimas siguiendo el método de Kauss & Bauch (1988) usando etilenglicol quitina como sustrato y D-glucosamina-HCl (0 a 0.035  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ) como estándar. Una unidad de CDA fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de acetato por minuto a las condiciones de ensayo. El contenido de proteína fue determinado mediante el método de Lowry-Peterson (1983) usando sero albúmina bovina como estándar. Los azúcares totales fueron determinados del sobrenadante siguiendo la metodología reportada por Dubois et al., (1956) usando glucosa como estándar.

### **2.2.6 Esporas germinadas**

20 mL de medio se colocaron en cajas petri que contenían tres cubreobjetos y se inocularon a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas por g de sustrato seco inicial<sup>-1</sup> y se incubaron a 28 °C y 100 rpm. 200 esporas (germinadas y no germinadas) se contaron usando un microscopio de luz (Carl Zeiss, Alemania) y el número de esporas germinadas por cubreobjetos fue determinada cada hora. Se consideraron esporas germinadas cuando la longitud del tubo germinal fue de un medio del diámetro de la espora. El conteo de esporas germinadas se realizó por triplicado y el ensayo se detuvo cuando se obtuvo el 100 % de germinados. La actividad CDA fue determinada cada 4 h siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Sección 2.2.5).

### 2.2.7 Análisis SEM

El análisis SEM se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Tokio, Japón) con muestras tomadas en la fase inicial del crecimiento del hongo. Las muestras se fijaron con glutaraldehído (5 % v v<sup>-1</sup>), tratadas con OsO<sub>4</sub> (1 % p v<sup>-1</sup>) y deshidratadas con metanol; posteriormente se cubrieron con oro para su análisis.

### 2.2.8 Extracción de quitina de la pared del hongo y determinación de su fracción acetilada ( $F_A$ )

La biomasa fue lavada con agua destilada y se rompió la pared celular con ayuda de un ultraturrax (1 min, 8000 rpm, 25 °C), posteriormente fue filtrada y resuspendida nuevamente en agua, este procedimiento se realizó 3 veces y se procedió a liofilizar la muestra (Niederhofer & Müller, 2003). Subsecuentemente la pared celular del hongo fue lavada en relación 1:40 (biomasa: solvente) en el siguiente orden: cloroformo, cloroformo-metanol (2:1 v v<sup>-1</sup>), diclorometano, dimetil sulfóxido y agua desionizada para la eliminación de lípidos, proteínas y glucanos libres, después se procedió a liofilizar (Heux et al., 2000). Para la purificación total de la quitina se trató el liofilizado con NaOH 1M en una relación 1:40 (p v<sup>-1</sup>) por 24 h a 70 °C para una completa desproteización y después se centrifugó a 14,000 rpm, 25 °C por 15 min (Einbu & Vårum, 2008). El pellet fue lavado repetidamente con agua caliente (70 °C) hasta la neutralización y la muestra fue liofilizada (Farzaneh et al., 2010). La muestra fue resuspendida en una relación 1:100 (p v<sup>-1</sup>) en ácido acético (0.3 M) por toda la noche a 25 °C bajo agitación mecánica. Transcurrido este tiempo, la fracción insoluble se consideró quitina, fue separada por filtración, liofilizada y pesada. El rendimiento de quitina fue expresado como un porcentaje de quitina por biomasa producida (peso seco) ( $Y_{Quitina/Biomasa}$ ).

La quitina fue disuelta en DCl concentrado (7.6 N) por 24 h a 25 °C usando agitación mecánica. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por espectroscopia <sup>1</sup>H RMN (Bruker, Spectrospin 300, Alemania) a 300MHz con ácido 3- (trimetilsilil) propiónico deuterado (TMPS) como referencia interna. Las fracciones acetiladas ( $F_A$ ) de la quitina se calcularon de acuerdo al método descrito por Einbu & Vårum (2008).

### 2.2.9 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey Kramer con el fin de determinar las diferencias significativas de las actividades CDA entre los compuestos (fitohormonas y amino azúcares), la germinación y el lote alimentado utilizando el programa estadístico NCSS (NCSS, PASS y GESS, 2001) ( $p < 0.05$ ).

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 Selección de fitohormonas y amino azúcares sobre la producción de CDA

El uso de fitohormonas incrementa la cantidad de quitosano en la pared celular del hongo (Chatterjee et al., 2008; 2009), aunque el NacGlc y Glc también provocan la síntesis de la pared celular de los hongos por acción de la quitina sintasa, la cual al estar presente en el medio de cultivo induce dimorfismo en levaduras (Simoneti et al., 1974). Al mismo tiempo, se estudió la adición de IAA, ABA, GA, NacGlc y Glc individualmente para evaluar su efecto sobre la producción de CDA. Las concentraciones empleadas de los diferentes inductores fueron reportadas previamente por De Santiago (2011), en donde se probaron concentraciones de 0.23, 2.3, 23, 230, 360, 770 y 2000 mg L<sup>-1</sup>, obteniéndose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), de las actividades específicas CDA a diferentes concentraciones, lo que permitió concluir que la concentración es una variable significativa y las mejores interacciones (Inductor-Concentración) fueron Glc–23 mg L<sup>-1</sup>, GA<sub>3</sub>–2.3 mg L<sup>-1</sup>, ABA–23 mg L<sup>-1</sup>, IAA–23 mg L<sup>-1</sup> y para NacGlc –2.3mg L<sup>-1</sup>. Al probar las mejores interacciones de inductor–concentración los resultados mostraron que la adición de ABA mejora la actividad enzimática, como se observa en la Figura 2.1, por otra parte las actividades CDA con GAM suplementado con NacGlc y Glc no fueron significativamente diferentes al control, la producción se mantuvo constante desde las 48 h hasta las 96 h. Resultados similares se obtuvieron en el cultivo sumergido con fitohormonas, donde sólo se mostró un impacto positivo en la actividad CDA para ABA, siendo 9.5 veces más alta la actividad (1.05 U mg proteína<sup>-1</sup>) que la obtenida por el control (0.11 U mg proteína<sup>-1</sup>). Por lo tanto, los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando GAM con ABA añadido como inductor.

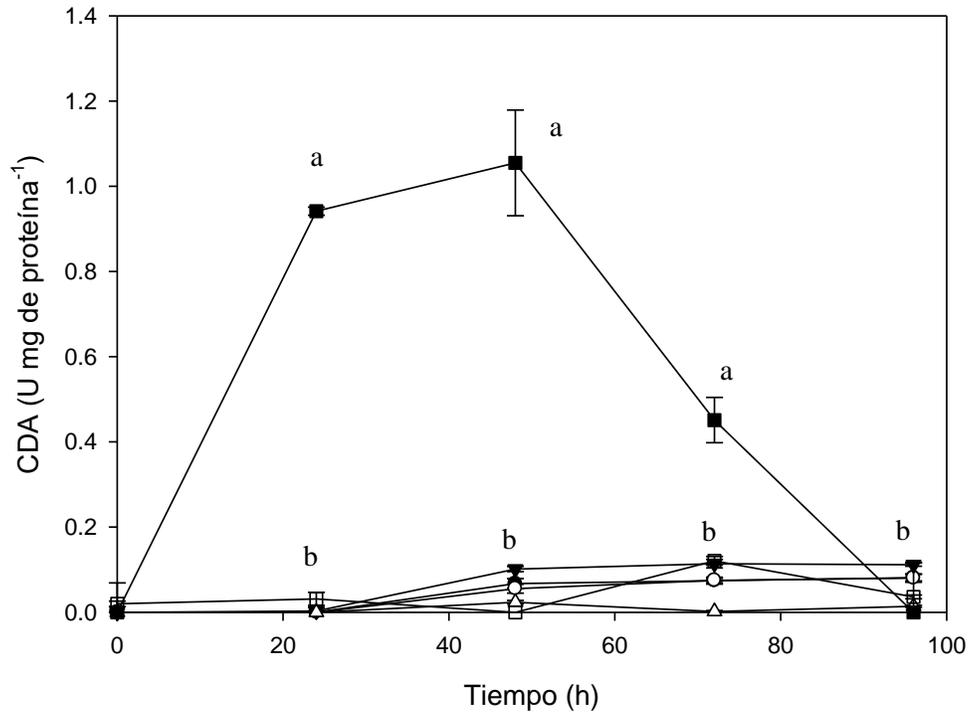


Figura 2.1. Cinética de actividad CDA en SmC de *C. gloeosporioides* con fitohormonas ( $23 \text{ mg L}^{-1}$ ): GA (triángulo sólido), ABA (cuadrado sólido), IAA (triángulo vacío) y amino azúcares: NacGlc ( $0.36 \text{ g L}^{-1}$ ) (círculo sólido) y Glc ( $0.77 \text{ g L}^{-1}$ ) (círculo vacío). Puntos con diferente letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.2 Cultivos discontinuos y de alimentación por lotes para la producción de CDA.

Está bien documentado que el ABA cumple varias funciones biológicas durante el desarrollo de la planta incluyendo la regulación durante la germinación, la transpiración y la respuesta al estrés abiótico. Por otra parte, estudios con frutos de pimiento con antracnosis revelaron que el ABA podría suprimir mecanismos de defensa de las plantas que conduce a cambios en el desarrollo de *Colletotrichum* (Tsigos et al., 2000). Según Vargas et al., (2012) *C. graminicola* es responsable de la antracnosis en el maíz y comienza su infección como patógeno biotrófico y posteriormente cambia a ser necrotrofico. Esta cepa fue reportada como un activo supresor de las defensas de la planta durante la fase biotrófica.

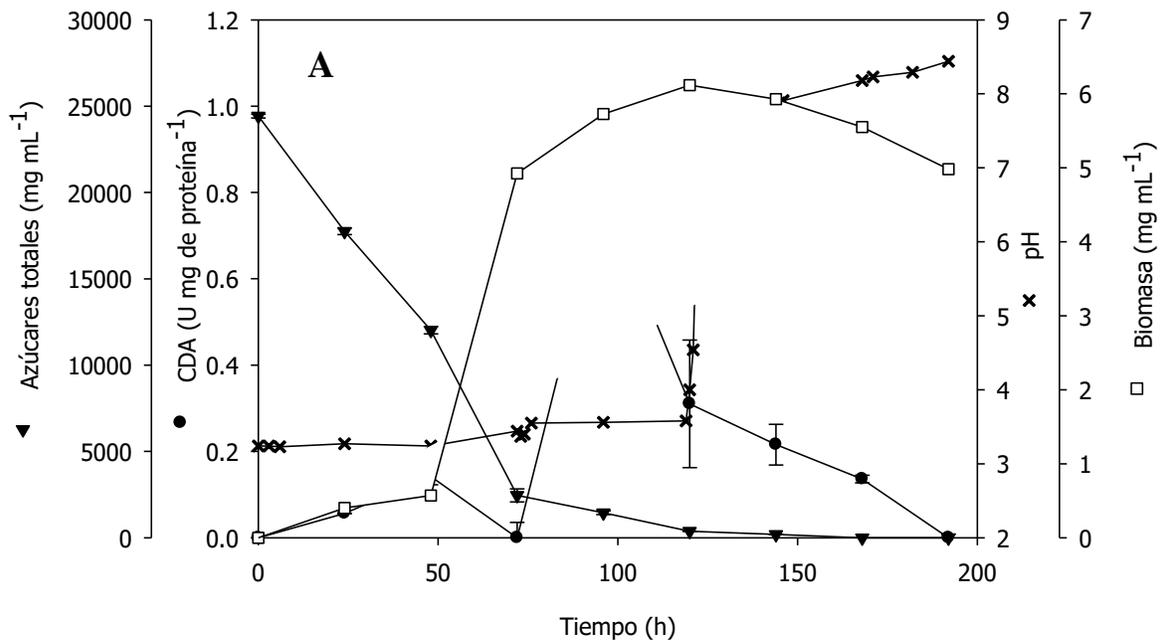
A pesar de que en la actualidad existen estudios que afirman que el ABA acelera el crecimiento de hongos en el cultivo por lotes (Hwang et al., 2008) y en planta (Maor et al., 2004), en el presente documento, no se presentaron cambios significativos en la biomasa producida al añadir ABA, de hecho, la tasa de crecimiento para el control fue significativamente menor ( $\mu=8.73 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) que la estimada con ABA ( $\mu=1.82 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) (Figura 2.2). El crecimiento del hongo resulta en el agotamiento de la glucosa después de las 96 horas del SmC con GAM, provocando el inicio de la fase estacionaria y a partir de entonces los azúcares se consumen totalmente (120 h) (Figura 2.2a). En contraste, cuando se adicionó ABA al medio GAM, se presentó un bajo consumo de azúcares a lo observado con el control; por lo tanto *C. gloeosporioides* se encontró en fase de crecimiento (Figura 2.2b). Las actividades CDA fueron detectadas en las fases lag y de aceleración. Cabe señalar que GAM con ABA añadido muestra una actividad significativamente más alta que con el control, aunque esta producción se encuentra en las primeras etapas de crecimiento de hongos.

La actividad específica más alta de CDA en el control ( $0.79 \text{ U mg proteína}^{-1}$ ) corresponde al segundo pico, el cual se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento del hongo; este resultado experimental es similar a lo reportado por Pacheco et al., (2013) en *C. gloeosporioides* cultivado a pH 6, sin embargo, en el trabajo previo la actividad específica máxima fue de  $0.018 \text{ U mg proteína}^{-1}$  a las 120 h, que es considerablemente inferior a la obtenida en este trabajo, por lo que el aumento en la actividad CDA podría atribuirse al pH ácido 3.2-4.5 durante las 120 h del SmC. (Anexo 3, Figura 2.7)

El hongo *C. gloeosporioides* está adaptado para crecer y superar las barreras naturales de la planta, incluidos los aceites esenciales, la compleja composición de la cáscara y el pH ácido. En este sentido, Deshmukh et al., (2012) informó que *C. gloeosporioides* fue capaz de crecer y esporular en un amplio intervalo de pH (4.0 a 8.0) en SmC, produciendo más biomasa y esporas a pH de 5.5 y 6.0 que a pH 7.5 a 8.0.

De acuerdo con nuestras evidencias experimentales la actividad CDA está influenciada por el pH del ambiente, tal efecto podría explicarse por procesos de regulación de pH responsables de codificar enzimas extracelulares y permeasas en el hongo, así como la estabilización y las actividades biológicas de las enzimas y otros metabolitos que se

conservan en cierto pH cuando son excretados al medio (Prusky et al., 2001; Ramírez et al., 2010). Existe una modulación del pH durante la maduración de la fruta que inicia normalmente a pH ácido, el cual aumenta durante la maduración. En instancia, este cambio del pH regula la expresión y secreción de la pectato liasa de *C. gloeosporioides* en frutos de aguacate (Prusky et al., 2001). Además de eso, el pH del ambiente también se modifica por el crecimiento del hongo, por ejemplo, la producción de amonio como se observa en la Figura 2.2, con un aumento gradual del pH.



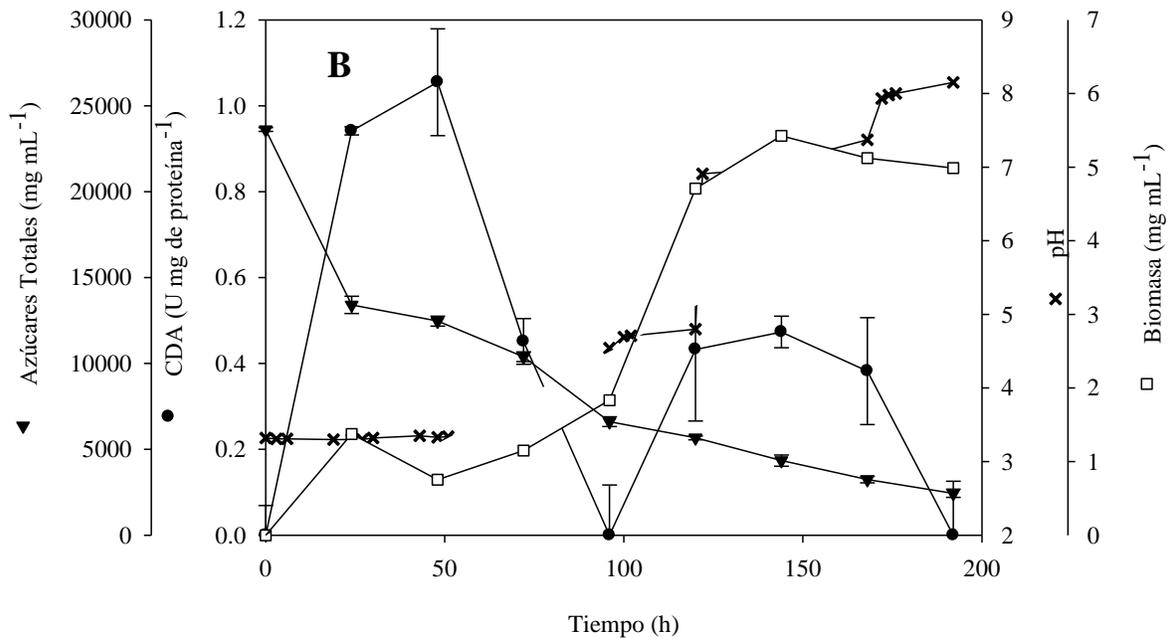


Figura 2.2. Cinética de producción de biomasa (cuadrado vacío), azúcares totales (triángulo sólido), actividad CDA (círculo sólido) y pH (equis) de *C. gloeosporioides* en SmC: a) Control y b) medio suplementado con ABA.

Los análisis microscópicos se llevaron a cabo en *C. gloeosporioides* con el fin de determinar el porcentaje de esporas germinadas, así como la observación de tubos germinales, hifas especializadas, apresorios y otros relacionados con la estructura en las primeras etapas de crecimiento. Las actividades CDA también se determinaron junto con el análisis microscópico, (Figura 2.3). La germinación de las esporas se inició a las 7 h de incubación en el control y el 100 % de esporas germinadas fueron contadas a las 24 h. Hubo un notable retraso en el proceso de germinación en comparación con el trabajo informado por Shi et al., (2011), que determina 96.4 % de las esporas germinadas de *C. gloeosporioides* en agar papa dextrosa después de 8 h de incubación, este retraso puede ser debido al pH ácido en GAM (2.3), que está lejos del óptimo de 5.5-6 tal como lo reportó Deshmukh et al., (2012) para *C. gloeosporioides*. Sin embargo, el bajo pH del medio GAM con ABA añadido no mostró ser una limitante, éste estimuló la germinación, la cual terminó después de 10 h y comenzó a las 2 h (Figura 2.3).

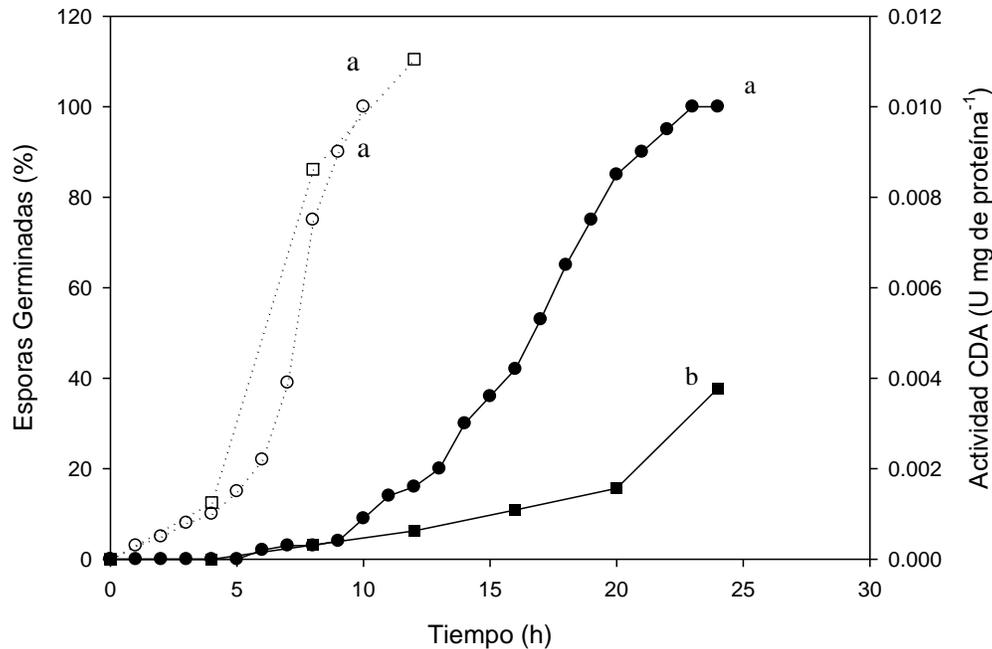


Figura 2.3. Porcentajes de esporas germinadas de *C. gloeosporioides* en GAM (círculo sólido) y GAM con ABA añadido (círculo vacío). Las esporas germinadas fueron determinadas hasta las 24 h después de la inoculación. Cada punto representa la media de tres experimentos con 200 observaciones por experimento. CDA en GAM (cuadrado sólido) y GAM con ABA añadido (cuadrado vacío). Letras diferentes representan diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Los conidios presentaron una morfología de elipse al tiempo cero, como lo informó Shi et al., (2011), esta morfología se conservó hasta las 7 h en el control, mientras que en GAM con adición de ABA la polarización de esporas comenzó a la primera hora (Figura 2.4). El proceso de germinación procedió rápidamente y los tubos germinales fueron visibles a las 4 h, las esporas septadas se presentaron a las 9 h (Figura 2.4), mientras que en el control, los conidios estaban en la etapa de polarización en ese momento. El alargamiento de los conidios se produjo en tubos germinales largos o cortos, sin apresorios y se diferenciaron nuevos conidios. En este sentido, los aislamientos de *C. gloeosporioides* no siempre forman apresorios ya que pueden penetrar directamente con los tubos germinales (Cascino et al., 1990; Kim et al., 1999).

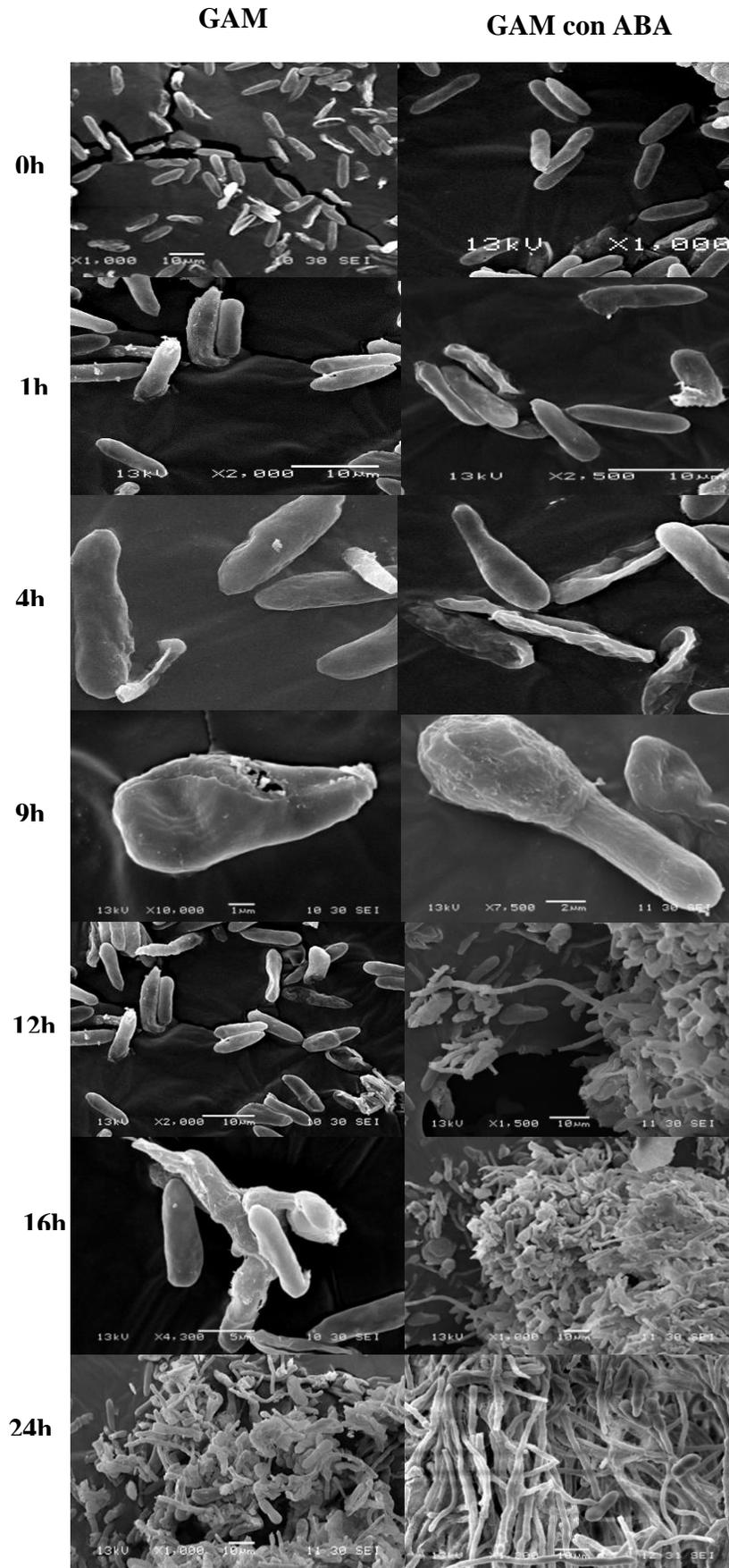


Figura 2.4. Micrografías electrónicas de barrido de las esporas de *C. gloeosporioides* en GAM (izquierda) y GAM con ABA añadido (derecha) para 1,4,9,12,16 y 24 h. C, CS, PC, G y GL significan conidios, conidios septados, conidios polarizados, tubos germinales y esporofitos, respectivamente.

### 2.3.3 Producción de actividad CDA en lotes alimentados

Se realizaron dos estrategias experimentales de lote alimentado, la primera consistió en añadir sólo medio GAM fresco y la segunda fue añadir medio GAM fresco e inocular esporas a las 48 h para ambos casos. El tiempo de alimentación fue seleccionado debido a la evidencia de que la producción CDA se redujo después de 48 h (Figura 2.2b). La adición de esporas junto con medio fresco se consideró como la estrategia adecuada de lote alimentado debido al alto nivel de la actividad CDA, así como el efecto positivo de ABA en el proceso de germinación (Figura 2.3). Los estudios de SEM revelaron que ABA estimula la germinación (Figura 2.4) y nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Hwang et al., (2008) en relación con la aceleración de la antracnosis al usar ABA.

El comportamiento del SmC de *C. gloeosporioides* se muestra en la Figura 2.5, donde la fase exponencial se amplió en las SmC de los lotes alimentados (Figura 2.5a). Como se observa, SmC presenta un pH ácido 3.23 a 3.5 durante los experimentos (Figura 2.5a). La actividad CDA más alta por lotes ( $3.64 \text{ U mg proteína}^{-1}$ ) se determinó a las 96 h de alimentación con inóculo agregado, mientras que lotes alimentados con solamente GAM añadido produjo  $2.15 \text{ U mg proteína}^{-1}$  a las 48 h (Figura 2.5b).

Los resultados muestran claramente que las actividades CDA se determinaron en las etapas iniciales del crecimiento de hongos, precisamente en el inicio de la fase de aceleración; además, la actividad presentó un aumento significativo en SmC por lotes alimentados con inóculo agregado (Figura 2.5b).

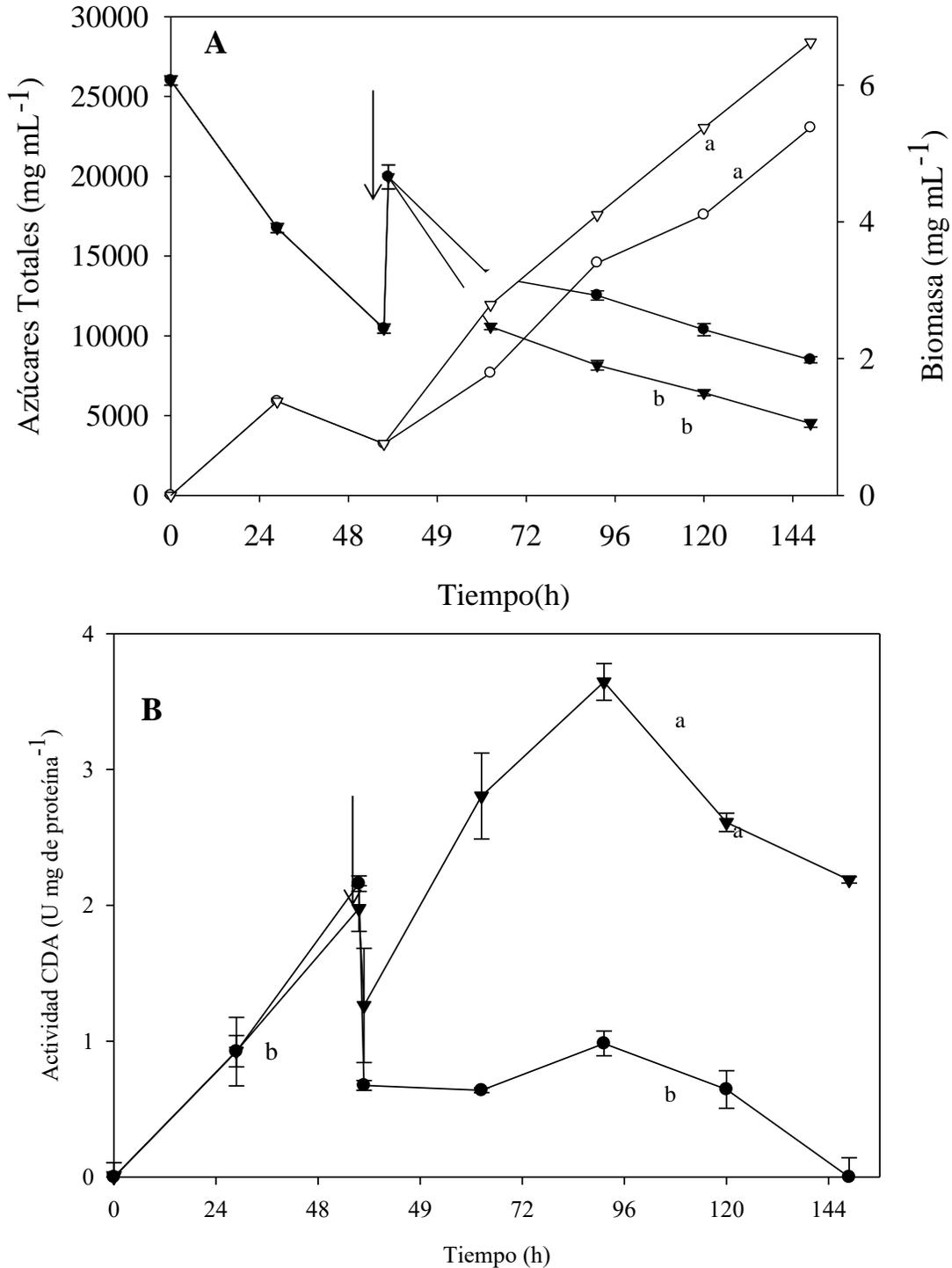


Figura 2.5. Cinética de producción de biomasa y azúcares totales (A) y actividad CDA (B) de *C. gloeosporioides* en SmC GAM con ABA añadido en lotes alimentados (círculos); GAM con ABA añadido en lotes alimentados con inóculo añadido ( $1 \times 10^7$  esporas g nutriente<sup>-1</sup>) (triángulos). Símbolos sólidos son para azúcares y CDA, círculos vacíos para biomasa. Las flechas muestran cuando la alimentación comenzó. Puntos con diferentes letras significan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparación de medias por Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.4 Purificación de quitina de las paredes celulares del hongo en cultivo discontinuo alimentado con ABA añadido.

Los rendimientos de quitina obtenidos no fueron significativamente diferentes con 3.5 % y 2.7 % para el medio de control (GAM) y el lote alimentado con inóculo agregado, respectivamente. El  $F_A$  determinado para nuestra quitina obtenida por SmC con GAM, fue de 0.90, este valor se encuentra en el intervalo reportado en la literatura, Di Mario et al, (2008) informaron de un  $F_A$  de 0.90 a 0.98 para quitinas obtenidas biomasa de siete basidiomicetos producidos en SmC. Este valor  $F_A$  también se encuentra en otras fuentes de quitina tales como crustáceos como en el estudio de Einbu & Vårum (2008) quienes informaron de una  $F_A=0.96$  para la quitina de camarón. Sorprendentemente, el  $F_A$  de la quitina producida en GAM fue significativamente mayor que el  $F_A$  de la quitina obtenida del SmC por lotes alimentados con inóculo agregado y medio fresco suplementado con ABA ( $F_A=0.76$ ) (Figura 2.6). La explicación plausible de la disminución en la fracción de unidades acetiladas de la quitina fúngica producida, podría ser atribuido a la alta producción de CDA con la presencia de ABA en el medio de cultivo. El crecimiento exitoso y la colonización de hongos fitopatógenos está relacionada con la germinación de los conidios y la evasión de hidrolasas defensa de las plantas. Para este propósito, los hongos son capaces de desacetilar la quitina de su pared celular por CDA.

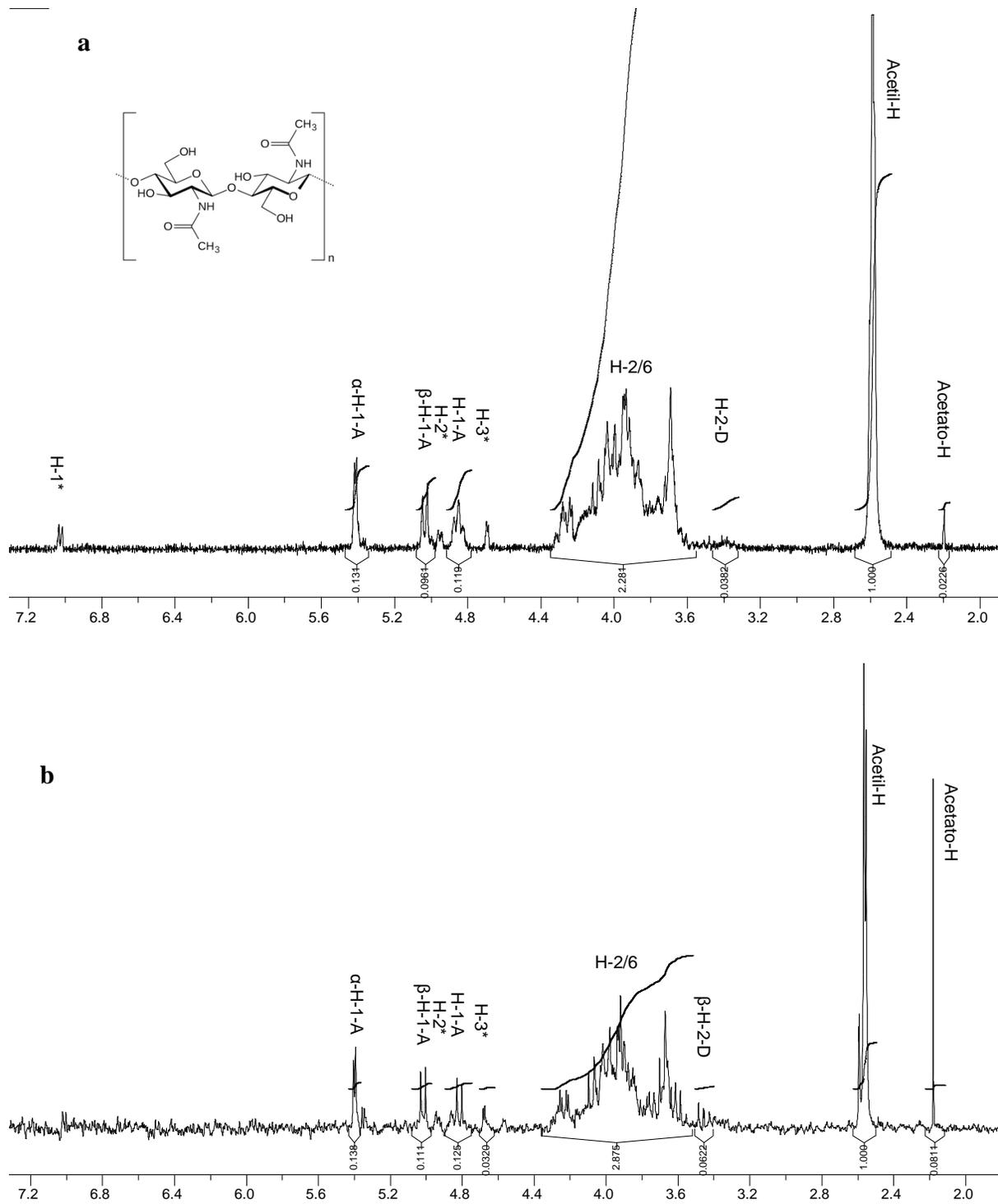


Figura 2.6. Espectros  $^1\text{H}$  RMN de quitina purificada de la pared celular de *C. gloeosporioides* en GAM (a) y SmC por lote alimentado con inóculo y medio fresco suplementado con ABA (b), disueltas en DCl concentrado a 25 °C. La resonancia del protón H-1 del glucofuranosil oxazoliniumion está denotada con un asterisco.

## 2.4 CONCLUSIÓN

La fitohormona ABA acelera el proceso de germinación de *C. gloeosporioides* en nuestro sistema de alimentación por lotes y aumenta la producción CDA. Nuestras actividades CDA obtenidas fueron mayores que la reportada previamente en cultivos discontinuos, lo que se atribuye a la mejora de las condiciones del cultivo por lote alimentado realizado. La fitohormona ABA tiene un impacto en la composición de la pared celular de *C. gloeosporioides* y esto se reflejó en las fracciones acetiladas de la quitina obtenida.

**CAPÍTULO 3:**

**PURIFICACIÓN Y**

**CARACTERIZACIÓN DE UNA CDA**

**EXTRACELULAR DE *Colletotrichum***

***gloeosporioides***

### 3.1 INTRODUCCIÓN

La quitina es el segundo polímero más abundante de la naturaleza, se encuentra formado por residuos de *N*-acetil-*D*-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  (1-4), es un polisacárido estructural que se encuentra comúnmente en el exoesqueleto y cutículas de muchos invertebrados, crustáceos y en la pared celular de hongos, levaduras y algas además de ser de fácil obtención y renovable. (Gao et al., 1995; Tsigos & Bouriotis, 1995; Tsigos et al., 2000; Zhang et al., 2005; Dahiya et al., 2006; Cai et al., 2006; Einbu y Vårum, 2008). Una de las principales desventajas de la quitina es su alta cristalinidad, lo cual la hace un material extremadamente insoluble en soluciones acuosas y en solventes orgánicos, lo que limita sus aplicaciones en la industria (Tsigos & Bouriotis, 1995; Tsigos et al., 2000; Win & Stevens, 2001; Cai et al., 2006).

El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina (la forma desacetilada de la quitina) que puede encontrarse naturalmente en las paredes celulares de algunos hongos, particularmente en el grupo de los Zigomicetos (Tsigos & Bouriotis, 1995; Tokuyasu et al., 1996; Chatterjee et al., 2008), en la actualidad es obtenido mediante una *N*-desacetilación termo-química (soluciones calientes de álcali a períodos largos de tiempo) de la quitina lo que hace al quitosano soluble en soluciones acuosas ácidas y mucho más manejable, con un gran número de aplicaciones, con este método se obtienen quitosanos con un grado de desacetilación del 85 al 93 % (Chang et al., 1997; Wu et al., 2004; Simionatto & Gomes, 2006; Cai et al., 2006), pero tiene la desventaja de dar origen a productos de gran variabilidad en el DA y bajo peso molecular al ser una reacción no específica (Tokuyasu et al., 1996; Chang et al., 1997; Synowiecki et al., 2003; Cai et al., 2006).

Una alternativa o un procedimiento complementario, es la desacetilación enzimática, que puede realizarse usando CDA (EC. 3.5.1.41) bajo condiciones suaves de reacción que superan las desventajas presentadas con en el tratamiento alcalino (Trudel & Asselain, 1990; Kafetzopoulos et al., 1993; Tsigos & Bouriotis, 1995; Cai et al., 2006), ya que los procesos enzimáticos permiten la producción de oligómeros de quitosano con características específicas y alta solubilidad en soluciones acuosas y que pueden ser utilizadas en diferentes aplicaciones biomédicas, farmacéuticas y cosmetológicas (Tokuyasu et al., 1996; Tsigos et al., 2000; Megia et al., 2005; Young-Ju et al., 2008), estas

enzimas hidrolizan el grupo acetamido en las unidades *N*-acetilglucosamina de la quitina o el quitosano, generando unidades de glucosamina y ácido acético, (Zhao & Muzzarelli, 2010). En general las quitinas desacetilasas (CDA) han sido identificadas, caracterizadas y purificadas del medio de cultivo de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium anisopliae* (Tsigos & Bouriotis, 1995; Tokuyasu et al., 1996; Sherestha et al., 2004; Nahar et al., 2004; Cai et al., 2006) y del micelio de diferentes hongos tales como lo son: *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea* y *Aspergillus nidulans* (Kafetzopoulos et al., 1993; Gao et al., 1995; Alfonso et al., 1995), las propiedades de estas CDA como el peso molecular, pH óptimo, temperatura óptima y especificidad por el sustrato han sido estudiadas (Zhao & Muzzarelli, 2010). La actividad de la CDA ha sido evaluada sobre diferentes sustratos entre los que se encuentran quitinas modificadas químicamente, quitosano reacetilados con un DA del 52 %, quitina comercial, quitinas cristalinas y amorfas obtenidas de desechos de camarón, quitinas parcialmente desacetiladas, oligómeros de quitina, quitina coloidal, quitina comercial, glicol quitina, *N*-acetil glucosamina y *N*-acetilquitooligosacáridos, obteniendo diferentes grados de desacetilación en los productos de reacción, cabe destacar que en algunos sustratos utilizados la enzima CDA no fue capaz de desacetilar el sustrato empleado (Araki e Ito, 1975; Kafetzopoulos et al., 1993; Gao et al., 1995; Tsigos & Bouriotis, 1995; Tokuyasu et al., 1996; Nahar et al., 2004; Cai et al., 2006; Pacheco et al., 2013).

En este trabajo, una CDA extracelular de *Colletotrichum gloeosporioides* fue producida en cultivo sumergido utilizando el sistema de producción enzimática de lotes alimentados adicionado con ácido abscísico como inductor de la actividad CDA, aislada y purificada. Las propiedades de la enzima como pH óptimo, temperatura óptima, peso molecular, concentración de sustrato óptimo fueron determinadas y la actividad sobre sustratos fue evaluada en quitosano reacetilado con un DA del 57 % y otro con un DA del 69 %, ácido hialurónico comercial (H.T.M) y una quitina tratada previamente con expansión rápida con freón y fibrilación con  $F_A=0.73$ .

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Microorganismo y condiciones de producción CDA

La cepa *C. gloeosporioides* fue proporcionada del centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional y fue propagada en PDA durante 7 días a 28 °C, las esporas se cosecharon con ayuda de un agitador magnético y solución de Tween 80 (0.1 %) estériles y se inocularon  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de nutriente<sup>-1</sup> en un biorreactor (Applikon B.V. Holland). La producción de enzimas se realizó por lotes alimentados de acuerdo a lo descrito por Ramos et al., 2016 (Capítulo 2), en medio GAM adicionando ácido abscísico (ABA) (Tropigen S.A de C.V), la alimentación se realizó añadiendo inóculo y medio GAM fresco con ABA añadido, la cinética duró 96 horas a 28 °C, 1vvm y 100 rpm.

### 3.2.2 Determinación de la actividad enzimática

Se cuantificó la actividad CDA de las muestras, mediante el método propuesto por Kauss & Bauch (1988). La reacción se llevó a cabo utilizando etilenglicol quitina como sustrato ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) con el extracto enzimático en una solución de tetraborato de sodio 50 mM, pH 8.5 a 37 °C por 30 min., la reacción se detuvo con la adición de bisulfito de potasio (5 %, p v<sup>-1</sup>) y nitrito de sodio (5 %, p v<sup>-1</sup>), se dejó reposar 15 min después de los cuales se agregó sulfamato de amonio (12.5 %, p v<sup>-1</sup>), después 5 min se adicionó como agente cromóforo 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (0.5 %, p v<sup>-1</sup>). Los tubos se pusieron a ebullición por 3 min y se enfriaron con agua helada y enseguida se agregó cloruro férrico (0.5 %, p v<sup>-1</sup>), se midió la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm en espectrofotómetro (Jenway 6305, UK) y se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de producir un  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de acetato de la etilenglicol quitina por minuto (Nahar et al., 2004).

### 3.2.3 Determinación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry-Peterson (1977), empleando sero albúmina bovina como estándar. El método consistió en la adición de 1 mL de reactivo de Lowry A y 1 mL de muestra previamente centrifugada, se mezclaron y se incubaron por 10 min a 30 °C, posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo B (Fenol-Folin Ciocalteu en proporción 1:1 con agua desionizada), se agitó e incubó por 30 min a 30 °C se determinó la absorbancia a 750 nm.

### 3.2.4 Purificación de la enzima CDA

El extracto crudo obtenido a las 96 horas, fue centrifugado a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C para la eliminación de la biomasa, las proteínas presentes en el extracto enzimático se precipitaron con sulfato de amonio a un porcentaje de saturación del 80 % ( $p v^{-1}$ ) y se dejó toda la noche en agitación a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 35 min, la fracción precipitada fue solubilizada en amortiguador Bis-Tris-HCl, (20 mM, pH 5.8). ii) Cromatografía de exclusión molecular. La muestra proveniente de la precipitación con sulfato de amonio fue filtrada en membranas de 0.22  $\mu m$  e inyectada en una columna HiLoad<sup>TM</sup> 16/600, Superdex<sup>TM</sup> 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA; 10 x 600 mm), a una concentración de 25 mg mL<sup>-1</sup>, la elución se llevó a cabo a temperatura ambiente, aplicando un flujo isocrático (1.0 mL min<sup>-1</sup>) de solución amortiguadora de Bis-Tris-HCl, (20 mM, pH 5.8). La cromatografía se llevó a cabo en un FPLC (GE Healthcare, EUA, ÄKTApurifier, UPC 900) que determinó continuamente la absorbancia a 280 nm, se colectaron fracciones de 5 mL. iii) Cromatografía de intercambio aniónico de baja fuerza. Las fracciones que presentaron actividad CDA fueron colectadas e inyectadas en una columna (Bio-Rad, EUA) con DEAE Sepharosa (baja fuerza aniónica), las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl (0-1 M) en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 5.8, a un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup> a cada fracción eluida se le determinó actividad CDA, las fracciones que presentaron actividad CDA fueron colectadas y almacenadas a -80 °C para su liofilización. En cada paso de purificación fue determinada la actividad CDA y el contenido de proteína.

### 3.2.5 Determinación del peso molecular y detección de la actividad CDA

La determinación del peso molecular se realizó un análisis electroforético de acuerdo al método de Laemmli (1970), las muestras fueron calentadas a 100 °C por 10 min con  $\beta$ -mercaptoetanol y se aplicaron a geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 V, la muestra fue revelada mediante tinción de plata (Bio-Rad, número de catálogo 161-0449EDU), se emplearon marcadores de masa molecular de amplio intervalo (Bio-Rad, Precision Plus Protein standards), las bandas fueron analizadas con el software Imagen Lab (Bio-Rad). La detección de la actividad se realizó bajo condiciones semi nativas, las muestras se pusieron en contacto con  $\beta$ -mercaptoetanol sin calentamiento y se aplicaron a geles de acrilamida con adición de etilenglicol quitina (0.01 %,  $v v^{-1}$ ) (Trudel & Asselain, 1990), posteriormente el gel fue incubado por 24 h a 37 °C en un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6 con Tritón X 100 (1 %,  $v v^{-1}$ ), transcurrido este tiempo los geles se sumergieron en un amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 9 adicionado 0.01 % ( $v v^{-1}$ ) de blanco de calcofluor (M2R, Sigma- Aldrich, USA), la actividad fue revelada en un transiluminador UV (Gel Doc Bio-Rad, USA).

### 3.2.6 Caracterización de la enzima CDA

Diversos estudios han demostrado que las reacciones enzimáticas y los productos obtenidos a menudo se ven afectados por diferentes factores: concentración de enzima, tiempo de incubación, temperatura, pH, relación enzima-sustrato (Whitaker, 1972), las cuales definen el resultado de la reacción. Estos factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima (Benítez et al., 2008).

Por lo cual se determinaron las condiciones óptimas de reacción para la enzima, tales como el pH, temperatura, tiempo de reacción y concentración de sustrato, las determinaciones se llevaron a cabo utilizando etilenglicol quitina y quitosano reacetilado con un DA del 69 % como sustrato, realizando las reacciones de acuerdo al método propuesto por Kauss & Bauch (1988).

### **3.2.6.1 Efecto del pH**

El pH fue ajustado usando los siguientes amortiguadores: amortiguador de ácido cítrico-citrato de sodio/HCl (pH 2-3), amortiguador de ácido cítrico-citrato de sodio (pH 4-6), amortiguador de fosfatos de sodio (pH 6-8), amortiguador de borato (pH 8-9), amortiguador de tetraborato de sodio-NaOH (pH 9.5-10.5), amortiguador HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 11-12) y amortiguador de KCl-NaOH (pH 12-13). Se utilizó amortiguador de boratos 50 mM, pH 8.5 como amortiguador base y éste fue ajustado con cada amortiguador según el pH a utilizar, el pH óptimo fue determinado usando una concentración final de 20 mM para cada amortiguador, tal como lo reporta Tokuyasu et al., (1996).

### **3.2.6.2 Efecto de la temperatura**

La temperatura óptima de la enzima fue determinada probando temperaturas de 17-77 °C, aumentando la temperatura en un orden de 10 en 10, en este experimento fue empleado el amortiguador al pH que resultó ser el óptimo, utilizando como sustrato etilenglicol quitina y quitosano reacetilado con un DA= 69 % a una concentración de 1mg mL<sup>-1</sup>, para cada sustrato.

### **3.2.6.3 Tiempo de reacción**

Se probaron siete diferentes tiempos de incubación siendo estos de 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h para determinar el tiempo de reacción óptimo de la enzima para la desacetilación de los sustratos.

### **3.2.6.4 Determinación de la concentración óptima de sustrato**

Este parámetro fue determinado debido a que es bien sabido que la concentración de la enzima afecta principalmente en la velocidad inicial de la reacción y que a mayor concentración de enzima mayor actividad catalítica (siempre y cuando haya suficiente

sustrato), por lo tanto la velocidad inicial varía con la concentración del sustrato y enzima añadidos.

La concentración se determinó utilizando como sustrato etilenglicol quitina y quitosano reacetilado con un DA=69 %, las concentraciones empleadas fueron de 2.5–12.5 mg mL<sup>-1</sup> aumentando esta concentración en un orden de 2.5, tal como lo empleado por Pacheco et al., (2013) y posteriormente se probaron concentraciones de 20 y 25 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.7 Actividad desacetilasa sobre diferentes sustratos

La actividad de la enzima CDA de *C. gloeosporioides* fue estimada sobre diferentes sustratos: quitosanos reacetilados con un DA= 57 y 69 %, ácido hialurónico comercial y una suspensión de quitina tratada con la técnica expansión rápida con freón más fibrilación con un  $F_A=0.73$ . Los sustratos fueron adicionados a una concentración de 12.5 mg mL<sup>-1</sup>, adicionando 0.15 U de enzima purificada, las reacciones enzimáticas se realizaron a las condiciones de reacción óptimas para la enzima.

Los productos de reacción fueron purificados y liofilizados para la determinación del DA y del peso molecular. Para determinar el DA del quitosano después de la purificación se tomaron 10 mg de la muestra que fueron disueltos con agitación magnética en 800 µL de D<sub>2</sub>O + 5 µL de HCl (12 N) por 12 horas a temperatura ambiente. El análisis se realizó por espectroscopia <sup>1</sup>H RMN (Bruker-Ultrashield™ 300, Alemania) a 300MHz, con HOD como referencia interna, los espectros fueron analizados en el software SpinWorks 2.5. El DA de las muestras de quitosanos y del ácido hialurónico se calcularon de acuerdo al método descrito por Hirai et al., 1991.

Mientras que para el análisis de la quitina, después de la purificación se tomaron 20 mg de la muestra que fueron disueltos con agitación magnética en 800 µL de DCl (7.6 N en D<sub>2</sub>O, Euriso-Top) por 24 h a temperatura ambiente. El análisis se realizó por espectroscopia <sup>1</sup>H RMN (Bruker, Spectrospin 300, Alemania) a 300MHz con ácido 3- (trimetilsilil) propiónico deuterado (TMPS) como referencia interna. Las fracciones acetiladas ( $F_A$ ) de la quitina se calcularon de acuerdo al método descrito por Einbu & Vårum (2008).

### 3.2.7.1 Grado de desacetilación de los quitosanos estimada por el modelo Gompertz

La relación de grado de desacetilación con la acción de las enzimas fue estimada por el modelo Gompertz usando una regresión no lineal (STATISTICA Star Soft Inc.) de acuerdo a la ecuación (1)

$$P(t) = P_{max} \exp[-b \exp(-kt)] \dots\dots\dots (1)$$

Donde  $P(t)$  es el grado de desacetilación de quitosano al tiempo ( $t$ ) de reacción con la enzima:  $a$  es la máxima desacetilación (%) al tiempo  $t \rightarrow \infty$ ;  $b$  es una constante que relaciona las condiciones iniciales cuando el tiempo es  $t=0$ , por lo que  $P(t)=P_0=a \exp(-b)$ ;  $k$  es la relación constante grado de desacetilación ( $h^{-1}$ ). La tasa máxima de desacetilación ( $V_{max}$ ) fue calculada del modelo como  $V_{max}=0.368P_{max}k$

### 3.2.8 Determinación del peso molecular

La determinación se realizó por medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC), el ácido hialurónico comercial (H.T.M.), fue analizado en un HPLC Waters<sup>TM</sup> 717 plus autosampler (Rev. 3.1), acoplado a un detector multiángulo, Wyatt Technology DAWN EOS (refractómetro Shimadzu/UFLC RID-10 A), usando 2 columnas: PL aquagel OH mixed M 8 $\mu$ m + PL aquagel OH mixed H 8 $\mu$ m, a un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup> a temperatura ambiente (25 °C). Las muestras se disolvieron previamente en un amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.1 a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, se dejaron disolviendo toda la noche y posteriormente fueron filtradas en membranas de 0.45  $\mu$ m. El estándar utilizado fue Pullulant de 200 kDa. EL programa usado para el análisis fue Astra 6.1

Los quitosanos se analizaron en un HPLC DAWN HELEOS- II Wyatt Technology, acoplado a una bomba 1260 Agilent Infinity Technologies y a un autosampler 1260 ALS, las muestras se desgasificaron en un VWR 2003, se usaron dos columnas: TSK- PWG 2500 + TSK- PWG 6000 a 25 °C, la longitud de onda fue medida en un detector UV 1260 MWD VL ( $\lambda=280$  nm) a un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Las muestras se disolvieron previamente en un amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 4.5 a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, se dejaron disolviendo toda la noche y posteriormente fueron filtradas en membranas de 0.45  $\mu$ m. El

estándar utilizado fue Pullulant de 200 kDa. EL programa usado para el análisis fue Astra 6.1.2.84

### **3.2.9 Análisis Estadístico**

Los resultados fueron analizados con un análisis de varianza y comparación múltiple de medias por Tukey Kramer, ( $p < 0.05$ ), con el fin de determinar diferencias significativas en la producción de CDA con las diferentes variantes realizadas en cada experimento y en el DA de los productos obtenidos, usando el programa estadístico NCSS, 2007. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

## **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.3.1 Purificación y estimación del peso molecular de la CDA.**

La purificación de la CDA del medio de cultivo de *C. gloeosporioides* usando diferentes técnicas cromatográficas se encuentra resumida en la Tabla 3.1, después de los cuatro pasos de purificación se obtuvieron 8.5 veces más de actividad específica, con un rendimiento de 1.1 %, comparando estos resultados con lo reportado en la literatura, los valores obtenidos en este trabajo para la actividad específica ( $2.9 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ) al final de la purificación son mayores a los reportados para *C. lindemuthianum* ( $0.219 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ; Tsigos & Bouriotis, 1995), pero similares a los obtenidos con *S. brevicaulis* ( $2.58 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ; Cai et al., 2006) y con *M. rouxii* ( $2.96 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  Kafetzopoulos et al., 1993), aunque cabe destacar que las actividades específicas obtenidas antes de la purificación son menores a las obtenidas en el presente trabajo lo que se debe al sistema de producción enzimática empleado reportado anteriormente por Ramos et al., 2016 (Capítulo 2). Los perfiles cromatográficos de la purificación se muestran en la Figura 3.1.

Tabla 3.1. Purificación de la CDA de *C. gloeosporioides*

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (unidades mg de proteína <sup>-1</sup> )	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	15616	5315.3	0.34	100	1
Precipitación (Sulfato de Amonio)	1026	455.3	0.44	8.56	1.30
Exclusión molecular (Superdex 200)	425	336.8	2.3	6.34	6.76
Intercambio iónico (DEAE Sepharosa)	58.9	58.65	2.9	1.1	8.53

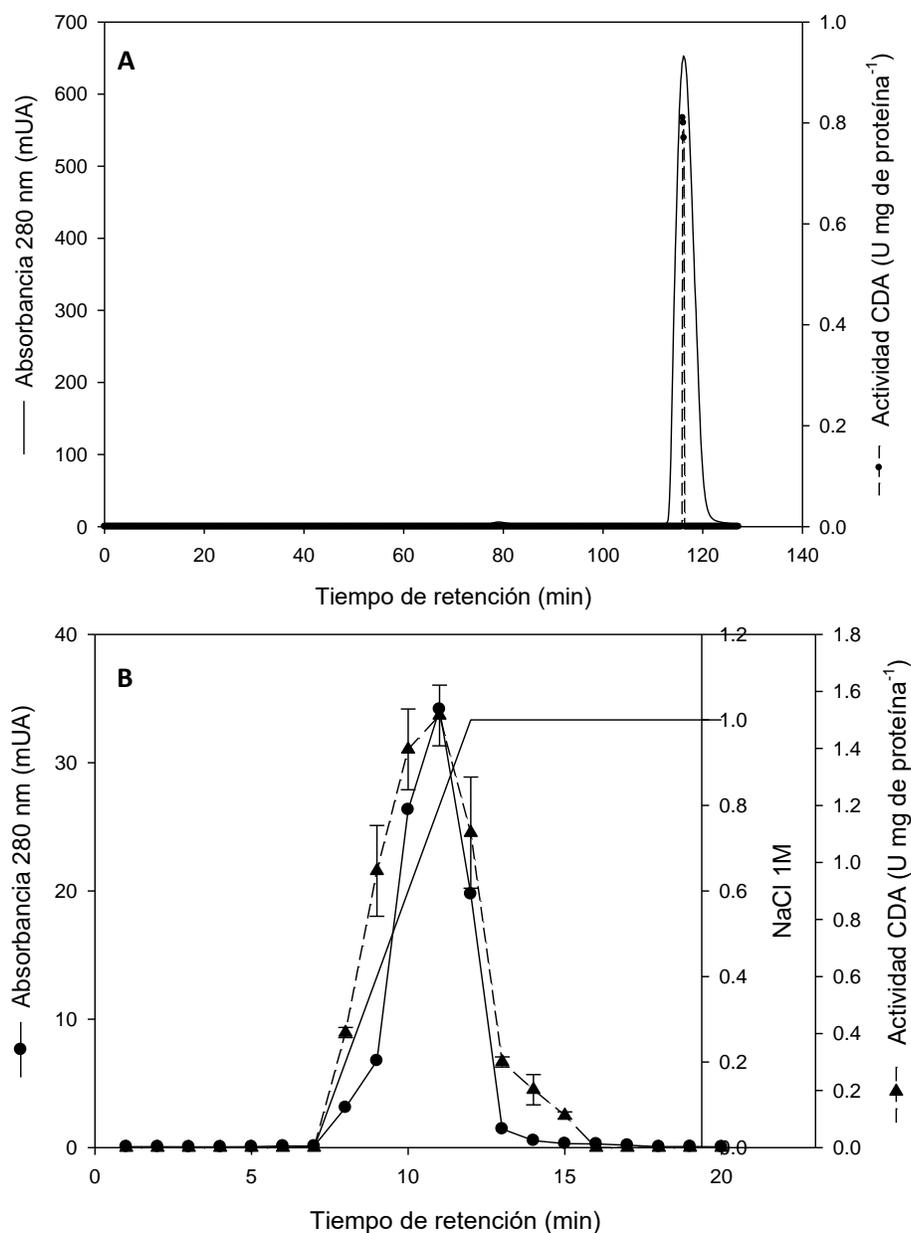


Figura 3.1. Purificación de la CDA. A) Purificación de la enzima CDA en la columna HiLoad™ 16/600, Superdex™ 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA). La muestra que contiene la CDA (5 mL, 25 mg de proteína) eluida a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> aparece en el tiempo de retención 115-125 min, el contenido de proteína determinado por UV a 280 nm. B) Purificación de la enzima CDA en DEAE Shearose (Bio-Rad). La muestra que contiene la CDA (0.5 mL), eluida a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> aparece en tiempo de retención 10-12 min, el contenido de proteína determinado por UV a 280 nm.

El peso molecular de la enzima purificada fue estimado en 50 kDa de acuerdo al SDS-PAGE, Figura 3.2, en la literatura existen tres publicaciones donde obtienen pesos

moleculares similares para la CDA, Desing & Siegrist, (1995), reportaron 5 isoformas de una CDA extracelular de *Uromyces viciae-fabae*, presentando un peso de 48 kDa por SDS-PAGE para una de las isoformas encontradas, Cai et al., (2006) purificaron una CDA de *Scopulariopsis brevicaulis* obteniendo un peso de 55 kDa por SDS-PAGE y por filtración cromatográfica de gel, Kim et al., (2008) presentaron dos isoformas con un peso molecular de una CDA de *Mortierella sp.* con un peso molecular de 50 y 59 kDa, , ambas enzimas presentaron actividad a pH ácidos (5.5).

La enzima de *C. gloeosporioides* presentó actividad sobre etilenglicol quitina, tal como se muestra en el zimograma, detectando una banda de actividad en la misma zona donde se observa la banda de los 50 kDa en el SDS-PAGE, Figura 3.2b, observando que la banda conforme al grado de purificación se intensifica más.

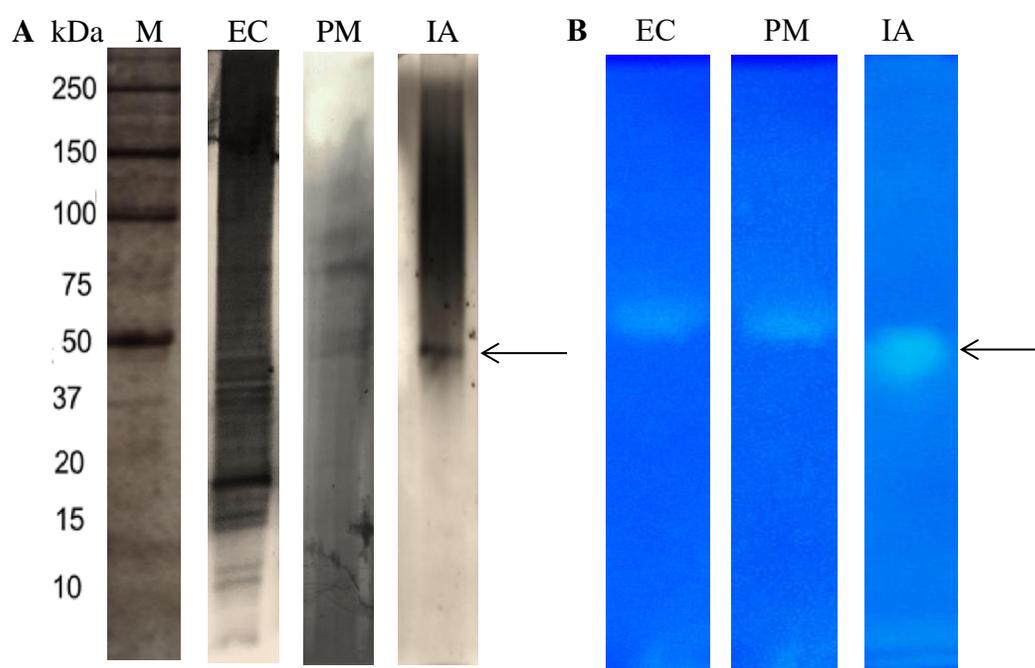


Figura 3.2. Determinación de peso molecular (SDS-PAGE) y de actividad sobre etilenglicol quitina (Zimograma). A) SDS-PAGE de la enzima en los diferentes pasos de purificación, M: Marcador (Bio-Rad), EC: extracto crudo, PM: Separación de la muestra por peso molecular en la columna HiLoad™ 16/600, Superdex™ 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA), IA: separación de la muestra por intercambio aniónico en la columna Biorad (EUA); B) Zimograma de la enzima en los diferentes pasos de purificación, EC: extracto crudo, PM: separación de la muestra por peso molecular en la columna HiLoad™ 16/600, Superdex™ 200 prep grade, (GE Healthcare, EUA), IA: separación de la muestra por intercambio aniónico en la columna Biorad (EUA).

### 3.3.2 Caracterización de la actividad CDA

#### 3.3.2.1. Efecto del pH

El pH óptimo de la enzima fue determinado en un intervalo de pH 2 hasta 12, las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Kauss & Bauch, (1988), manteniendo constantes factores como temperatura (37 °C), sustrato: etilenglicol quitina y quitosano reacetilado al 69 % (1 mg mL<sup>-1</sup>), tiempo de reacción (30 min), según lo reportado por algunos autores (Tsigos & Boutiris, 1995; Pacheco et al., 2010). La actividad enzimática mostró una dependencia significativa de los valores de pH del medio de reacción (Figura 3.3). Cuando se emplea la etilenglicol quitina como sustrato, a pH 2 no se presenta actividad, presentando actividad de pH 4 a 12, mientras que cuando se utiliza quitosano reacetilado con un DA=69 % la enzima sólo presenta actividad en un pH de 2 a 6, aunque en ambos casos la reacción se ve favorecida obteniendo la mayor actividad CDA a pH 3, este resultado es justificable debido a que *C. gloeosporioides* fue aislado de frutos cítricos (limón variedad Eureka), por otra parte datos similares reporta Ghormade et al., (2010), para una CDA extracelular no purificada de *M. anisopliae* la cual mostró actividad a pH de 2.65, 3.8 y 4.11.

La enzima no presentó inhibición por el amortiguador de acetatos empleado, tal como fue reportado por Tokuyasu et al. (1996) donde la CDA purificada del hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* no presentó inhibición por acetatos, mientras Kafetzopoulos et al. (1993) y Nahar et al., 2004, mostraron que la CDA de *M. anisopliae* no fue inhibida en presencia de acetato de sodio, Tsigos & Boutiris, (1995) tampoco presentaron en *C. lindemuthianum* inhibición por ácido acético. Ghormade et al., (2010), reportaron que las quitinas desacetilasas que generalmente presentan inhibición por acetatos son las encontradas en el periplasma mientras que la CDA extracelular no presentan ningún cambio en la actividad con el uso de estos amortiguadores.

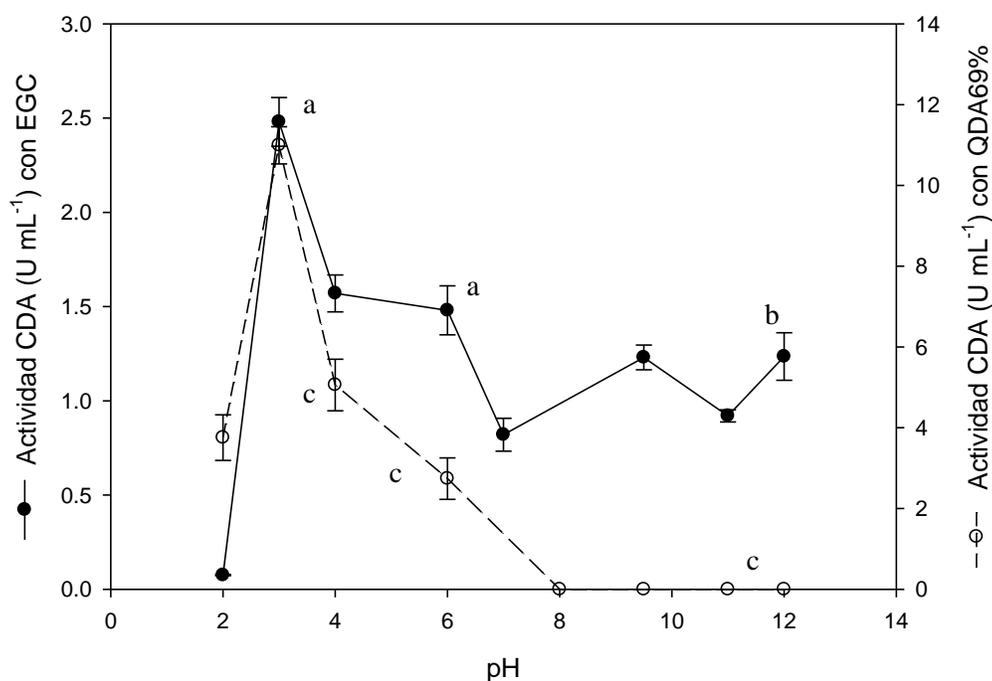


Figura 3.3. Efecto del pH en la actividad CDA utilizando diferentes sustratos. Determinación de pH óptimo empelando como sustrato etilenglicol quitina a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (EGC, círculo sólido). Determinación de pH óptimo empelando como sustrato quitosano reacetilado con un DA=69 % a una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (QDA69%, círculo vacío)

### 3.3.2.2 Efecto de la temperatura

La temperatura óptima fue determinada probando temperaturas de 17-77 °C (Gao et al., 1995; Tokuyasu et al., 1996; Cai et al., 2006), utilizando el amortiguador de ácido cítrico-citrato de sodio/HCl (pH 3), (de acuerdo a los resultados anteriores). De manera similar a las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente se incrementa con la temperatura (factor de  $2^3$  por cada 10 °C). Conforme aumenta la temperatura, se transfiere más energía cinética a las moléculas reactantes, resultando en un mayor número de colisiones por unidad de tiempo, sin embargo este aumento también resulta en la disminución de la tasa de actividad causada por la termoestabilidad natural de la proteína (Bisswanger, 2008).

La temperatura óptima obtenida fue de 37 °C, después la enzima comienza a perder estabilidad, desnaturalizándose y mostrando la pérdida gradual en la actividad CDA

conforme la temperatura aumenta, tal como se muestra en la Figura 3.4. Resultados similares se han obtenido con *Rhizopus circinans* en donde la temperatura óptima obtenida fue de 37 °C, usando etilenglicol quitina como sustrato a un pH de 5.5 (Zhao et al., 2010). Por otro parte Araki e Ito, (1975), han determinado la actividad desacetilasa de *M. rouxii* incubado con diferentes sustratos a una menor temperatura (30 °C), mientras Nahar et al., también presentan actividad a los 30 °C de una CDA extracelular de *M. anisopliae*.

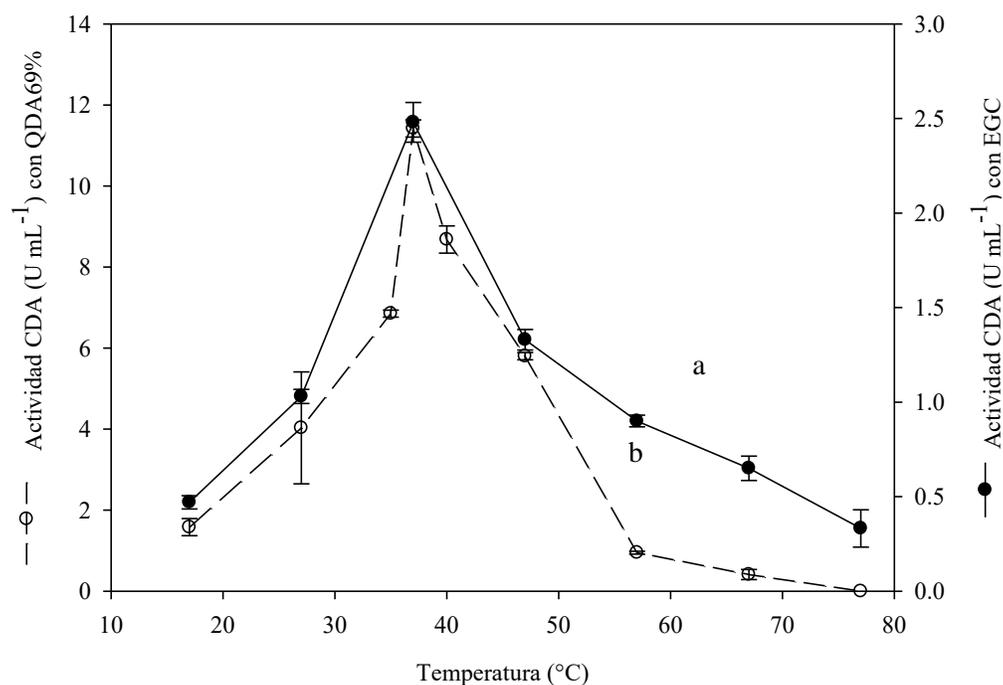


Figura 3.4. Efecto de la temperatura en la actividad CDA utilizando diferentes sustratos. a) Determinación de temperatura óptima empelando como sustrato etilenglicol quitina a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> (EGC, círculo sólido). Determinación de temperatura óptima empelando como sustrato quitosano reacetilado con un DA=69 % a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> (QDA69%, círculo vacío).

### 3.3.2.3 Efecto de la concentración de sustrato

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, la determinación se realizó empleando como amortiguador ácido cítrico-citrato de sodio/HCl (pH 3), temperatura de 37 °C durante 30 min, se probaron concentraciones de 2.5-25 mg mL<sup>-1</sup> de EGQ y de quitosano

reacetilado al 69 % (QDA69%) (Win et al., 2001; Nahar et al., 2004; Beaney et al., 2007; Pacheco et al., 2013). La máxima actividad obtenida fue de  $6.97 \text{ U mL}^{-1}$  cuando la concentración de EGC es  $10.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , posteriormente la enzima comienza a perder actividad sobre el sustrato, mientras que para QDA69% se obtuvo una concentración máxima de sustrato de  $12.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , obteniendo una actividad CDA de  $8.8 \text{ U mL}^{-1}$ , como se observa en la Figura 3.5, no se presenta diferencia significativa entre la concentración de  $10.5$  y  $12.5 \text{ mg mL}^{-1}$  cuando el sustrato es la etilenglicol quitina así como tampoco se emplea el quitosano reacetilado a  $12.5$  y  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ , por lo cual se decidió emplear para los futuros experimentos la concentración de  $12.5 \text{ mg mL}^{-1}$  de sustrato, resultados similares obtuvieron Pacheco et al., (2013) cuando utilizaron un quitosano reacetilado con un extracto crudo obteniendo como máxima concentración de sustrato  $10.5 \text{ mg mL}^{-1}$  pero sin encontrar diferencia significativa con  $12.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Es importante observar que en todas las determinaciones anteriores, cuando se utilizó como sustrato el quitosano reacetilado con DA=69 %, la actividad CDA aumentó de manera significativa (1.3 veces), por este sustrato que por la etilenglicol quitina, resultados similares han sido presentados con una CDA del basidiomiceto de *F. velutipes*, donde la enzima mostró cerca de 13 veces más actividad sobre un quitosano con un DA=30 % que con la etilenglicol quitina (Zhao et al., 2010), mientras que Tokuyasu et al., (1996) reportan para *C. lindemuthianum* 1.4 veces más actividad con una quitina desacetilada soluble en agua y más de dos veces con  $(\text{GlcNAc})_4$  y  $(\text{GlcNAc})_5$  que cuando usaron etilenglicol quitina como sustrato.

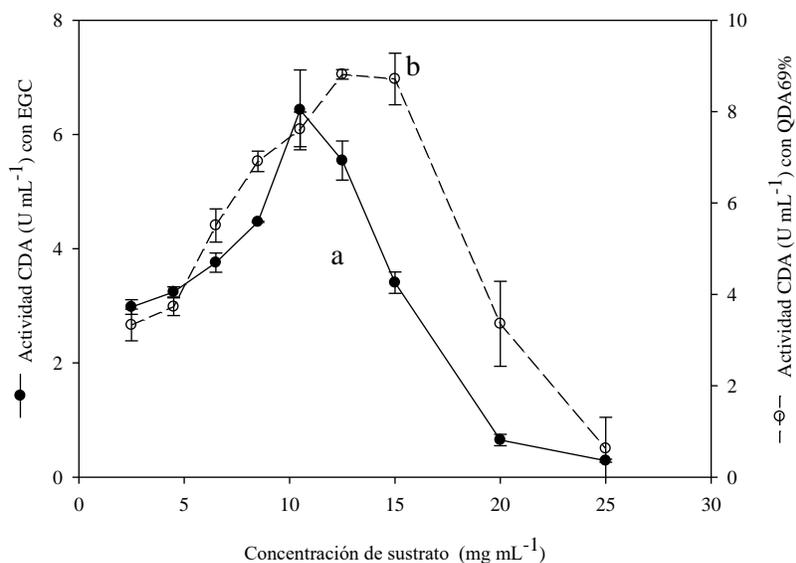


Figura 3.5. Efecto de la concentración de sustrato en la actividad CDA utilizando diferentes sustratos. Determinación de la concentración óptima de sustrato empelando etilenglicol quitina (EGC, círculo sólido). Determinación de la concentración óptima de sustrato quitosano reacetilado con un DA=69 % (QDA69%, círculo vacío).

### 3.3.3 Actividad CDA sobre diferentes sustratos

La actividad de la CDA de *C. gloeosporioides* fue evaluada sobre cuatro sustratos diferentes: dos quitosanos reacetilados con un DA=57 % y 69 %, ácido hialurónico comercial (H.T.M) y una quitina tratada previamente con expansión rápida con freón (presión=40 bar y T=180 °C) más fibrilación con un  $F_A=0.73$ , (Villa et al., 2016). La quitina primeramente se trató en baño de hielo en un sonicador vibra cell<sup>TM</sup> por 10 min en el amortiguador de citratos/HCl pH 3, con la finalidad de obtener una suspensión. Las reacciones se llevaron a cabo con las mejores condiciones obtenidas para la enzima purificada, utilizando 0.15 U de enzima y 12.5 mg mL<sup>-1</sup> para todos los sustratos empleados, incubando a 37 °C por 30 min con agitación magnética suave.

Los espectros de <sup>1</sup>H RMN mostraron tener los protones característicos de cada sustrato utilizado y así se pudo calcular el %DA para las diferentes muestras (Anexo 4), los resultados muestran que la enzima presentó actividad desacetilasa significativa para los quitosanos reacetilados y la quitina pero no fue significativa para el ácido hialurónico comercial (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Caracterización de los productos de reacción: DA y peso molecular

Muestra	DA (%)		DDA (%)		Peso Molecular	
					(1×10 <sup>5</sup> g mol <sup>-1</sup> )	
	Antes de reacción		Después de reacción			
Quitosano reacetilado	69.78±0.02 <sup>a</sup>	30.2±0.02 <sup>a</sup>	3.96±3.92 <sup>a</sup>	32.10±1.86 <sup>b</sup>	67.9±0.02 <sup>b</sup>	1.73±2.87 <sup>b</sup>
Quitosano reacetilado	57.31±0.97 <sup>a</sup>	42.69±0.97 <sup>a</sup>	2.89±1.48 <sup>a</sup>	35.84±1.16 <sup>b</sup>	64.16±0.97 <sup>b</sup>	1.02±1.75 <sup>b</sup>
Ácido hialurónico comercial	49.60±0.70 <sup>a</sup>	50.40±0.70 <sup>a</sup>	20.47±4.18 <sup>a</sup>	48.97±0.14 <sup>a</sup>	51.03±0.14 <sup>a</sup>	ND
Quitina <sup>1</sup>	73±0.04 <sup>a</sup>	27±0.04 <sup>a</sup>	12.98±5.65 <sup>a</sup>	54.04±0.03 <sup>b</sup>	45.96±0.4 <sup>b</sup>	10.48±4.65 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Quitina tratada con expansión rápida con freón y fibrilación

Letras diferentes representan diferencia significativa, letras iguales no hay diferencia significativa (p<0.05)

ND: No determinado

La nula o poca actividad de la enzima sobre el ácido hialurónico puede deberse a la alta viscosidad que presentó este sustrato a la concentración de 12.5 mg mL<sup>-1</sup> en solución, (amortiguador de citratos, pH 3), por lo cual la disponibilidad del ácido hialurónico para la enzima como sustrato es reducida, en la actualidad no existe ningún reporte sobre la desacetilación de este sustrato pero problemas similares han sido reportados con diferentes sustratos donde se presentaron problemas de solubilidad como en el caso de la quitina pura lo que hace de estos sustratos no aptos para la enzima.

Para el caso de la quitina tratada químicamente, se obtuvo un DDA=45.96 % siendo significativamente diferente al inicial DDA=27 %, aumentando en un 19 % el DDA, siendo mayor a lo reportado por Cai et al., (2006), quienes lograron desacetilar una quitina obtenida de *A. niger* soluble en agua con quitosano obteniendo una disminución del 16 %, también presentan desacetilaciones del 3 % y 26 % para una quitina cristalina de camarón y una quitina comercial respectivamente, es importante mencionar que en este trabajo se

obtiene un DDA= 19 % empleando una concentración de enzima de 0.15 U y 12.5 mg mL<sup>-1</sup> de sustrato, mientras Cai et al., (2006), utilizan una mayor cantidad de enzima y menor cantidad de sustrato siendo estos de 12 U y 50 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Pacheco et al., (2013), reportan grados de acetilación para diferentes quitinas con un extracto crudo de *C. gloeosporioides*, obteniendo la mayor disminución del DA para una quitina desacetilada por microondas del 12 % y para hidrolizados de quitina del 24.6 %, con la diferencia del tiempo de reacción, ya que en este trabajo se presenta una disminución del 19 % en los primeros 30 min de reacción, mientras que la reacción presentada por Pacheco et al., (2013), sobre los sustratos mencionados anteriormente es de 12 h.

Con la finalidad de observar el comportamiento de la desacetilación y determinar la máxima actividad de la enzima sobre el mejor sustrato obtenido en este trabajo, se llevaron a cabo reacciones a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60, 120, 180 y 300 min) con el quitosano con DDA=30.2 %, obteniendo la máxima desacetilación estimada por Gompertz ( $P_{max}=68.59$  %), con un ajuste del modelo de  $R^2=99$  %. Los resultados se presentan en la Figura 3.6, donde se observa que la enzima comienza a desacetilar significativamente al sustrato en los primeros 30 min, sin lograr una diferencia significativa de los 30 a los 300 min, (Anexo 5), lo que represento una estimación de la velocidad de reacción por Gompertz ( $V_{max}=2.4$  % min<sup>-1</sup>), se presenta además el comportamiento del pH, el cual disminuye (3.07 a 2.39) debido a la liberación de ácido acético (Gao et al., 1995; Zhao et al., 2010; Pacheco et al., 2013) durante los primeros 30 min, manteniéndose constante hasta los 300 min de reacción lo que podría indicar que la enzima presenta inhibición de la actividad por el cambio de pH, ya que como se determinó anteriormente la enzima presentó menor actividad desacetilasa a pH 2, así mismo el peso molecular disminuye significativamente durante los primeros 30 min, Pacheco et al., (2013) presenta una disminución mayor en el peso molecular de los sustratos empelados que lo reportado en este trabajo, lo cual se debe a la acción de otras enzimas tales como las quitinas al emplear un extracto crudo, la estimación del %DA para los sustratos de este trabajo son similares a lo obtenido experimentalmente obteniendo para el QDA69%=33.17 % a los 300 min, quitina tratada previamente=41.63 % y 62.56% para QDA57 %, lo que afirma que la desacetilación y la disminución del peso molecular son a casusa de la CDA purificada de *C. gloeosporioides*.

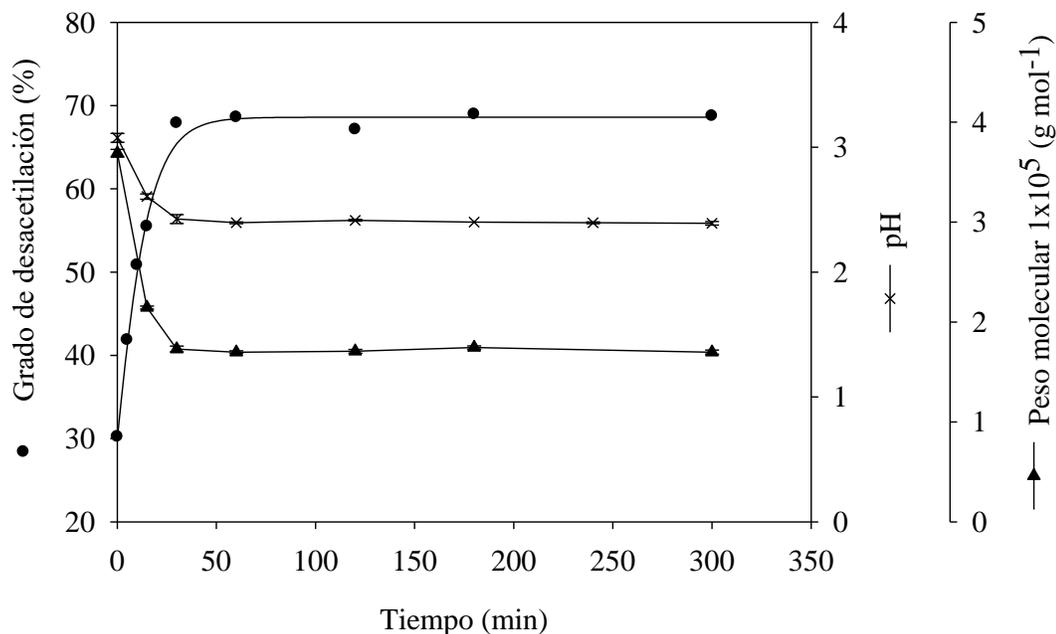


Figura 3.6. Actividad CDA sobre quitosano reacetilado con un DDA=30.2 % a diferentes tiempos de reacción. Grado de desacetilación del producto de reacción obtenido (círculo sólido), pH de la reacción (equis). Peso molecular del producto de reacción obtenido (triángulo sólido).

### 3.4 CONCLUSIÓN

La enzima quitina desacetilasa de *C. gloeosporioides* al ser purificada aumentó 8.9 veces su actividad con respecto al extracto crudo. La actividad de la enzima se determinó sobre diferentes sustratos, mostrando que tiene la capacidad de desacetilar una quitina tratada previamente y quitosanos reacetilados bajo las condiciones que resultaron ser las óptimas de pH, temperatura, relación enzima-sustrato y tiempo de reacción mostrando una diferencia con respecto al DA del sustrato inicial de 19 % y 37 % respectivamente. Los resultados indican que la enzima podría ser una alternativa para el proceso de desacetilación de quitosano, pudiendo así controlar las condiciones de reacción con la finalidad de obtener productos más reproducibles, además de tener condiciones de reacción más amigables con el medio ambiente, aunque cabe destacar que en el caso de la quitina actualmente nos enfrentamos al problema de la solubilidad y aunque la enzima no presenta la misma eficacia que los métodos químicos, podría ser un procedimiento complementario disminuyendo el tratamiento actualmente usado.

## CONCLUSIÓN GENERAL

Estos son los primeros estudios sobre la producción de quitinas desacetilasas de *C. gloeosporioides* en cultivo sumergido por lote alimentado con ácido abscísico añadido como inductor al sistema, lo que resulta de gran importancia debido a las aplicaciones biotecnológicas en las que podrían emplearse estas enzimas.

Los resultados de este estudio permiten conocer las condiciones óptimas de reacción de esta enzima y al presentar actividad sobre diferentes sustratos abre la posibilidad de su uso en el proceso de desacetilación de quitina y quitosano por método biológico.

Además de brindar conocimiento sobre la función biológica de las CDA, en la interacción hongo-hospedero.

## PERSPECTIVAS

Producción y purificación de CDA a mayor escala para poder aplicarla a procesos de desacetilación.

Análisis del proteoma extracelular de *C. gloeosporioides* por medio de una electroforesis bidimensional, con la mejor condición obtenida, (con y sin ácido abscísico), con el fin de determinar las proteínas que son expresadas al añadir el inductor en el sistema de producción enzimática. Las proteínas expresadas podrían ser identificadas mediante técnicas como MALDI-TOF.

Realización de una cepa recombinante con la finalidad de sobre expresar los genes responsables de la producción de las quitinas desacetilasas de *C. gloeosporioides*.

## TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS

### PUBLICACIONES EN REVISTAS INDIZADAS

1. Angelica Ramos-Puebla, Carolina De Santiago, Stéphane Trombotto, Laurent David, Claudia Patricia Larralde-Corona, Keiko Shirai. Addition of abscisic acid increases the production of chitin deacetylase of *Colletotrichum gloeosporioides* in submerged culture. Process Biochemistry. DOI: 10.1016/j.probio.2016.05.003
2. Angelica Ramos-Puebla, Stéphane Trombotto, Laurent David, Claudia Patricia Larralde-Corona, Keiko Shirai. Purificación y caracterización de una CDA extracelular de *Colletotrichum gloeosporioides*. (En preparación)

### PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

#### INTERNACIONALES

1. A. Ramos-Puebla., C.P. Larralde-Corona., K. Shirai. Effect of abscisic acid addition to submerged culture on production of chitin deacetylase and chitin and chitosan from *Colletotrichum gloeosporioides*. 12<sup>th</sup> International Conference of the European Chitin Society. 13<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. August 30<sup>th</sup> to September 2<sup>nd</sup>, 2015. Münster, Germany

#### NACIONALES

1. Angelica-Ramos, Claudia Patricia Larralde-Corona, Laurent-David, Keiko Shirai. Effect of abscisic acid on spore germination of *Colletotrichum gloeosporioides* and chitin deacetylases production in submerged culture. 1<sup>st</sup> Biotechnology Word & 9<sup>o</sup> Encuentro Nacional de Biotecnología IPN. Tlaxcala, México. Del 13 al 16 octubre, 2014.

2. Ramos Puebla, A., David L., Larralde Corona C.P. Shirai K. Producción de CDAs por *Colletotrichum gloeosporioides*, en cultivo sumergido por lote alimentado. Tercer Simposium Christopher Augur: Perspectivas en Biotecnología. México, D.F. 28 de Marzo, 2014
  
3. Ramos-Puebla A., Larralde-Corona P., Shirai K. Efecto del pH sobre la producción de CDA producida por *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivo sumergido. XXXVI Encuentro Nacional de La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. (AMIDIQ). Cancún, Quintana Roo, México, del 5 al 8 de mayo, 2015

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Alfonso C., Nuero O., Santamaría F., Reyes F. 1995. Purification of a Heat-Stable Chitin Deacetylase from *Aspergillus nidulans* and Its Role in Cell Wall Degradation. *Current Microbiology*. 30: 49-54.
2. Arakane Y., Dixit R., Begum K., Park Y., Specht C., Merzendorfer H., Kramer K., Muthukrishnan S., Beeman R. 2009. Analysis of functions of the chitin deacetylase gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39:355-365.
3. Araki Y. and Ito E. 1975. A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii* Enzymatic Deacetylation of Chitin. *European Journal of Biochemistry*. 55: 71-78.
4. Atkinson, B. 2008. Reactores bioquímicos. Editorial Reverté. Barcelona. pp. 26- 30.
5. Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J. and Healy, M. 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 80(2):145-150.
6. Bénéitez R, Ibarz A, Pagan J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Biológica*. 42(2):227-236.
7. Bisswanger H. 2008. Enzyme Kinetics Principles and Methods. Editorial Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (Alemania). pp: 51-159.
8. Blair, D., Hekmat, O., Schuttelkopf, A., Shrestha, B., Tokuyasu, K., Withers, S., Van, A.D., 2006. Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochem*. 45, 9416-9426.
9. Cai J., Yang J., Du Y., Fan L., Qiu Y., Li J., Kennedy J. 2006. Enzymatic preparation of chitosan from waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydrate Polymers*. 64:151-157.
10. Cascino, J.J., Harris, R.F., Smith, C.S., Andrews, J.H., 1990. Spore yield and microcycle conidiation of *Colletotrichum gloeosporioides* in liquid culture. *Appl. Environ. Microbiol*. 56, 8, 2.303- 2.310.
11. Chang B., Tsai G., Lee J., Fu W. 1997. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*. 303(3):327-332

12. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B., Guha A., 2008. Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *Int. Journal Biological Macromolecules*. 42:120-126.
13. Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B., Guha, A., 2009. Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. *Microbiology. Res.* 164, 347-35.
14. Christodoulidou A, Bouriotis V., Thireos G. 1996. Two Sporulation-specific Chitin Deacetylase-encoding Genes Are required for the Ascospore Wall Rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(49): 31420-31425.
15. Cleland, C.F., Tanaka, O., 1982. Influence of plant growth substances and salicylic acid on flowering and growth in the Lemnaceae (Duckweeds). *Aquat Botany*. 13, 3-20.
16. Dahiya N, Rupinder T, Singh-Hoondal G. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:773 – 782.
17. Davis L. and Bartnicki-García. 1984. The Co-ordination of Chitosan and Chitin Synthesis in *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology*. 130: 2095-2102.
18. De Santiago Carolina. 2011. Tesis de maestría. Estudio del efecto de la adición de inductores sobre la producción de CDAs de hongos fitopatógenos.
19. Deising H. and Siegrist J. 1995. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 127: 207-212.
20. Deshmukh A.J., Mehta B.T., Sabalpara A.N., Patil V.A. 2012. In vitro effect of various nitrogen, carbon sources and pH regimens on the grown and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. And Sacc causing anthracnose of Indian bean. *JBiopest*, 5 (supplementary): 46-49
21. Di Mario F., P. Rapanà, U. Tomati, E. Galli. 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 8–12

22. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 3, 350-356.
23. Einbu Aslak and Kjell M. Vårum. 2008. Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN. *Biomacromolecules.* 9:1870-1875.
24. El Gueddari N., Rauchhaus U., Moerschbacher B., Deising H. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Pathologist.* 156: 103-112.
25. Farzaneh Tajdini, Mohammad Ali Amini, Nastaran Nafissi-Varcheh, Mohammad Ali Faramarzi. 2010. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 180–183.
26. Galíndez, M.J. y Ruiz, O.N. 1994. *Bioingeniería: Fundamentos biocinéticos para el diseño de procesos fermentativos.* Editorial Instituto Politécnico de México. México. pp. 60-87
27. Gao L., Sun M., Liu X., Che Y. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycology Research.* 3: 87-92.
28. Gao X., Katsumoto T., Onodera, K., 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *Journal Biochemistry.* 117: (2), 257-263.
29. Ghomade, V., Kulkarni, S., Doiphode, N., Rajamohanan, P.R., Deshpande, M.V. 2010. Chitin deacetylase: a comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* A. Mendez –Vias Ed. Formatex.
30. Griffin, D. 1981. *Fungal physiology.* A while-interscience publication, USA, New York. 102-127:260-279
31. Guadalupe Villa-Lerma, Humberto González-Márquez, Miquel Gimeno, Stéphane Trombotto, Laurent David, Shinsuke Ifuku, Keiko Shirai. 2016. “Enzymatic hydrolysis of chitin pretreated by rapid depressurization from supercritical 1, 1, 1,

- 2-tetrafluoroethane toward highly acetylated. *Bioresource Technology* 209 (2016) 180–186
32. Gummadi, S.N. 2007. *Biochemical Engineering*. Editorial Prentice-Hall. pp. 50-140.
33. Hartung W. 2010. The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Functional Plant Biology* 37, 806–812.
34. Harvey, W.B. y Douglas, S.C. 1997. *Biochemical Engineering*. Editorial M. Dekker. pp. 157-164.
35. Hernández, P.A. 2003. *Microbiología industrial*. Editorial EUNED. Chile. pp. 36-61.
36. Heux L., Brugnerotto J., Desbrières J., Versali M.-F., Rinaudo M. 2000. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 1, 746-751.
37. Hirai A., Odani H., Nakajima A. 1991. Determination of degree of deacetylation of chitosan by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*. 26: 87-94.
38. Hwang, S., Kim, J., Kim, Y., Kim, H., 2008. ABA Increases susceptibility of pepper fruits to infection of anthracnose by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Pathol. J.* 24, 4, 400-406.
39. Iriti, M. y Faoro, F., 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiol. Biochem.* 46, 1106-1111.
40. Jeraj, N., Kunic, B., Lenasi, H., Breskvar, K. 2006. Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopusnigricans*. *Enzyme Microb Tech.* 39:1294-1299.
41. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of the United States America.* 90:2564-2568.
42. Kauss, H. and Bauch, B. 1988. Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods Enzymology.* 161:518-523.
43. Kim, K.D., Oh, B.J., Yang, J., 1999. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica, Heidelberg.* 27, 1, 1-10.

44. Kwon Y., Esptein L., Staples R. 1991. Cytoskeletal organization in *Uromyces urediospore* germings apices during appresorium formation. *Protoplasma*. 165:37-53.
45. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
46. López, A., García, G.M., Quintero, R.R., López-Munguía A., Canales, I. 2002. *Biología alimentaria*. Editorial Limusa. México. pp. 263-312.
47. Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. *Journal Biological Chemistry*. 193: 265-275.
48. Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H., Sharon, A., 2004. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3, 1852-1854.
49. Megia E.F, Carballal R.N., Quiñoá E., Riguera R., 2005. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by  $^1\text{H-NMR}$ . *Carbohydrate Polymers*. 61: 155-161.
50. Nahar P., Ghormade V., Deshpande M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 80–88.
51. Nicolella C., Van Loosdrecht M., Heijnen S. 2000. Particle-based biofilm reactor technology. *Trends in Biotechnology*. 18(7): 312-320.
52. Niederhofer A. & Müller B.W. 2004. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 57:101-105.
53. Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, S.G. 2003. *Bioreaction Engineering principles*. Segunda edición. New york. pp. 339-308.
54. Pacheco N. 2009. Extracción biotecnológica de quitina para obtención de quitosanos: Caracterización y aplicación. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana

55. Pacheco N., Trombotto S., David L., Shirai K., 2013. Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate Polymers*. 96: 227-232.
56. Percot A., Viton C., Domard A. 2003. *Biomacromolecules* 4:1, 12-18.
57. Pérez Castro Libia María, Saquero María José, Beltrán Herrera Javier Dario. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum sp.* Como agente causal de la antracnosis en ñame *Discorea sp.* *Revista Colombiana de biotecnología*.1, 24-35.
58. Peterson, G. L. Determination of total protein *Methods in Enzymology*, 1983, 91, 95–121.
59. Prusky, D., McEvoy, J., Leverentz, R., Conway, W., 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology*. 91, 11, 1105-1113.
60. Ramirez-Coutiño, L., Espinosa-Marquez, J., Peter, M. G., Shirai, K., 2010. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. *Bioresource Technology*. 101, 9236-9240.
61. Rao, D.G. 2005. *Introduction to biochemical engineering*. Editorial Tata Mc Graw-Hill. India. pp. 97-128.
62. Robinson, M., Riov, J., Sharon, A., 1998. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 12, 5030-5032.
63. Sherestha B., Blondeau K., Stevens W.F., Hegarat F.L., 2004. Expression of chitin deacetylase form *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein expression and purification*. 38: 196-204.
64. Shi, X.Q., Li, B.Q., Qin, G.Z., Tian, S.P., 2011. Antifungal activity and possible mode of action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. *Plant Disease*. 95, 63-69.
65. Simionatto G.L. & Gomes C.E., 2006. Influence of some reactional parameters on the substitution degree of biopolymeric Schiff bases prepared form chitosan and salicylaldehyde. *Carbohydrate Polymers*, (Short communication). 65: 557– 561.

66. Synowiecki J. & Al-Khateeb N.A., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.*, 43:145–171.
67. Tokuyasu K., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi K., Mori Y. 1996. Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2–4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydrate Research*. 303:353-358.
68. Toprak, U., Baldwin, D., Erlandson, M., Gillott, C., Hou, X., Coutu, C., Hegedus, D.D. 2008. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology*. 17:573-585.
69. Torres A., Quintero J., Atehortua L., Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. 2011. *Rev. Colomb. Biotechnology*. Vol. XIII No. 1 Julio 2011 103-109
70. Trudel J. & Asselain A. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electroforesis. *Analytical Biochemistry*. 189:249-253.
71. Tsigos I. & Bouriotis V., 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of biological chemistry*. 270: (44), 26286-26291.
72. Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnology*. 18: 305-312.
73. Ulferts, S., Delventhal, R., Splivallo, R., Karlovsky, P., Schaffrath, U. 2015. Abscisic acid negatively interferes with basal defense of barley against *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology*, 15:7-19.
74. Vargas Walter A., Sanz Martín José M., Rech Gabriel E., Rivera Lina P., Benito Ernesto P, Díaz-Mínguez José M. Díaz, Thon Michael R., and Sukno Serenella A. 2012. Plant Defense Mechanisms Are Activated during biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotrichum graminicola* in Maize. *Plant Physiology*.158:1342–1358
75. Vargas, W.A., Sanz, J.M., Rech, G.E., Rivera, L.P., Benito, E.P., Díaz, J.M., Thon, M.R., Sukno, S.A., 2012. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in Maize. *Plant Physiol*. 158, 1342-1358.

76. Whitaker J. 1972. Principles of Enzymology for the Food Science. Editorial Marcel Dekker, INC. pp: 287-326.
77. Win N.N. and Stevens W.F. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. Appl. Microbiology Biotechnology. 57:334-341.
78. Wu T., Zivanovic S., Draughon F. A., Sams E. C. 2004. Chitin and chitosan, value added product from mushroom waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52:7905–7910.
79. Young-Ju K., Zhao Y., Oh K-T., Nguyen V.N, Park R.D., 2008. Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylases from a newly screened *Mortierella sp.* DY-52. J. Microbiology Biotechnology. 18(4):759-766.
80. Zeng, F., Dahhou, B., Goma, G. 2001. Reference model adaptative estimation applied to a continuous flow fermentation process. J. Chem. Technol. Biot. 76, 1124-1137
81. Zhang Y., Xue Ch., Xue Y., Gao R., Zhang X., 2005. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. Carbohydrate Research. 340:1914–1917.
82. Zhao Y., Park R., Muzzarelli R., 2010. Review: Chitin deacetylases: Properties and applications. Marine Drugs. 8: 24-46.

## ANEXOS

## 1. DETERMINACIÓN DE CDA.

## Curva estándar para la determinación de CDA

Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs absorbancia que se realizó usando como patrón glucosamina en concentraciones de 0.1 a 1  $\mu\text{g}$

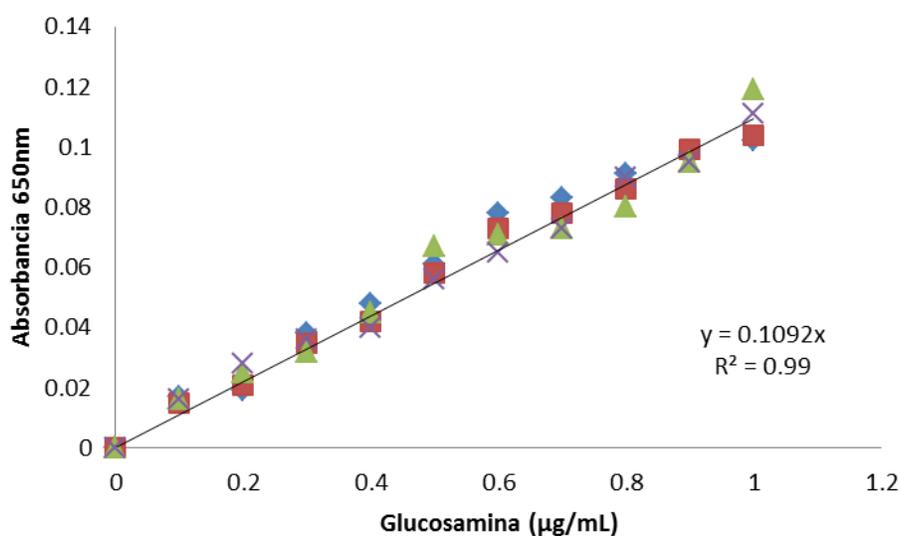


Figura 1.3. Curva estándar para la determinación de CDA

La determinación de CDA se realizó utilizando la ecuación de la recta que está dada por la curva patrón utilizada

Para la determinación de la actividad volumétrica se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad volumétrica} = \frac{(\mu\text{mol} / \text{mL})(PM)}{30 \text{ min}} [=] U / \text{mL}$$

**Preparación de etilenglicol quitina.****Reactivos:** Etilenglicol quitosanoBicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )Anhídrido acético ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ )

Mezclar por 24 h a 4 °C, 40 mg de etilenglicol quitosano con 400 mg de  $\text{NaHCO}_3$  más 4.5 mL de  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ .

Posteriormente adicionar 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$  y seguir mezclando por 24 h a 4 °C

Pasadas las 24 h se dializa con agua destilada hasta que el agua de cambio no tenga olor al  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$  y liofilizar

## 2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

### Reactivo Lowry modificado por Peterson (1977)

Solución 1: Se mezclan las soluciones a, b y c y se aforan a 1 L, se preservan en frío y antes de usar se calienta a 25-30 °C, hasta que observe que el SDS este en solución nuevamente.

A) Solución de carbonato de sodio/ tartrato de potasio (250 mL)

25 g de carbonato de sodio, ( $\text{NaHCO}_3$ )

0.25 g de sulfato de cobre penta-hidratado, ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

0.5 g de tartrato de sodio y potasio, ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )

B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS)

Se disuelven 25 g de SDS en 250 mL de agua destilada.

C) Solución de NaOH

Se disuelven 8 g de NaOH en 250 mL de agua destilada.

Solución 2: Se prepara diluyendo 1:1 del reactivo fenol Folin-Ciocalteu con agua destilada, se conserva en oscuridad, se prepara antes de su uso.

### Curva estándar para la determinación de proteína.

Los valores de absorbencia de las muestras se interpolaron para su cuantificación en la curva de calibración, concentración vs. Absorbancia que se realizó usando como patrón BSA en concentraciones de 100 a 1000  $\mu\text{g}$

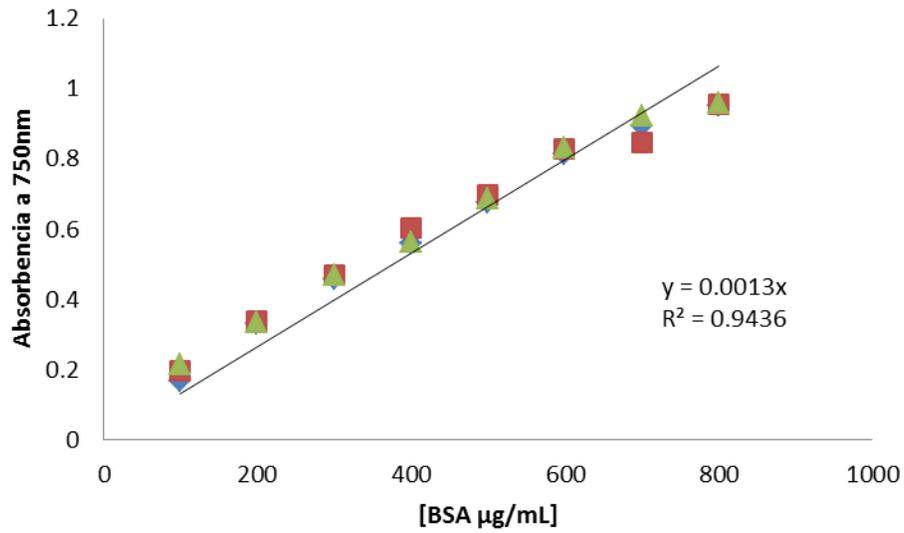


Figura 1.4. Curva estándar para la determinación de proteína

La determinación de proteína se realizó utilizando la ecuación de la recta que está dada por la curva patrón utilizada.

### 3. Actividad CDA a pH constante de 3.5 y 7

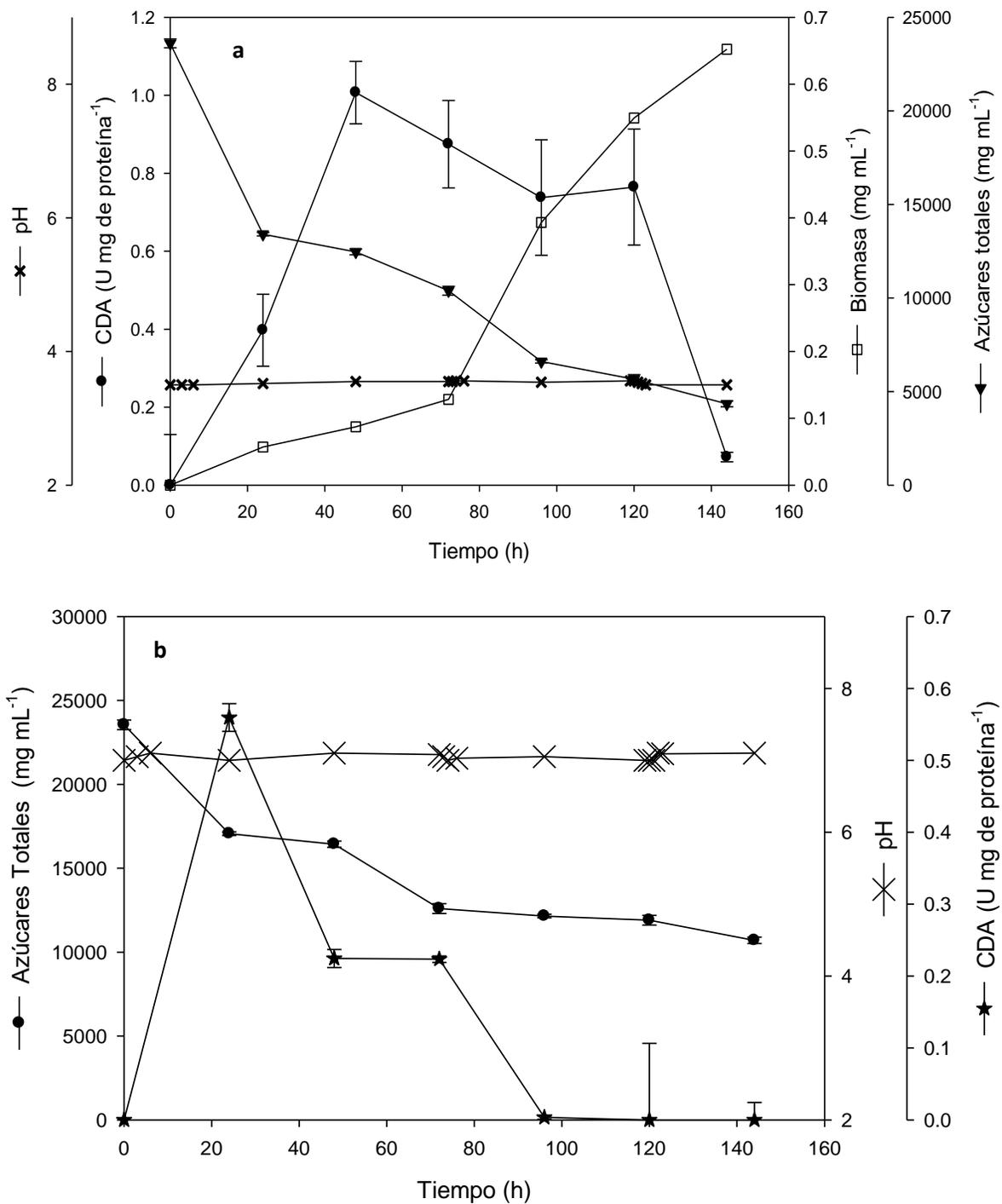


Figura 2.7. Cinéticas de producción de CDA de *C. gloeosporioides* manteniendo constante el pH del medio de cultivo. a) pH=3.5, b) pH=7.

#### 4. ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ( $^1\text{H}$ RMN) DE LOS DIFERENTES SUSTRATOS EMPLEADOS

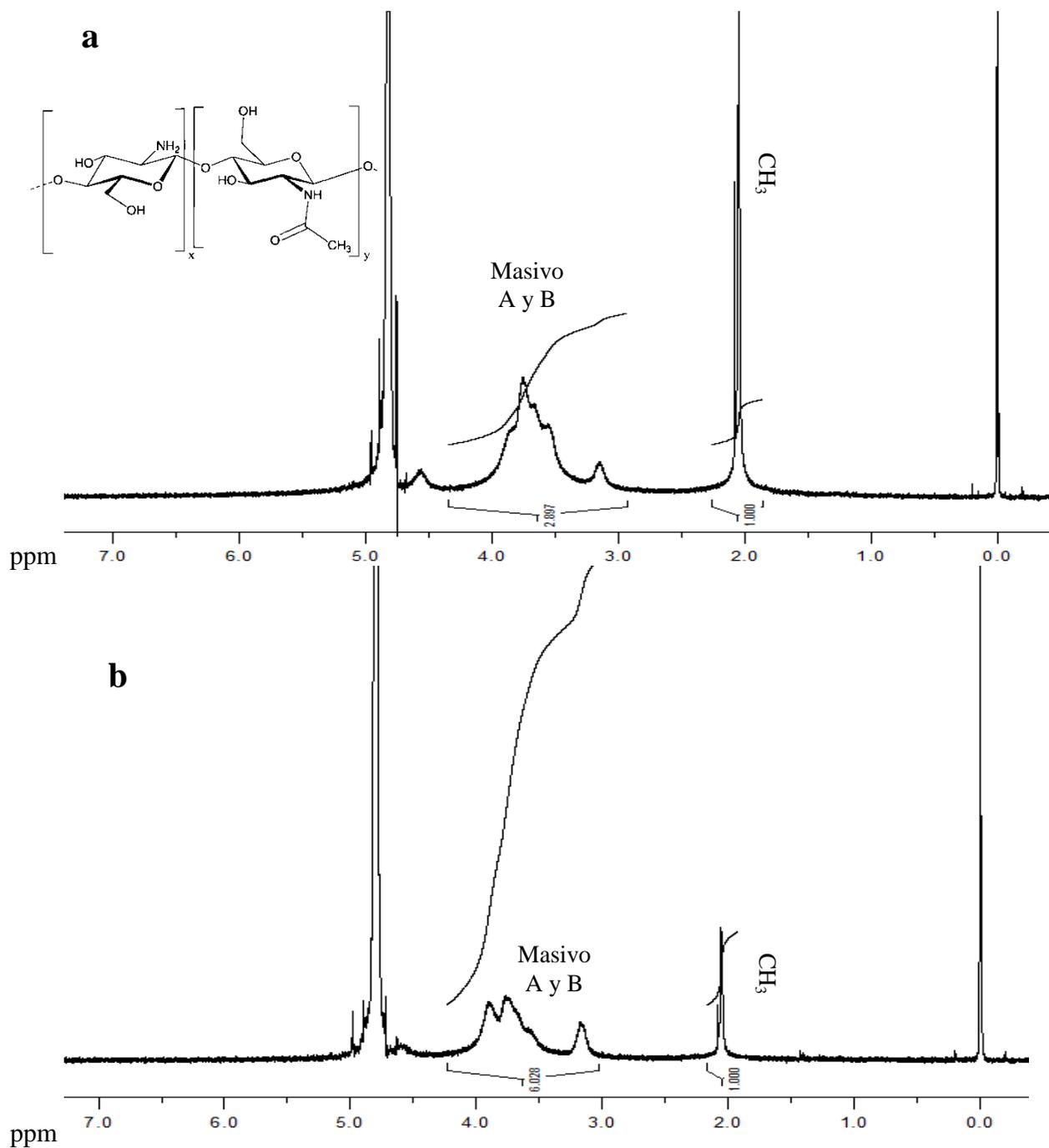


Figura 3.7. Espectro de quitosano reacetilado con DA=69 %, utilizado como sustrato para las reacciones con la enzima CDA (a); Producto de reacción obtenido a los 30 min. de reacción de la enzima CDA sobre quitosano (b), (DA=32 %)

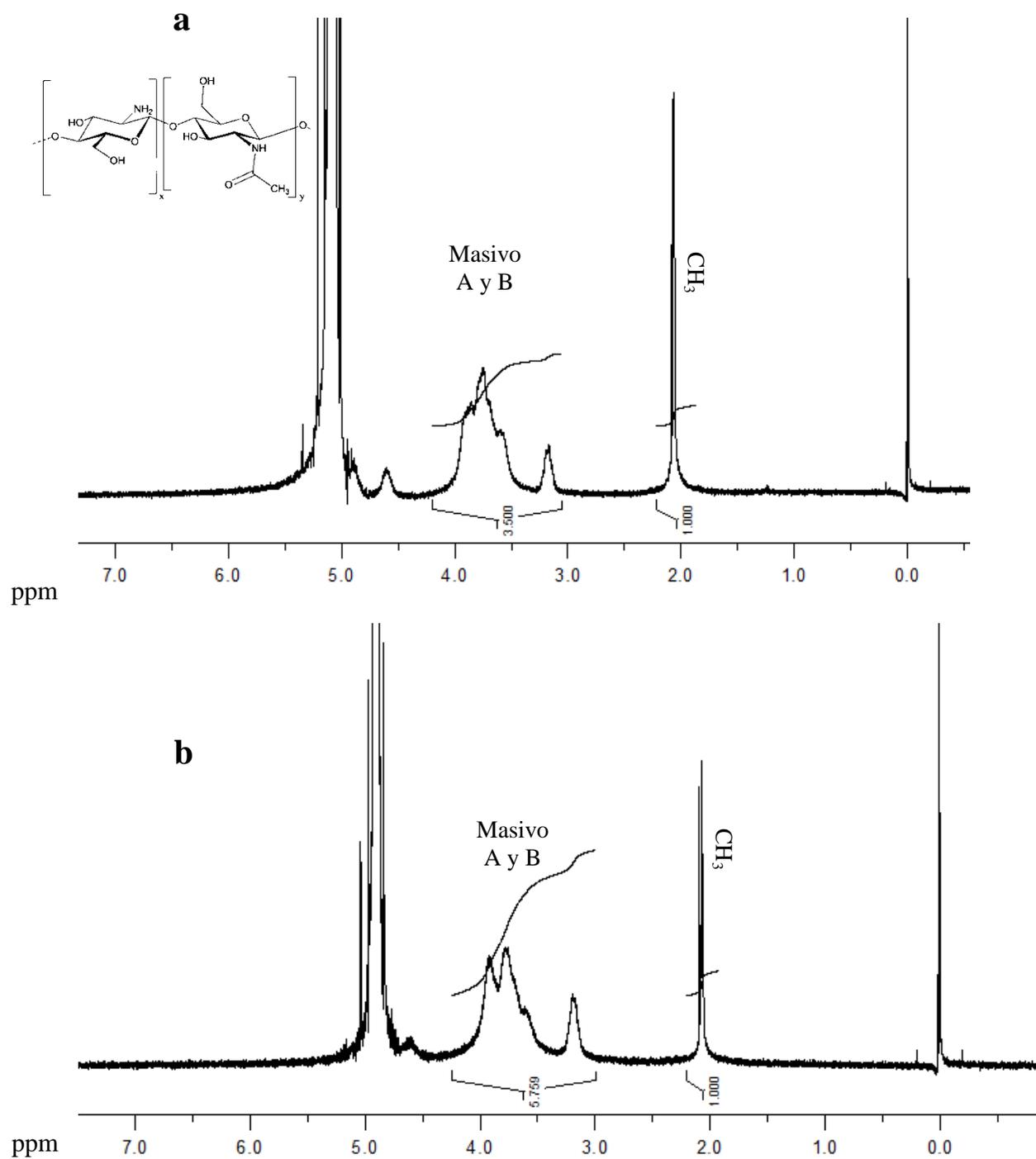


Figura 3.8. Espectro de quitosano reactilado con DA=57 %, utilizado como sustrato para la reacción enzimática (a); Producto de reacción obtenido a los 30 min de reacción de la enzima CDA sobre quitosano (b), (DA= 35 %)

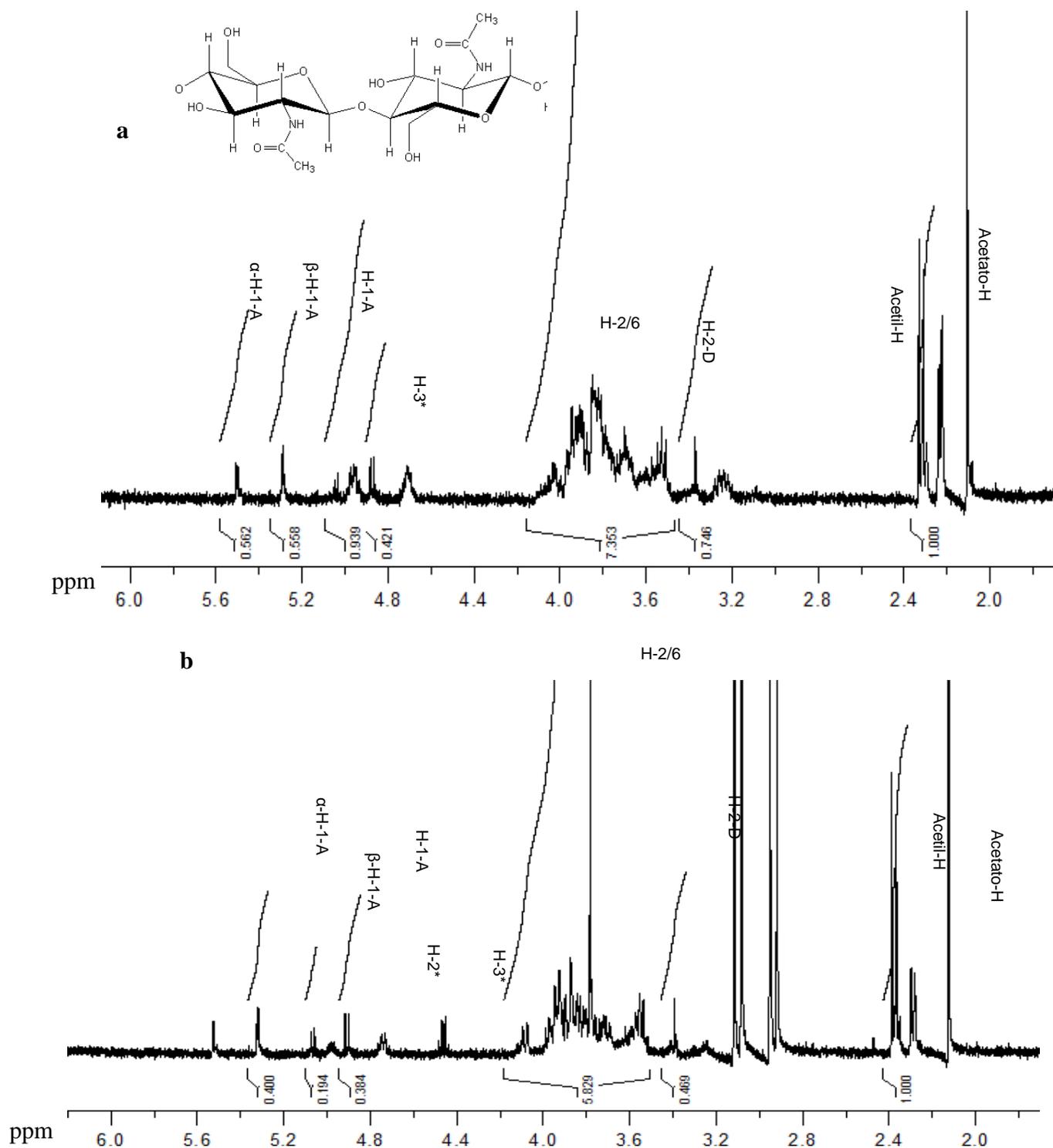


Figura 3.9. Espectro de quitina tratada con expansión rápida con freón y fibrilado con  $F_A = 0.73$ , utilizada como sustrato para la reacción enzimática (a); Producto de reacción obtenido a las 5 h de reacción de la enzima CDA sobre la quitina (b) ( $F_A = 0.54$ )

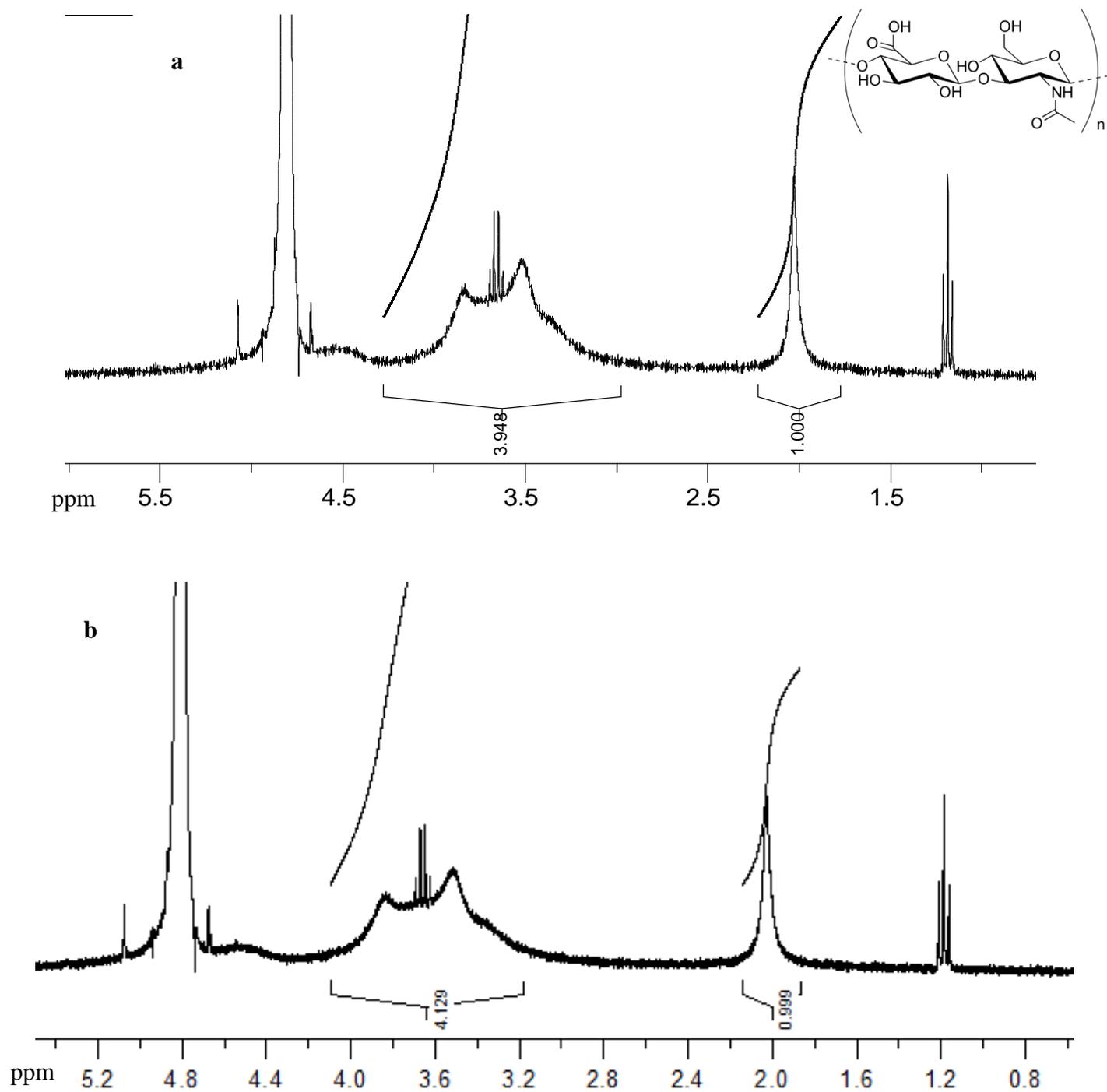
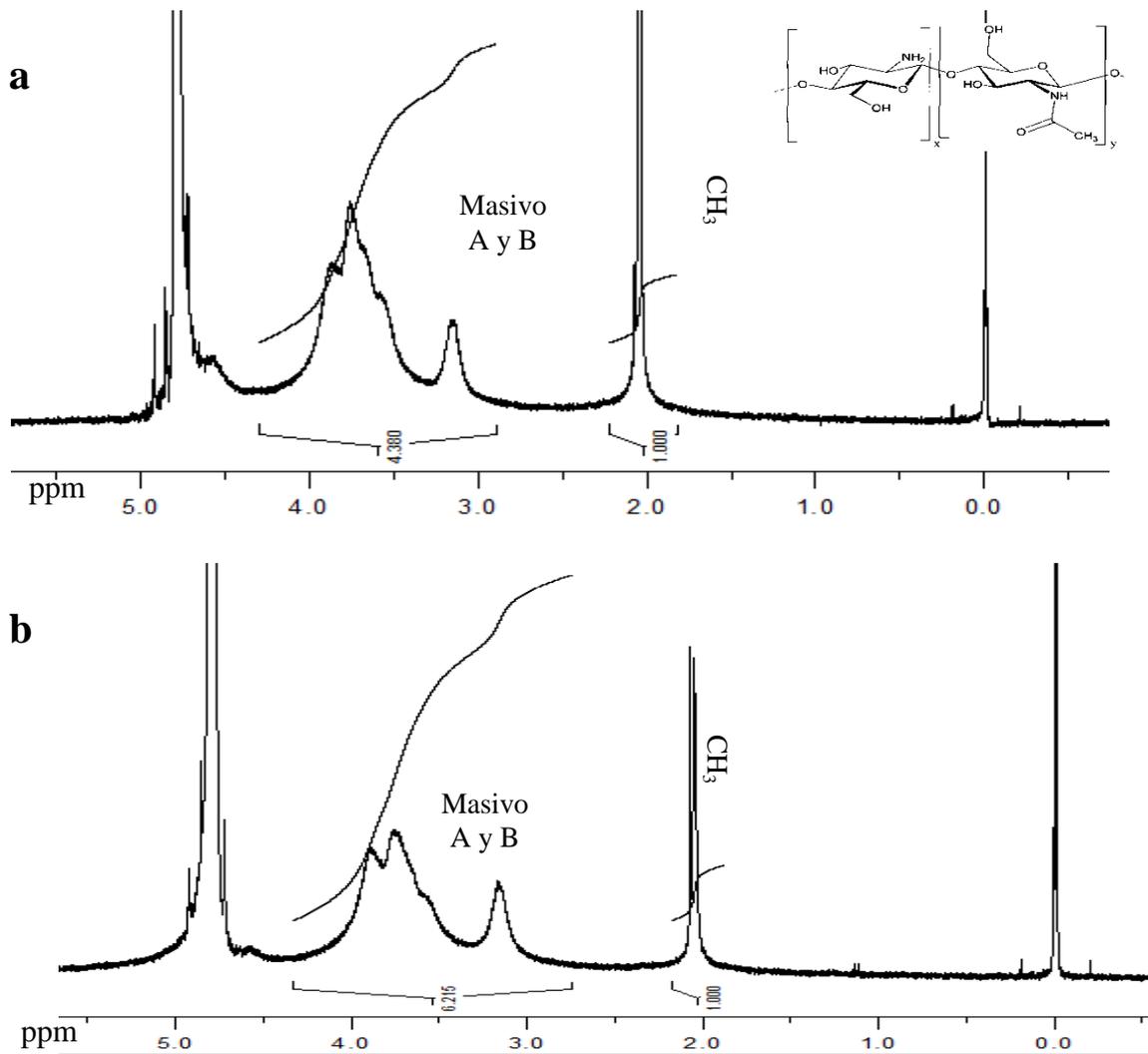


Figura 3.10. Espectro de ácido hialurónico comercial (H.T.M), utilizado como sustrato para la reacción enzimática con %DA=49.60 (a); Producto de reacción obtenido a los 30 min de reacción de la enzima CDA sobre el ácido hialurónico (%DA=48.97)

5. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ( $^1\text{H}$  RMN) A DIFERENTES TIEMPOS DE REACCIÓN, UTILIZANDO QUITOSANO REACETILADO CON DA= 69 % COMO SUSTRATO



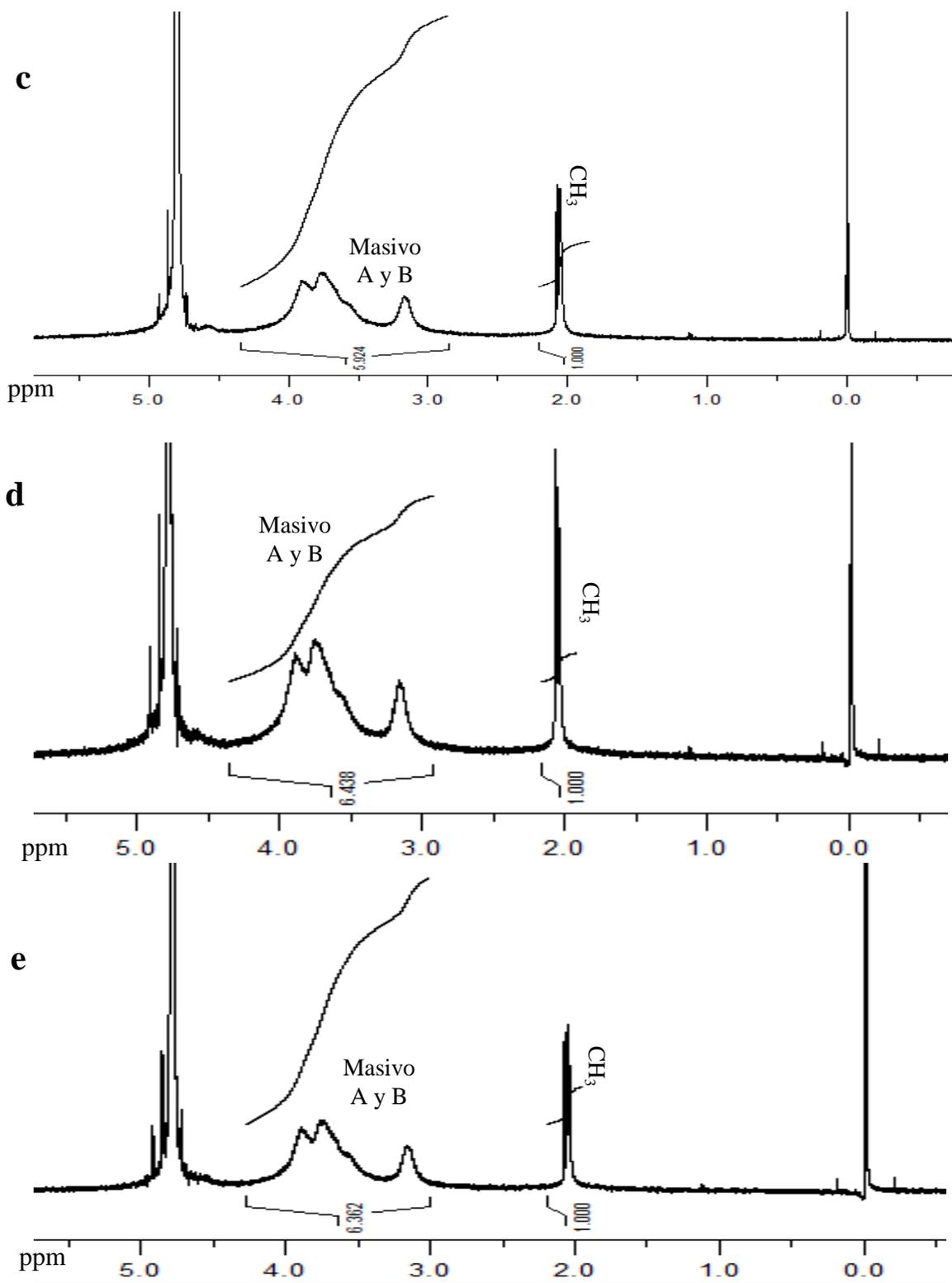


Figura 3.11. Espectros de los producto de reacción obtenidos a los diferentes tiempos de reacción: (a) 15 min, (b) 1 h, (c) 2 h, (d) 3 h, (e) 5 h, sobre quitosano reacetilado al 69 %, obteniendo diferentes grados de acetilación dependiendo del tiempo de reacción.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 1. Fuentes de nitrógeno controles

Response		CDA		Analysis of Variance Report			
<b>Tests of Assumptions Section</b>							
<b>Assumption</b>		<b>Test Value</b>		<b>Prob Level</b>		<b>Decision (0,05)</b>	
Skewness Normality of Residuals		-7,3795		0,000000		Reject	
Kurtosis Normality of Residuals		5,6131		0,000000		Reject	
Omnibus Normality of Residuals		85,9640		0,000000		Reject	
Modified-Levene Equal-Variance Test		4,3065		0,007214		Reject	
<b>Expected Mean Squares Section</b>							
<b>Source</b>		<b>DF</b>	<b>Term Fixed?</b>	<b>Denominator Term</b>		<b>Expected Mean Square</b>	
A: CONTROLES		3	Yes	S(A)		S+sA	
S(A)		80	No			S(A)	
Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.							
<b>Analysis of Variance Table</b>							
<b>Source</b>		<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
			(Alpha=0,05)				
A: CONTROLES		3	20,54584	6,848614	3,88	0,012074*	0,807274
S(A)		80	141,1747	1,764683			
Total (Adjusted)		83	161,7205				
Total		84					
* Term significant at alpha=0,05							
Response		CDA		<b>Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks</b>			
<b>Hypotheses</b>							
H0: All medians are equal.							
Ha: At least two medians are different.							
<b>Test Results</b>							
<b>Method</b>		<b>DF</b>		<b>Chi-Square (H)</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Decision(0,05)</b>	
Not Corrected for Ties		3		10,94962	0,012001	Reject H0	
Corrected for Ties		3		11,00298	0,011710	Reject H0	
Number Sets of Ties		16					
Multiplicity Factor		2874					
<b>Group Detail</b>							
<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Sum of Ranks</b>		<b>Mean Rank</b>	<b>Z-Value</b>	<b>Median</b>	
SAC+(NH4)2SO4	21	802,50		38,21	-0,9297	0	
SAC+AG	21	673,00		32,05	-2,2674	0	
SAC+NaNO3	21	919,50		43,79	0,2789	0,08	
SAC+UREA	21	1175,00		55,95	2,9182	0,34	
<b>Means and Effects Section</b>							
<b>Term</b>		<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Standard Error</b>		<b>Effect</b>	

All	84	-0,2253571		-0,2253571
A: CONTROLES				
SAC+(NH4)2SO4	21	-1,044762	0,2898836	-0,8194048
SAC+AG	21	-0,1771429	0,2898836	4,821429E-02
SAC+NaNO3	21	0,1	0,2898836	0,3253571
SAC+UREA	21	0,2204762	0,2898836	0,4458333

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CDA

Term A: CONTROLES

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=80 MSE=1,764683 Critical Value=3,7107

Group	Count	Mean	Different From Groups
SAC+(NH4)2SO4	21	-1,044762	SAC+AG, SAC+NaNO3, SAC+UREA
SAC+AG	21	-0,1771429	SAC+(NH4)2SO4
SAC+NaNO3	21	0,1	SAC+(NH4)2SO4
SAC+UREA	21	0,2204762	SAC+(NH4)2SO4

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 2. FUENTES DE NITRÓGENO CON HOJA DE LIMÓN

### Analysis of Variance Report

Response CDAX

#### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-5,8901	0,000000	Reject
Kurtosis Normality of Residuals	4,3357	0,000015	Reject
Omnibus Normality of Residuals	53,4922	0,000000	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	3,4790	0,019699	Reject

#### Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: MUESTRA_HL	S(A)	3	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		80	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

#### Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0,05)							
A: MUESTRA_HL		3	4,558305	1,519435	2,84	0,043230*	0,660544
S(A)		80	42,8416	0,53552			
Total (Adjusted)		83	47,39991				
Total		84					

\* Term significant at alpha=0,05

#### Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

##### Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

##### Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	3	2,061465	0,559748	Accept H0
Corrected for Ties	3	2,067493	0,558517	Accept H0
Number Sets of Ties	3			
Multiplicity Factor	1728			

##### Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
SAC+(NH4)2SO4+HL	21	884,50	42,12	-0,0826	0,3158639
SAC+AG+HL	21	926,50	44,12	0,3512	0,2057047
SAC+NaNO3+HL	21	769,50	36,64	-1,2706	0,2374083
SAC+UREA+HL	21	989,50	47,12	1,0020	0,2485356

##### Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	84	6,257672E-02		6,257672E-02

A: MUESTRA_HL				
SAC+(NH4)2SO4+HL	21	-0,2649285	0,1596902	-0,3275052
SAC+AG+HL	21	0,268459	0,1596902	0,2058823
SAC+NaNO3+HL	21	-4,984416E-02	0,1596902	-0,1124209
SAC+UREA+HL	21	0,2966206	0,1596902	0,2340439

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: CDAX

Term A: MUESTRA\_HL

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=80 MSE=0,53552 Critical Value=3,7107

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
SAC+(NH4)2SO4+HL	21	-0,2649285	
SAC+NaNO3+HL	21	-4,984416E-02	
SAC+AG+HL	21	0,268459	
SAC+UREA+HL	21	0,2966206	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### 3. FUENTES DE NITRÓGENO CON HOJA DE LIMÓN POR TIEMPOS

#### Analysis of Variance Report

Response CDAX

#### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-3,2666	0,001089	Reject
Kurtosis Normality of Residuals	4,0068	0,000062	Reject
Omnibus Normality of Residuals	26,7252	0,000002	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	18,1927	0,000000	Reject

#### Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: TIEMPOx		6	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		77	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

#### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: TIEMPOx	6	24,69805	4,116342	13,96	0,000000*	1,000000
S(A)	77	22,70186	0,2948293			
Total (Adjusted)	83	47,39991				
Total	84					

\* Term significant at alpha=0,05

#### Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

##### Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

##### Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	6	59,16106	0,000000	Reject H0
Corrected for Ties	6	59,33408	0,000000	Reject H0

Number Sets of Ties

3

Multiplicity Factor

1728

##### Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
0	12	222,00	18,50	-3,6814	0
24	12	138,00	11,50	-4,7552	-0,9065478
48	12	397,00	33,08	-1,4445	0,2079685
72	12	862,00	71,83	4,4995	0,4477744
96	12	638,00	53,17	1,6362	0,2966135
120	12	707,00	58,92	2,5182	0,3650933
144	12	606,00	50,50	1,2271	0,2380483

##### Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	84	6,257672E-02		6,257672E-02
A: TIEMPOx				
0	12	0	0,1567454	-6,257672E-02
24	12	-1,170985	0,1567454	-1,233561
48	12	-0,0376252	0,1567454	-0,1002019
72	12	0,5574763	0,1567454	0,4948996
96	12	0,3180418	0,1567454	0,2554651
120	12	0,4286408	0,1567454	0,3660641
144	12	0,3424878	0,1567454	0,2799111

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CDAX

Term A: TIEMPOx

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=77 MSE=0,2948293 Critical Value=4,2818

Group	Count	Mean	Different From Groups
24	12	-1,170985	48, 0, 96, 144, 120, 72
48	12	-0,0376252	24
0	12	0	24
96	12	0,3180418	24
144	12	0,3424878	24
120	12	0,4286408	24
72	12	0,5574763	24

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

#### 4. FUENTES DE CARBONO CONTROLES

## Analysis of Variance Report

Response CDAxx

## Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-4,4339	0,000009	Reject
Kurtosis Normality of Residuals	2,8032	0,005061	Reject
Omnibus Normality of Residuals	27,5168	0,000001	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	0,1703	0,916175	Accept

## Expected Mean Squares Section

Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: MUESTRA	3	Yes	S(A)	S+sA
S(A)	80	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

## Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0,05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: MUESTRA	3	1,966156	0,6553853	3,46	0,020094*	0,756055
S(A)	80	15,14133	0,1892667			
Total (Adjusted)	83	17,10749				
Total	84					

\* Term significant at alpha=0,05

## Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

## Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

## Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	3	14,66475	0,002127	Reject H0
Corrected for Ties	3	14,73996	0,002053	Reject H0
Number Sets of Ties	12			
Multiplicity Factor	3024			

## Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
GLC+AG	21	1029,50	49,02	1,4152	0,12
GLC+UREA	21	691,50	32,93	-2,0763	0
SAC+AG	21	677,50	32,26	-2,2210	0
SAC+UREA	21	1171,50	55,79	2,8821	0,34

## Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	84	4,642857E-03		4,642857E-03
A: MUESTRA				
GLC+AG	21	6,952381E-02	9,493523E-02	6,488095E-02

GLC+UREA	21	-9,428571E-02	9,493523E-02	-9,892857E-02
SAC+AG	21	-0,1771429	9,493523E-02	-0,1817857
SAC+UREA	21	0,2204762	9,493523E-02	0,2158333

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**Response: CD<sub>Axx</sub>

Term A: MUESTRA

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=80 MSE=0,1892667 Critical Value=3,7107

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
SAC+AG	21	-0,1771429	SAC+UREA
GLC+UREA	21	-9,428571E-02	SAC+UREA
GLC+AG	21	6,952381E-02	
SAC+UREA	21	0,2204762	SAC+AG, GLC+UREA

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 5. INDUCTORES

## Analysis of Variance Report

Response CDAxxx

## Tests of Assumptions Section

Assumption	Test	Prob Value	Decision Level	(0,05)
Skewness Normality of Residuals		-12,2909	0,000000	Reject
Kurtosis Normality of Residuals		9,1887	0,000000	Reject
Omnibus Normality of Residuals		235,4997	0,000000	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test		23,8081	0,000000	Reject

## Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square	
A: INDUCTOR			5	Yes	S(A)	S+sA
S(A)	200		No		S(A)	

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

## Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: INDUCTOR			5	2,328075	0,4656151	1,89	0,097273 0,634917
S(A)	200		49,2228	0,246114			
Total (Adjusted)			205	51,55088			
Total	206						

\* Term significant at alpha=0,05

Response CDAxxx

## Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

## Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

## Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties		5	21,54423	0,000639 Reject H0
Corrected for Ties		5	22,5916	0,000404 Reject H0
Number Sets of Ties		12		
Multiplicity Factor		405270		

## Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median	
ABA	16	1846,00	115,38	0,8297	0,4204888	
AG3	40	5103,50	127,59	2,8469	0,0975	
GLUCOSAMINA	40	4118,00	102,95	102,95	-0,0650	0,053
HL	30	3287,50	109,58	0,6047	3,344903E-02	
IAA	40	2729,50	68,24	-4,1677	0	
NacGlc	40	4236,50	105,91	0,2851	6,446105E-02	

## Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect	
All	206	1,001919E-02			-2,474478E-02
A: INDUCTOR					
ABA	16	-0,3508081	0,1240247	-0,3260633	
AG3	40	0,06605	7,844011E-02	9,079478E-02	
GLUCOSAMINA	40	40	0,042125	7,844011E-02	6,686978E-02
HL	30	4,166941E-02		9,057483E-02	6,641418E-02
IAA	40	0,007875	7,844011E-02	3,261978E-02	
NacGlc	40	4,462002E-02		7,844011E-02	0,0693648

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CDAxxx

Term A: INDUCTOR

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=200 MSE=0,246114 Critical Value=1,9719

Group	Count	Mean	Different From Groups
ABA	16	-0,3508081	IAA, HL, GLUCOSAMINA, NacGlc, AG3
IAA	40	0,007875	ABA
HL	30	4,166941E-02	ABA
GLUCOSAMINA	40	40	0,042125 ABA
NacGlc	40	4,462002E-02	ABA
AG3	40	0,06605	ABA

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 6. MEDIO GAM Y GAM CON ABA

## Analysis of Variance Report

Response CDAxxxxx

## Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-1,2710	0,203743	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	0,8272	0,408122	Accept
Omnibus Normality of Residuals	2,2996	0,316700	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	0,0103	0,919686	Accept

## Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: MUESTRAx		1	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		42	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

## Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0,05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: MUESTRAx		1	1,755037	1,755037	8,89	0,004767*	0,829456
S(A)		42	8,296167	0,1975278			
Total (Adjusted)		43	10,0512				
Total		44					

\* Term significant at alpha=0,05

Response CDAxxxxx

## Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

## Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

## Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	1	4,673016	0,030640	Reject H0
Corrected for Ties	1	4,730691	0,029629	Reject H0
Number Sets of Ties	6			
Multiplicity Factor	1038			

## Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
GAM	21	380,50	18,12	-2,1617	0,12
GAM + ABA	23	609,50	26,50	2,1617	0,4841123

## Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	44	0,266631		0,2575435
A: MUESTRAx				
GAM	21	5,761905E-02	9,698498E-02	-0,1999245
GAM + ABA	23	0,457468	9,267236E-02	0,1999245

## Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CDAxxxxx

Term A: MUESTRAx

---

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=42 MSE=0,1975278 Critical Value=2,8540

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
GAM	21	5,761905E-02	GAM + ABA
GAM + ABA	23	0,457468	GAM

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 7. LOTES ALIMENTADOS

## Analysis of Variance Report

Response CDAxxxx

## Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-0,3917	0,695279	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	0,2470	0,804920	Accept
Omnibus Normality of Residuals	0,2144	0,898332	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	7,5236	0,008088	Reject

## Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: SISTEMA		1	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		58	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

## Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: SISTEMA	1	22,63744	22,63744	25,87	0,000004*	0,998820
S(A)	58	50,75057	0,8750099			
Total (Adjusted)	59	73,38802				
Total	60					

\* Term significant at alpha=0,05

Response CDAxxxx

## Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

## Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

## Test Results

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	1	17,46339	0,000029	Reject H0
Corrected for Ties	1	17,46339	0,000029	Reject H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

## Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
GAM+GAM	31	663,00	21,39	-4,1789	0,6531598
GAM+GAM+I	29	1167,00	40,24	4,1789	2,164502

## Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	60	1,332325		1,352811
A: SISTEMA				
GAM+GAM	31	0,73823	0,1680063	-0,6145814
GAM+GAM+I	29	1,967393	0,1737031	0,6145814

## Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CDAxxxx

Term A: SISTEMA

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=58 MSE=0,8750099 Critical Value=2,8309

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
GAM+GAM	31	0,73823	GAM+GAM+I
GAM+GAM+I	29	1,967393	GAM+GAM

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 8. REACCIONES CON QUITOSANO CON DA=69 %, A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE REACCIÓN

## Analysis of Variance Report

Response	CDA	Prob	Decision	
Tests of Assumptions Section	Test	Value	Level	(0,05)
<b>Assumption</b>				
Skewness Normality of Residuals		-1,5183	0,128948	Accept
Kurtosis Normality of Residuals		1,2228	0,221417	Accept
Omnibus Normality of Residuals		3,8003	0,149547	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test				

## Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: t_rxn		6	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		8	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

## Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
<b>Term</b>						
<b>(Alpha=0,05)</b>						
A: t_rxn	6	2519,713	419,9521	313,67	0,000000*	1,000000
S(A)	8	10,71072	1,33884			
Total (Adjusted)	14	2530,424				
Total	15					

\* Term significant at alpha=0,05

## Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

## Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

## Test Results

Method	Chi-Square	Prob	Level	Decision(0,05)
	DF	(H)		
Not Corrected for Ties	6	10,46667	0,006326	Reject H0
Corrected for Ties	6	10,46667	0,006326	Reject H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

## Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
0 2	29,00	14,50	2,2079	69,65	
15 2	25,00	12,50	1,5286	44,52	
30 3	22,00	7,33	-0,2887	32,98	
60 2	13,00	6,50	-0,5095	31,82	
120 2	16,00	8,00	0,0000	32,225	
180 2	5,00	2,50	-1,8683	31,05	
300 2	10,00	5,00	-1,0190	31,26	

## Means and Effects Section

Term	Count	Standard Mean	Error	Effect
All 15	38,49067		38,9469	
A: t_rxn				

0 2	69,65	0,8181808	30,70309
15 2	44,52	0,8181808	5,573095
30 3	32,10333	0,6680418	-6,843572
60 2	31,82	0,8181808	-7,126905
120 2	32,225	0,8181808	-6,721905
180 2	31,05	0,8181808	-7,896905
300 2	31,26	0,8181808	-7,686905

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: DA

Term A: t\_rxn

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=1,33884 Critical Value=5,3991

Group	Count	Different From Mean	Groups
180 2	31,05	15, 0	
300 2	31,26	15, 0	
60 2	31,82	15, 0	
30 3	32,10333	15, 0	
120 2	32,225	15, 0	
15 2	44,52	180, 300, 60, 30, 120, 0	
0 2	69,65	180, 300, 60, 30, 120, 15	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 9. REACCIÓN CON QUITOSANO CON DA=57 % A LOS 30 MIN DE REACCIÓN

### Analysis of Variance Report

Response %DA

#### Tests of Assumptions Section

Test	Prob	Decision
<b>Assumption</b>	<b>Value</b>	<b>Level (0,05)</b>
Skewness Normality of Residuals	0,0000	
Kurtosis Normality of Residuals		1,000000 Accept
Omnibus Normality of Residuals		
Modified-Levene Equal-Variance Test	2,7082	0,175179 Accept

#### Expected Mean Squares Section

Source	Term	Denominator	Expected
Term	DF	Fixed?	Term Mean Square
A: t_RNX	1	Yes	S(A) S+sA
S(A)	4	No	S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

#### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: t_RNX	1	678,4067	678,4067	989,46	0,000006*	1,000000
S(A)	4	2,742533	0,6856334			
Total (Adjusted)	5	681,1492				
Total	6					

\* Term significant at alpha=0,05

#### Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks

##### Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Test Results	DF	Chi-Square (H) Level	Prob Decision(0,05)
Method			
Not Corrected for Ties	1	3,857143	0,049535 Reject H0
Corrected for Ties	1	3,970588	0,046302 Reject H0

Number Sets of Ties 1  
 Multiplicity Factor 6

#### Group Detail

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
0	3	15,00	5,00	1,9640	57
30	3	6,00 2,00	-1,9640	35,92	

#### Means and Effects Section

Term	Count	Standard Mean	Error	Effect
All	6	46,47		46,47
A: t_RNX				
0	3	57,10333	0,4780632	10,63333
30	3	35,83667	0,4780632	-10,63333

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: X\_DA

Term A: t\_RNX

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=0,6856334 Critical Value=3,9263

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
30	3	35,83667	0
0	3	57,10333	30

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## 10. REACCIÓN CON HA A LOS 30 MIN

### Analysis of Variance Report

Response DAXx

**Tests of Assumptions Section**

<b>Assumption</b>	<b>Test Value</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Decision (0,05)</b>
Skewness Normality of Residuals	0,0000		
Kurtosis Normality of Residuals		1,000000	Accept
Omnibus Normality of Residuals			
Modified-Levene Equal-Variance Test			

**Expected Mean Squares Section**

<b>Source</b>	<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>Term Fixed?</b>	<b>Denominator Term</b>	<b>Expected Mean Square</b>
A: tx		1	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		2	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

**Analysis of Variance Table**

<b>Source</b>	<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares (Alpha=0,05)</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
A: tx		1	0,4624	0,4624	13,19	0,068143	0,500642
S(A)		2	0,0701	0,03505			
Total (Adjusted)		3	0,5325				
Total		4					

\* Term significant at alpha=0,05

**Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks****Hypotheses**

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

**Test Results**

<b>Method</b>	<b>DF</b>	<b>Chi-Square (H)</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Decision(0,05)</b>
Not Corrected for Ties	1	2,4	0,121335	Accept H0
Corrected for Ties	1	2,4	0,121335	Accept H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

**Group Detail**

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Sum of Ranks</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Z-Value</b>	<b>Median</b>
0	2	7,00	3,50	1,5492	49,755
30	2	3,00	1,50	-1,5492	49,075

**Means and Effects Section**

<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Standard Error</b>	<b>Effect</b>
All	4	49,415		49,415
A: tx				
0	2	49,755	0,132382	0,34
30	2	49,075	0,132382	-0,34

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: DAXx

Term A: tx

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=2 MSE=0,03505 Critical Value=6,0849

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
30	2	49,075	
0	2	49,755	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

## **11. REACCIÓN CON QUITINA TRATADA CON EXPANSIÓN RÁPIDA CON FREÓN Y FIBRILADO A LOS 300 MIN DE REACCIÓN.**

### **Analysis of Variance Report**

Response DAX

**Tests of Assumptions Section**

<b>Assumption</b>	<b>Test Value</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Decision (0,05)</b>
Skewness Normality of Residuals	0,0000		
Kurtosis Normality of Residuals		1,000000	Accept
Omnibus Normality of Residuals			
Modified-Levene Equal-Variance Test			

**Expected Mean Squares Section**

<b>Source</b>	<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>Term Fixed?</b>	<b>Denominator Term</b>	<b>Expected Mean Square</b>
A: t		1	Yes	S(A)	S+sA
S(A)		2	No		S(A)

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

**Analysis of Variance Table**

<b>Source</b>	<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
			<b>(Alpha=0,05)</b>				
A: t		1	258,5664	258,5664	76,34	0,012848*	0,977010
S(A)		2	6,7744	3,3872			
Total (Adjusted)		3	265,3408				
Total		4					

\* Term significant at alpha=0,05

**Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks****Hypotheses**

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

**Test Results**

<b>Method</b>	<b>DF</b>	<b>Chi-Square (H)</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Decision(0,05)</b>
Not Corrected for Ties	1	2,4	0,021335	Reject H0
Corrected for Ties	1	2,4	0,021335	Reject H0
Number Sets of Ties	0			
Multiplicity Factor	0			

**Group Detail**

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Sum of Ranks</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Z-Value</b>	<b>Median</b>
0	2	7,00	3,50	1,5492	69,96
300	2	3,00	1,50	-1,5492	53,88

**Means and Effects Section**

<b>Term</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Standard Error</b>	<b>Effect</b>
All	4	61,92		61,92
A: t				
0	2	69,96	1,301384	8,04
300	2	53,88	1,301384	-8,04

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: DAX

Term A: t

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=2 MSE=3,3872 Critical Value=6,0849

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
300	2	53,88	0
0	2	69,96	300

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.