



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

“MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE QUITINA MEDIANTE MÉTODOS FÍSICOS Y QUÍMICOS PARA SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE QUITINASAS DE *Lecanicillium lecanii*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

M. en C. Alma Guadalupe Villa Lerma

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores:

Dr. Miquel Gimeno Seco

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Expresión Génica

México D.F. a 23 de Enero de 2015

México D.F. a 23 de Enero de 2015

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE QUITINA MEDIANTE MÉTODOS FÍSICOS Y QUÍMICOS PARA SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE QUITINASAS DE *Lecanicillium lecanii*”

Que presenta:

M. en C. Alma Guadalupe Villa Lerma

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros Planta Piloto 10.

Asesores de tesis:

Dr. Miquel Gimeno Seco

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Expresión Génica.

H. Jurado:

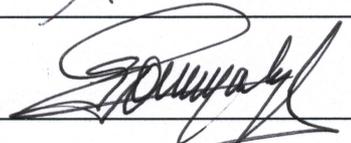
Presidente:

Miquel Gimeno Seco



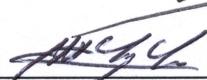
Secretario:

Humberto González Márquez



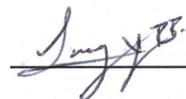
Vocal:

Alberto López Luna



Vocal:

Zaizy Rocha Pino



“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 financiamiento de la Secretaría de Ciencia, Innovación y Tecnología del Distrito Federal (PICSO12-152) y del FINNOVA/CONACYT No. 224962.

La caracterización de los oligosacáridos obtenidos con la hidrólisis enzimática de quitinas tratadas con expansión rápida de 1,1,1,2-tetrafluoroetano fue realizada en la Universidad de Lyon I (Lyon, Francia), bajo la asesoría del Prof. Dr. Laurent David gracias a la beca mixta otorgada por CONACYT a Alma Guadalupe Villa Lerma para realizar una estancia en dicha institución.

México D.F. a 23 de Enero de 2014

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE QUITINA MEDIANTE MÉTODOS FÍSICOS Y QUÍMICOS PARA SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA MEDIANTE QUITINASAS DE *Lecanicillium lecanii*”

Que presenta:

M. en C. Alma Guadalupe Villa Lerma

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros Planta Piloto 10.

Asesores de tesis:

Dr. Miquel Gimeno Seco

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Expresión Génica.

H. Jurado:

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por haberme dejado formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, por los consejos brindados, conocimientos transmitidos y por ayudarme en la preparación para la siguiente etapa profesional. Muchas gracias Doctora por apoyarme y motivarme en todo momento para sacar los mejores resultados en esta etapa.

Al Dr. Humberto González Marquez por la disposición a lo largo de todo el trabajo experimental y por los consejos tanto personales como laborales durante mi doctorado.

Al Dr. Miquel Gimeno por su ayuda en la dirección de este trabajo, por los conocimientos brindados y por apoyarme siempre que surgían dudas de su área.

Al Dr. Alberto López y a la Dra. Zaizy Rocha por las valiosas aportaciones a esta tesis y además por la amistad brindada.

A todos los integrantes y exintegrantes del laboratorio de biopolímeros por la ayuda que me brindaron en su momento cada quien, especialmente a Polo, Rut, Monse, Jimena y Facundo por las pláticas motivacionales y el apoyo moral, sobre todo por su sincera amistad.

DEDICATORIAS

A mi mamá Alma Rosa por su cariño y apoyo incondicional, por impulsarme siempre a ser una mejor persona y perseguir mis sueños, por la confianza y por enseñarme que los esfuerzos siempre tienen una recompensa.

A mi papá, el angel que me cuida desde el cielo, por ser el mejor ejemplo de superación y fortaleza, por enseñarme a nunca rendirme ante las circunstancias y por apoyarme en mis decisiones.

A mi hermana Eira Maridey por ser una de mis mejores amigas, por tu cariño y por todos los buenos y no tan buenos momentos que hemos compartido juntas, por que se que siempre tendre alguien en quien apoyarme y por darme el regalo de ser tia de los mejores niños, Sebastián y Elisa que son la alegría de nuestras vidas.

A mi esposo Rigoberto por tu cariño y comprensión. Gracias por apoyarme y estar ahí cuando más te he necesitado, por compartir una etapa más en mi vida, sin ti nada seria igual.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	4
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 Quitina y sus fuentes de obtención	7
1.2 Estructura de la quitina.....	8
1.3 Modificación estructural de la quitina	10
1.3.1 Steam explosion (explosión por vapor SE)	11
1.3.2 Ultrasonicación	12
1.3.3 Desacetilación	13
1.3.4 Preparación de quitina coloidal.....	14
1.3.5 Fluidos supercríticos (FSC)	15
1.4 Obtención de quitinolíigosacáridos (COS) por hidrólisis de quitina y quitosano 16	
1.4.1 Hidrólisis química.....	17
1.4.2 Hidrólisis enzimática	19
1.5 Mecanismo de acción de las quitinasas	21
1.6 Producción de quitinasas de fuentes diversas	23
1.6.1 Quitinasas fúngicas	23
1.6.2 Quitinasas bacterianas	25
1.6.3 Quitinasas en plantas	26
1.6.4 Quitinasas en insectos.....	26
1.7 Purificación de quitinasas.....	27

1.8	Efecto de los factores físicos y nutricionales en la fisiología de los hongos y la producción de enzimas	29
1.8.1	pH.....	29
1.8.2	Agitación y Aireación	30
1.8.3	Temperatura	30
1.8.4	Factores nutricionales.....	31
1.9	Aplicaciones y Análisis estructural de COS.....	32
1.9.1	Aplicaciones de los COS	32
1.9.2	Análisis estructural de COS	34
2	JUSTIFICACIÓN.....	37
3	HIPÓTESIS.....	39
4	OBJETIVOS.....	40
4.1	OBJETIVO GENERAL	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1	Producción de quitinasas de <i>Lecanicillium lecanii</i>	41
5.1.1	Microorganismo	41
5.1.2	Condiciones del cultivo sumergido	41
5.1.3	Evaluación del efecto de los factores nutricionales y el pH en la producción de quitinasas en cultivo sumergido	42
5.1.4	Preparación de Quitina coloidal.....	43
5.1.5	Obtención del extracto enzimático (E.C.E)	43
5.1.6	Análisis de los extractos enzimáticos	43
5.2	Purificación del extracto enzimático	46
7.2.1	Precipitación con sulfato de amonio	46

5.2.1	Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	47
5.3	Modificación de quitinas para hidrólisis enzimática.....	47
5.3.1	Ultrasonicación.....	47
5.3.2	Desacetilación heterogénea por el método FPT (freezing-degassing-thawing).....	47
5.3.3	Fibrilación de quitina.....	48
5.3.4	SE (Explosión por vapor).....	48
5.3.5	Expansión rápida de R134a supercrítico.....	50
5.4	Caracterización de quitinas modificadas estructuralmente.....	51
5.4.1	Grado de acetilación (DA).....	51
5.4.2	Índice de cristalinidad (I_{CR}).....	51
5.4.3	Tamaño de partícula.....	52
5.4.4	FTIR.....	52
5.4.5	Procesamiento de muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM) 52	
5.5	Condiciones de hidrólisis enzimática de quitinas modificadas.....	52
5.6	Producción de COS por vía química.....	53
5.7	Análisis del DP y F_A de los COS obtenidos por la hidrólisis de quitinas modificadas.....	53
5.7.1	MALDI-TOF.....	53
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
6.1	Efecto del medio de cultivo y la concentración de fuente de carbono en la producción de proteasas y quitinasas.....	55
6.2	Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	61
6.3	Purificación parcial de quitinasas.....	64

6.3.1	Precipitación con sulfato de amonio	64
6.3.2	Cromatografía de exclusión molecular	66
6.3.3	SDS-PAGE y Zimogramas.....	68
6.4	Caracterización de quitinas modificadas estructuralmente	70
6.4.1	Ultrasonificación	71
6.4.2	Desacetilación por FPT	73
6.4.3	Steam explosion (SE, explosión por vapor)	75
6.4.4	Expansión rápida de scR134a.....	84
6.4.5	Fibrilación de quitina.....	89
6.5	Hidrólisis enzimática de quitosanos y quitinas pretratadas por SE y sonicación	94
6.6	Determinación del DP de COS por MALDI-TOF	98
7	CONCLUSIONES	105
8	PERSPECTIVAS	106
9	TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES.....	108
9.1	TRABAJOS PRESENTADOS	108
9.2	ESTANCIAS.....	109
9.3	PUBLICACIONES.....	109
10	BIBLIOGRAFÍA.....	115
11	ANEXOS.....	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio Czpeck modificado	42
Tabla 2. Composición del medio Mineral.....	42
Tabla 3. Evaluación del efecto de la concentración de quitina y tiempo de residencia en SE.....	49
Tabla 4. Condiciones para la evaluación de la expansión rápida de scR134a.....	50
Tabla 5. Actividades específicas de enzimas quitinolíticas y proteasas a pH fijo y variable a sus tiempos máximos de producción	62
Tabla 6. DA e I _{CR} de quitinas desacetiladas por FPT	74
Tabla 7. DA de quitinas tratadas por SE	79
Tabla 8. Efecto de la temperatura de SE en el I _{CR} y DA de quitinas	83
Tabla 9. Caracterización de quitinas tratadas por expansión rápida de R134a	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Estructura de la quitina (b) Tipos de quitina (Seidl y col., 2008)	8
Figura 2. Ejemplos de COS: Oligómeros, Homólogos e Isómeros (Peter y Eberlin, 2010).	16
Figura 3. Hidrólisis de quitina mediante quitinasas (modificado de Seidl y col., 2008)	21
Figura 4. Mecanismo de catálisis propuesto para la mayoría de las quitinasas de la familia 18. A) Enzima en reposo, B) Unión del sustrato, C) (Tomado de Aalten y col., 2001).	23
Figura 5. Espectro de ¹ H-RMN de COS con DA 25% (Trombotto y col., 2008).	36
Figura 6. Reactor empleado en el pretratamiento de SE	49
Figura 9. Espectro FTIR de quitina ultrasonicada y Quitina purificada mostrando las bandas características del polímero de quitina.	73
Figura 10. Espectro FTIR de quitina purificada y quitinas desacetiladas por FPT con DA de 52, 23 y 4.86, presentando cambios en las bandas correspondientes a -NH..	75
Figura 11. Efecto del SE en el I _{CR} de quitina. A) I _{CR} de quitinas con respecto al tiempo y concentración. Símbolos 2g/mL (●), 0.4 g/mL (○), 0.2 g/mL (▲) y 0.1 g/mL (Δ). B) Difractograma de quitinas tratadas por SE.....	78
Figura 12. Espectro FTIR de quitina A) SE 0.1 g/mL 8 min y B) Acercamiento a las bandas con cambios.	80
Figura 13. Azúcares reductores presentes en licores obtenidos de SE empleando diferentes temperaturas (200, 220 y 240 °C).....	81
Figura 14. Espectro FTIR de CP y quitinas tratadas con SE a 180, 200, 220 y 240 °C.	84
Figura 15. Distribución de tamaño de partícula de quitinas tratadas por expansión rápida de scR134a	87
Figura 16. Espectros de FTIR de quitinas tratadas por descompresión de scR134a.	88
Figura 17. Difractogramas de CF7 (---) y CFN (---)	91
Figura 18. Espectro FTIR de CFN comparado con CP y CF7	91

Figura 19. Micrografías electrónicas de barrido: A) CF, B) CF7 y C) CFN	93
Figura 20. Cinética de hidrólisis enzimática A) Azúcares reductores, B) GlcNAc determinada por HPLC. Substratos: CP (◇), quitina ultrasonificada (△), SE 0.1 g/mL, 180 °C (○), SE 0.4 g/mL 5 min, 180 °C (●), quitosano DA 52 (◆), quitosano DA 23 (□) y quitosano DA 4.86 (■).....	97
Figura 21. Azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis enzimática de CP (◇), SE 0.1 g/mL, 180 °C (○) y CFN (▲).....	98
Figura 22. Espectro de MALDI-TOF de la hidrólisis de quitina SE 0.1 g/mL 8 min ..	101
Figura 23. Espectro de MALDI-TOF de la hidrólisis de quitina ultrasonificada.....	101
Figura 24. Espectro de MALDI-TOF de hidrólisis de quitosano DA52 por A) 24 h y B) 96 h	102
Figura 25. Espectro de MALDI-TOF de quitina CNF hidrolizada enzimáticamente..	103
Figura 26. Espectro de MALDI.TOF de quitina hidrolizada químicamente por acetólisis.....	103
Figura 27. Espectro de MALDI-TOF de COS comerciales marca KYTOLIFE.....	104

ABREVIATURAS

AR	Azúcares Reductores
CFN	Quitina tratada por fibrilación
COS	Quitinoligosacáridos
CP	Quitina purificada
DA	Grado de acetilación (por sus siglas en inglés Degree of Acetylation)
DP	Grado de polimerización (por sus siglas en inglés Degree of Polymerization)
ECE	Extracto crudo enzimático
Endo	Endoquitinasa
ESI	Nano electrospray
F_A	Fracción molar acetilada
FAB	Bombardeo rápido con átomos
FPT	Freezing-degassing-thawing
FSC	Fluidos supercriticos
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	<i>N</i> -Acetilglucosamina
H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón.
I_{CR}	Índice de cristalinidad
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo analizada por transformación de Fourier (en inglés Fourier transform infrared spectroscopy)
kDa	kilo Dalton
M	Marcador de masa molecular para electroforesis
m/z	Relación masa/carga de los iones en espectrometría de masas
MALDI-TOF	Espectrometría de masas con ionización-desorción asistida por láser, evaluando el tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés mass: assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry)
MS	Espectrometría de masas
Nhasa	N-acetilhexosaminidasa

NO	Óxido nítrico
PDA	Agar papa dextrosa
pNAG	<i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -acetilglucosamina
PP	Precipitado con sulfato de amonio
Prot	Proteasas
QMC	Medio Czapeck (la terminación 10 y 30 representa la cantidad de quitina coloidal aplicada)
QMM	Medio Mineral (la terminación 10 y 30 representa la cantidad de quitina coloidal aplicada)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida empleando dodecil sulfato de Sodio
SE	Steam explosión (explosión por vapor)
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (por sus siglas en inglés size exclusion chromatography)
SEM	Microscopia electrónica de barrido

RESUMEN

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, se encuentra como un componente estructural del exoesqueleto de crustáceos e insectos y en las paredes celulares de algunos hongos y levaduras. Se utiliza, como materia prima, para la producción de compuestos derivados, tales como el quitosano y oligosacáridos, así como para la obtención de *N*-acetil glucosamina y glucosamina, derivados que se pueden obtener por vías químicas o enzimáticas. En esta última, las quitinasas, que son glicosil hidrolasas del enlace β -1-4, son capaces de convertir la quitina a quitinoligosacáridos; las producen una gama de microorganismos amplia, dentro de los que destacan los hongos entomopatógenos, donde actúan sinérgicamente con proteasas y lipasas en el proceso de patogénesis de la infección, para degradar la cutícula de los insectos, además de estar implicadas en procesos como la germinación, crecimiento de las hifas, morfogénesis, nutrición y defensa contra competidores y pueden utilizarse como control biológico de insectos plaga. Los quitino-oligosacáridos son productos de alto valor agregado difíciles de obtener debido la alta cristalinidad y baja solubilidad de la quitina, además la hidrólisis química, que es el proceso mas común de obtención, tiene como consecuencia la desacetilación de los productos.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue producir oligosacáridos por hidrólisis enzimática, mediante quitinasas, de quitinas de *Lecanicillium lecanii* modificadas estructuralmente. Las quitinasas se obtuvieron en cultivo sumergido, se evaluaron los medios Mineral y Czapeck, se determinó el efecto en la producción enzimática de la fuente de carbono (quitina coloidal y cruda), así como del pH del cultivo. Los extractos enzimáticos se purificaron parcialmente mediante cromatografía de exclusión molecular. Por otra parte, se modificó estructural la quitina mediante ultrasonificación, tratamiento mecánico de trituración, desacetilación FPT (freezing-degassing-thawing), expansión rápida con 1,1,1,2 tetrafluoroetano (R134a) y steam explosion. Para esta última tecnología, se evaluó el efecto que tienen la temperatura y la presión en la modificación del polímero tratado. Por último, se analizó la

estructurade los productos obtenidos de la hidrólisis de los sustratos quitinosos, en cuanto a grado de polimerización y fracción molar acetilada.

La producción mayor, tanto de Endoquitinasa como de *N*-acetilhexosaminidasas, se presentó en el medio Czapeck con quitina coloidal como fuente de carbono (10 g/L) y modificando el pH durante el cultivo, las actividades obtenidas fueron de 2.26 y 0.029 U/mL para endoquitinasa y *N*-acetilhexosaminidasa respectivamente, los cultivos realizados a pH fijo mostraron actividades enzimáticas significativamente menores. Una vez purificados los extractos enzimáticos, se analizaron por electroforesis encontrando bandas de 50 y 37 kDa, que, según la bibliografía, pueden corresponder a enzimas quitinolíticas. Asimismo, la presencia de actividad, tanto Endoquitinasa como *N*-acetilhexosaminidasa, se corroboró, en la etapa de exclusión molecular, mediante zimogramas.

La modificación estructural de las quitinas mediante tratamiento de expansión rápida de R134a, combinado con la fibrilación, presentó la disminución en el índice de cristalinidad mayor (68.8%), sin llegar a reducir drásticamente la acetilación en comparación con la quitina pura la cual presentó un DA de 98.14%. En algunos de los tratamientos, como el de ultrasonicación, se detectaron azúcares reductores (0.02 mg/mL) y monómeros de *N*-acetilglucosamina (0.16mg/mL), desde tiempos iniciales, lo que sugiere que estos tratamientos podrían estar provocando la hidrólisis de la quitina. La temperatura y presión en este tratamiento parecen ser factores fundamentales que influyen directamente en las características finales de la quitina, es decir a temperaturas y presiones mayores, disminuye más el índice de cristalinidad (10%), pero también empieza a disminuir la acetilación (alrededor del 9%) esto, comparado con la quitina empleada como materia prima para este tratamiento.

Los sustratos quitinolíticos que presentaron mayor producción de quitinoligosacáridos fueron la quitina tratada por explosión de vapor y la quitina modificada por expansión de 1,1,1,2 tetrafluoroetano supercrítico combinado con la fibrilación, alcanzando una

producción de azúcares reductores de 0.37 y 0.18 mg/mL, respectivamente. Encontrando que el grado de polimerización fue de entre 2 y 5 en ambos casos y la F_A de 0.28 y 0.45 para el sustrato de steam explosión y fibrilación respectivamente en los quitinolígosacáridos tratados.

ABSTRACT

Chitin is one of the most abundant polysaccharides in nature; it occurs as a structural component of the exoskeleton of crustaceans and insects and in the cell walls of some fungi y yeasts. Chitin is used as raw material for the production of chitin derivatives such as chitosan and oligosaccharides, as well as for the production of *N*-acetylglucosamine and glucosamine, such derivatives can be obtained by enzymatic or chemical means. Enzymatic hydrolysis might be performed by chitinases, which are classified as glycosyl hydrolases of the β -1-4 bond able to convert the chitin to oligomers y monomers. These enzymes are produced by a wide range of microorganisms which include entomopathogenic fungi, where chitinases act synergistically with lipases and proteases in fungal pathogenesis processes for the degradation of the cuticle of the insect, as well as, being involved in processes such as germination, hyphal growth, morphogenesis, nutrition y protection against competitors. The chitinoligosaccharides are products of high added value that are difficult to obtain because of the high crystallinity and low solubility of chitin, besides chemical hydrolysis, which is the most common production process, results in deacetylatio of the final products.

The aim of this work was the production of oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of structurally modified chitin by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. Enzymes were produced in submerged culture by evaluating two culture media (Mineral y Czapeck), the effect of carbon source (raw y colloidal chitin), as well as evaluation of culture pH on the production of enzymes was determined. Crude enzyme was obtained and partially purified by size exclusion chromatography.

Several procedures were carried out for the structural modification of chitin, such as ultrasonication, mechanical grinding for fibrillation, FPT alkaline deacetylation, rapid expansion of R134a and steam explosion. The last method was evaluated varying temperature and pressure on the modification of the polymer. Finally we proceeded to

perform the structural analysis of the products obtained from the hydrolysis of chitinous substrates, in terms of polymerization degree and acetylated molar fraction.

The highest production of both Endochitinase y *N*-acetylhexosaminidases was obtained using Czapeck medium and colloidal chitin as carbon source (10 g/L) y varying the pH. The activities achieved were 2.26 and 0.029 U/mL to endochitinase and *N*-acetylhexosaminidase respectively, whereas cultures at fixed pH showed significantly lower enzymatic activities. Electrophoresis was carried out on purified enzyme showing bands at 50 y 37 kDa, which according to literature correspond to bands of chitinolytic enzymes. In addition, the presence of both endochitinase y *N*-acetylhexosaminidase activities in fractions collected from the size exclusion chromatography step were determined by zymograms.

Rapid expansion of supercritical R134a along with chitin nanofiber formation procedures produced a decrease in the crystallinity index reaching ca. 68.8% without affecting degree of acetylation compared to that obtained for purified chitin which presented a DA OF 98.14%. It is worth to mention that in some of the treatments such as ultrasonication, the presence of reducing sugars (0.02 mg/mL) and *N*-acetylglucosamine monomers (0.16mg/mL) were detected since the initial time, suggesting that such treatments could lead to chitin hydrolysis.

Noteworthy, steam explosion temperature and pressure are important factors directly influencing the final characteristics of the chitin, i.e. the higher the pressures and temperatures the higher the decline in crystallinity index, where 10% reduction was detected, but also acetylation degree begun to decline (about 9%) compared to the purified chitin used as raw material for this treatment.

The chitinolytic substrates showing the highest production of chitinoligosaccharides were those from chitins treated by steam explosion y rapid expansion of 1,1,1,2-tetrafluoroethane combined with fibrillation, reaching production of 0.37 y 0.18 mg/mL of reducing sugars, respectively. The oligosaccharides found in this samples

presented degrees of polymerization of 2 to 5 in both cases and F_A of 0.28 y 0.45 for steam exploded and chitin treated by fibrillation.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Quitina y sus fuentes de obtención

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, la producen muchos organismos como hongos, líquenes y artrópodos, así como insectos y crustáceos, siendo el componente mayoritario de los caparazones de estos últimos. La quitina se encuentra formando parte de estructuras como exoesqueletos, paredes celulares, cutículas, quistes, tubos, entre otros (Vasnev y col., 2006). Se encuentra presente en cantidades variables en los organismos desde trazas hasta el 40% del peso total del organismo. La proporción de quitina, con respecto al peso seco total del cuerpo, es más alta en los crustáceos que en otros animales, lo que hace que sea la fuente principal para su obtención (Romero y col., 1998). La producción natural de quitina es inagotable, los artrópodos, por si solos, cuentan con más de 106 especies, que constituyen una fuente de biomasa amplia y permanente (Abdou y col., 2007). La quitina comercial se extrae de desechos de crustáceos de la industria pesquera, las fuentes principales son los caparazones de jaiba, camarón y langosta; por otra parte, el calamar representa la principal fuente de obtención de β -quitina. En general, los caparazones de crustáceos se encuentran constituidos de una matriz de quitina, proteína y sales minerales, las cuales le confieren su dureza. La cantidad de cada uno de estos componentes varía ampliamente según la especie, la temporada y otros factores ambientales, así como la edad y género del organismo tratado, debido a que todos estos componentes presentan una amplia gama de aplicaciones y al valor agregado de dichos productos se han desarrollado metodologías para la extracción de los mismos.

La quitina en los animales se encuentra asociada a otros constituyentes, tales como lípidos, pigmentos, carbonato de calcio y proteínas. La quitina de los hongos presenta ventajas como una uniformidad mayor en su composición, disponibilidad y ausencia de sales en la matriz, sin embargo, se encuentra asociada con otros

polisacáridos como celulosa, glucano, manano y la poligalactosamina, lo que dificulta su purificación (Chandupai y col.,2004).

1.2 Estructura de la quitina

La quitina es un homopolisacárido lineal conformado de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y *D*-glucosamina (GlcN) con enlaces β -1-4 (Figura 1). Se considera un derivado de la celulosa, la diferencia entre ellas se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual para el caso de la quitina ha sido sustituido por el grupo acetamida (Parada y col., 2004). La presencia de grupos acetilo en la posición C2 produce puentes de hidrógeno tridimensionales, lo que generan una morfología de tipo apilado, cristalinidad alta y solubilidad en la quitina baja (Cho y col., 2000).

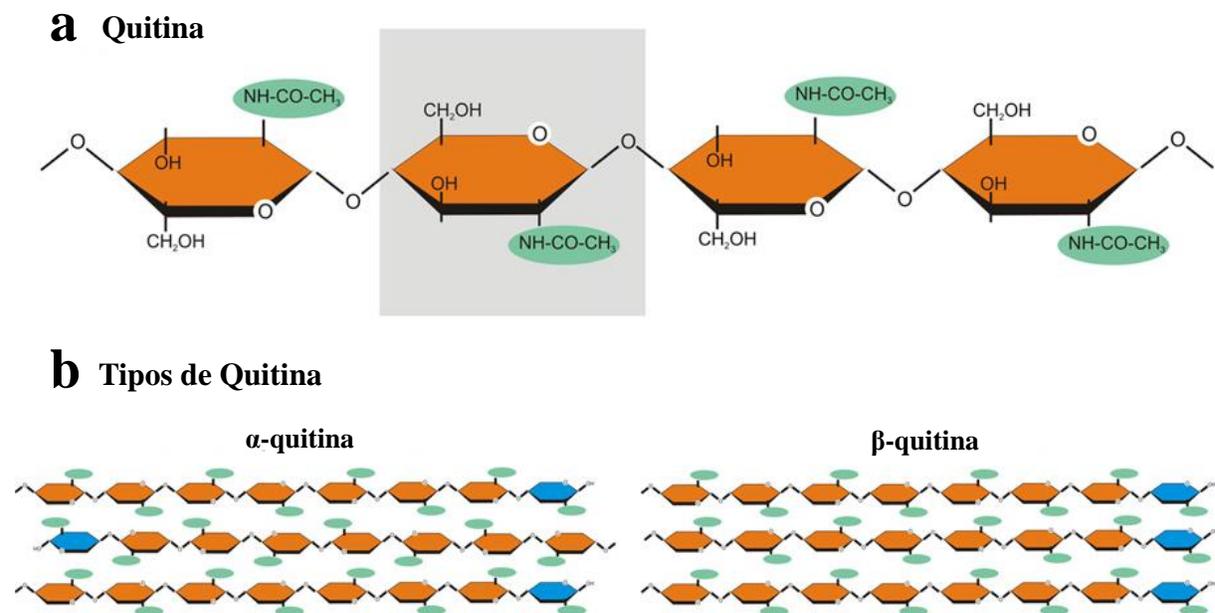


Figura 1. (a) Estructura de la quitina (b) Tipos de quitina (Seidl y col., 2008)

La abundancia de los grupos acetamida en la quitina y su tendencia a formar puentes de hidrogeno intra e intermoleculares, resultan en la formación de agregados lineales con un grado elevado de cristalinidad. Esto contribuye a la resistencia de las estructuras quitinosas y a su nula solubilidad en agua. Su estructura química influye

también en la masa molecular llegando a alcanzar hasta 10^6 Dalton (Prashanth y Tharanathan, 2007).

Los polímeros de quitina forman microfibrillas, también conocidas como cristalitos, de 3 nm de diámetro, estabilizados por enlaces de hidrogeno formados entre el grupo amino y carbonilo. Las microfibrillas de quitina en las matrices peritróficas puede exceder hasta 0.5 nm de longitud y, con frecuencia, asociarse formando conglomerados que contienen grupos paralelos de 10 o más microfibrillas solas (Lehane, 1997).

Mediante difracción de rayos X determinó que la quitina es polimorfa, que se presenta en tres variantes cristalográficas, α , β y γ -quitina, éstas se diferencian, principalmente, en su hidratación, orientación, número de cadenas de quitina y en el tamaño de la unidad (Beaney y col., 2005). Los análisis cristalográfico básico de α y β -quitina muestra que son aparentemente iguales, pero realizando un análisis más exhaustivo pueden diferenciarse en dos aspectos: i) un anillo de difracción intensa aparece a los 0.338 nm, reconocido como la huella de α -quitina, mientras que un anillo similar pero a los 0.324 nm se encuentra para el caso de la β -quitina ii) La β -quitina presenta un anillo interno a 0.918 nm que es sensible a hidratación, éste presenta un desfaseamiento de su posición original a 1.16 nm en la presencia de agua, mientras que la α -quitina presenta el mismo anillo sensible a hidratación, con la diferencia de que aparece a los 0.943 nm (Rinaudo, 2006).

La α -quitina se encuentra compactada fuertemente, con puentes de hidrógeno intralaminares, los cuales unen las cadenas dispuestas en forma antiparalela esto puede contribuir a ciertas propiedades fisicoquímicas, tales como a su fuerza mecánica y estabilidad. En contraste, la β -quitina presenta un arreglo más relajado e inconsistente, a causa de los puentes de hidrógeno débiles que se presentan en la estructura esto, debido a la disposición paralela en la que se encuentran las cadenas de la molécula, el grado de hidratación alto y la compactación reducida la vuelve más flexible cuando se encuentra en matrices peritróficas o capullos (Jung y Zhao, 2014).

Por último, para la γ -quitina se proponen algunos modelos en los que se presenta una orientación de dos cadenas paralelas y dos antiparalelas, aunque también se ha postulado que esta aloforma solo representa una variante de la familia α (Sagheer y col., 2009).

Estas diferencias estructurales tienen un impacto en sus propiedades fisicoquímicas, siendo la β -quitina la que presenta una mayor afinidad a los disolventes y es más reactiva. Además, la región cristalina de la α -quitina es mayor que la que se presenta en la β -quitina (Austin y col., 1989). La α -quitina es, por mucho, la más abundante; pudiéndose encontrar en paredes celulares de hongos y levaduras, exoesqueletos de camarón y langosta así como en cutículas de insectos, aunado a sus fuentes naturales de obtención también puede producirse por recristalización, biosíntesis in vitro o polimerización enzimática a diferencia de la β -quitina la cual no ha podido obtenerse, hasta el momento, por este tipo de métodos; las fuentes naturales en donde se encuentra son, principalmente, la pluma de calamar y, en casos menos frecuentes, en algunas diatomeas y protozoos.

1.3 Modificación estructural de la quitina

La quitina en estado puro es un material blanco, insoluble en agua, ácidos diluidos, álcalis concentrados y disolventes orgánicos; como se mencionó anteriormente, presenta una cristalinidad alta debido a su estructura y los puentes de hidrógeno que unen sus cadenas, lo que representa un reto cuando se busca realizar un proceso enzimático ya sea desacetilación o bien hidrólisis, por lo que se busca conseguir una estructura abierta y amorfa para mejorar el acceso de la enzima al sustrato, aumentando la superficie de contacto, esto se puede lograr realizando modificaciones estructurales a la quitina lo cual aumenta su solubilidad, ejemplo de esto es la obtención de glicol quitina (Beaney y col., 2007). Muchos estudios han revelado que los tratamientos químicos alteran las propiedades estructurales de la quitina debido a hinchamiento de la partícula, disociación de los puentes de hidrógeno y reacomodo de las cadenas poliméricas (Jung y Zhao, 2014). A

continuación se describen algunos métodos tanto físicos como químicos que podrían aplicarse a la quitina para su modificación:

1.3.1 Steam explosion (explosión por vapor SE)

Esta metodología se ha empleado ampliamente en el pre-tratamiento de la lignocelulosa como una alternativa a los tratamientos termo-mecánicos empleados, abriendo las fibras y haciendo el polímero más accesible para procesos subsecuentes tales como fermentación, hidrólisis, densificación, entre otros. Se basa en el empleo de vapor saturado a alta presión seguido de una descompresión rápida, lo que ocasiona una explosión interna del substrato, que conduce a un rompimiento mecánico del material, produciéndose, en el caso de los compuestos celulósicos, sustancias de masa molecular baja, que son más fáciles de accesar por las enzimas hidrolíticas (Sasaki et al., 2012).

Los factores que influyen en la SE son el tiempo de residencia, que van desde segundos hasta algunos minutos, la temperatura, que generalmente varía de los 160 a los 260 °C, entre otros factores como el tamaño de partícula del material a ser tratado y la humedad. Dependiendo de estos factores los resultados del proceso pueden ir desde la generación de pequeñas rupturas en la estructura del polímero hasta la completa desfibrilación de los componentes, encontrándose que, a temperaturas altas se genera una degradación de azúcares mayor (Alvira y col. 2010, Sun y Cheng, 2002).

Algunas de las ventajas que presenta la SE, ante otras tecnologías empleadas para el tratamiento de los materiales lignocelulósicos, es que se puede emplear sin usar agentes químicos, obteniéndose resultados favorables, se evitan etapas de manejo y reciclaje de residuos ácidos y, por último, la corrosión de los equipos es mínima debido a los pH empleados (Garrote y col., 1999).

A pesar de que la SE no requiere del uso de químicos, se ha demostrado que el empleo de agentes como el ácido nítrico y sulfúrico, en conjunto con el tratamiento de SE pueden acelerar el proceso y producir una hidrólisis mayor. Específicamente,

para la quitina se ha empleado SE en presencia de NaOH como una alternativa a los tratamientos convencionales de desacetilación en los que se emplean tiempos de reacción prolongados así como concentraciones altas de reactivos alcalinos, lo que conlleva a una degradación de la quitina. Focher y col. (1990) encontraron que, al realizar desacetilación alcalina al mismo tiempo que SE a las muestras de quitina, se obtenía un polímero prácticamente libre de grupos acetilados y mucho más rápido (30-270 s) que en los procesos de desacetilación convencionales.

1.3.2 Ultrasonicación

El principio en el que se basa este proceso es la generación de ondas de ultrasonido para hacer vibrar el material objetivo, conduciendo a la formación de radicales libres y la mejora de las tasas de reacción de los procesos a temperaturas ambiente. El desarrollo de una variedad de reacciones química generadas por la acción del ultrasonido están ligadas fuertemente con el efecto de cavitación, es decir los procesos químicos que se llevan a cabo solo ocurren cuando la intensidad del ultrasonido alcanza las condiciones para generar la cavitación, independientemente de su duración, si la intensidad no alcanza el umbral, no habrá una transformación en el material sometido (Gilca y col., 2014)

El efecto de cavitación se genera cuando la presión de la onda de sonido es lo suficientemente grande como para irrumpir en el líquido. Las implosiones de estas cavidades generan temperaturas y presiones de aproximadamente 5000 °K y 200 bar, debido a la compresión de la fase gaseosa dentro de la cavidad. Estas condiciones severas conducen a la producción de estados excitados, al rompimiento de enlaces y a la formación de radicales. En general, la potencia acústica que se transfiere no está disponible de manera uniforme en el medio de reacción, sólo en las zonas de proximidad inmediata, por lo que la mayoría de los radicales se forman en esta zona del reactor, posteriormente, estos radicales se dispersan por toda el área (Kuijpers y col., 2002).

El fenómeno físico de la cavitación es la causa de varios efectos mecánicos y químicos en la solución sometida a ultrasonificación, estos varían según la frecuencia incidente. Los efectos fisicoquímicos de la cavitación están muy ligados a variables tales como la viscosidad y la presión de vapor de los líquidos, la temperatura de la solución sometida a ultrasonidos y la intensidad ultrasónica. El solvente empleado para realizar la ultrasonificación debe ser seleccionado cuidadosamente, ya que pueden influir características como la viscosidad y la tensión superficial en el fenómeno de cavitación. Otro parámetro importante es la temperatura ya que altas temperaturas pueden romper las interacciones disolvente-soluto tales como fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno pero por otra parte cuando se alcanzan temperaturas demasiado elevadas el efecto de la cavitación puede verse disminuido (Ali y col., 2014, Niemcewski, 2007).

Para el caso específico de la quitina la ultrasonificación puede emplearse para romper los enlaces de polímero, causando la depolimerización de la misma así, como afectar también la acetilación del material (Mislovicova y col. 2000). Varios autores reportan que la ultrasonificación disminuye la masa molecular y degrada la cadena de la quitina; cuando los tratamientos son prolongados y con niveles de pH bajos también se puede llegar a su desacetilación (Wang y Lin, 1989; Muzarelli y Rochetti, 1985).

1.3.3 Desacetilación

La quitina puede convertirse en su derivado, el quitosano, vía enzimática o bien por medios químicos que conllevan la desacetilación termoalcalina del polímero, siendo este último método el más utilizado. Durante la desacetilación, parte de los enlaces *N*-acetilo se rompen y forman unidades de GlcN que tienen grupos amino libres, los cuales aumentan la solubilidad del polímero en medios acuosos (Weska y col., 2007). En la desacetilación química, existen factores que afectan la calidad del quitosano obtenido como lo son: la temperatura y tiempo de des acetilación, la concentración del álcali y la relación quitina/NaOH, con base en estas variables se clasifican los procesos de desacetilación en dos tipos:

- Heterogénea: se emplean temperaturas y concentraciones de álcali altas y se caracteriza por que la reacción tiene lugar en las zonas amorfas del polímero, durante este proceso ocurre una degradación de la cadena principal, generándose un considerable descenso de la masa molecular, para evitar esto, se ha reportado que la adición de un antioxidante, disminuye la degradación (Lim y Hudson 2004, Hayes y col., 2008).
- Homogénea: se ha realizado con el fin de disminuir los efectos adversos de la desacetilación heterogénea y se persigue obtener un producto con una distribución más regular de los grupos acetamido residuales, es decir, obtener compuestos que puedan retener su estructura y con masas moleculares elevadas, cercanos a los del polímero inicial, pero que sean muy solubles en agua o soluciones acuosas y que este proceso sea regulable por factores como el tiempo y temperatura, permitiendo la obtención de productos con proporciones de desacetilación variables de manera controlada (Kurita, 2001).

Las condiciones específicas de la reacción dependen de factores diversos, tales como la materia prima, el tratamiento previo y el grado de acetilación deseado. No obstante, con un sólo tratamiento alcalino los valores del grado de desacetilación alcanzados no logran sobrepasar del 85 y 90%. Los tratamientos prolongados provocan la degeneración del polímero sin llegar a elevar el grado de desacetilación. En la actualidad, se estudian métodos en los que se involucran tratamientos termomecánicos o radiación de microondas (Peniche, 2006).

1.3.4 Preparación de quitina coloidal

Debido a la falta de solubilidad de la quitina en agua, ésta es modificada usualmente por vías químicas para formar quitina coloidal; esta quitina modificada suele ser usada en medios sólidos con agar para el aislamiento de microorganismos productores de quitinasas; aquí se producen zonas acromáticas alrededor de las colonias microbianas que producen quitinasas extracelulares, también, se utiliza para el conteo de actinomicetos presentes en agua y suelo (Gomez-Ramirez y col., 2004, Khan y col., 2010). La quitina coloidal también se ha empleado como sustrato para la

producción enzimática de quitinolíigosacáridos, específicamente hexaoligoquitina y *N*-acetil-D-Glucosamina (Chao-Lin y col., 2014, Binod y col., 2007).

Uno de los inconvenientes principales de la preparación de quitina coloidal es la gran cantidad de tiempo requerida para su producción, por lo que se han buscado metodologías en donde pueda facilitarse su preparación, tal es el caso de Murthy y Bleakley (2012), quienes proponen un proceso empleando HCl concentrado, temperatura ambiente y varias etapas de filtración durante todo el proceso evitando la necesidad de realizar una etapa inicial de molienda de la quitina a diferencia de los métodos comunes, lo que resulta en un método más práctico y económico.

1.3.5 Fluidos supercríticos (FSC)

El uso de fluidos supercríticos se ha incrementado por motivos ambientales, ya que estos poseen la capacidad de reemplazar algunos solventes industriales que resultan ser tóxicos, además su uso puede ser rentable en la destilación y extracción de líquidos (Marre y col., 2011).

Un fluido se considera supercrítico cuando su presión y temperatura exceden sus respectivos puntos críticos, estos parámetros se incrementan directamente con el peso molecular, polaridad o enlaces de hidrógeno intermoleculares. Una característica singular de los FSC es que conforme aumenta la presión aumenta también la densidad del fluido, sin aumentar significativamente su viscosidad lo cual incrementa su capacidad de solubilización (Yasuji y col., 2008).

Uno de los procesos donde se emplean los fluidos supercríticos es en la expansión rápida de los mismos, la cual consiste en dos etapas principales 1) la disolución del compuesto sólido en el FSC y 2) la formación de partículas debido a su supersaturación. Algunos de los parámetros que afectan estos procesos de expansión rápida son la temperatura, presión, características del material a tratar (cristalinidad y composición), así como la geometría y el tamaño del equipo empleado (Rabinarayan y Padilama, 2012).

1.4 Obtención de quitinolisacáridos (COS) por hidrólisis de quitina y quitosano

La quitina presenta derivados de alto valor agregado, siendo el más conocido de estos su derivado desacetilado conocido como quitosano, pero además de este se encuentran los quitin y quitooligómeros así como los monómeros de estos (GlcN y GlcNAc), los cuales son productos de la hidrólisis tanto de la quitina como del quitosano (Shahidi y Abuzaiton, 2005). Los COS son homo o heterooligómeros de 2-acetamido-2-deox-D-glucosa (GlcNAc) o 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (GlcN) unidos por enlaces β -1,4. Los producen animales, hongos y algunas bacterias ya sea vía biosíntesis o por degradación de aminoglucanos, de igual manera se pueden obtener por hidrólisis enzimática o química de la quitina. En la figura 2 se observan las estructuras de algunos tipos de COS.

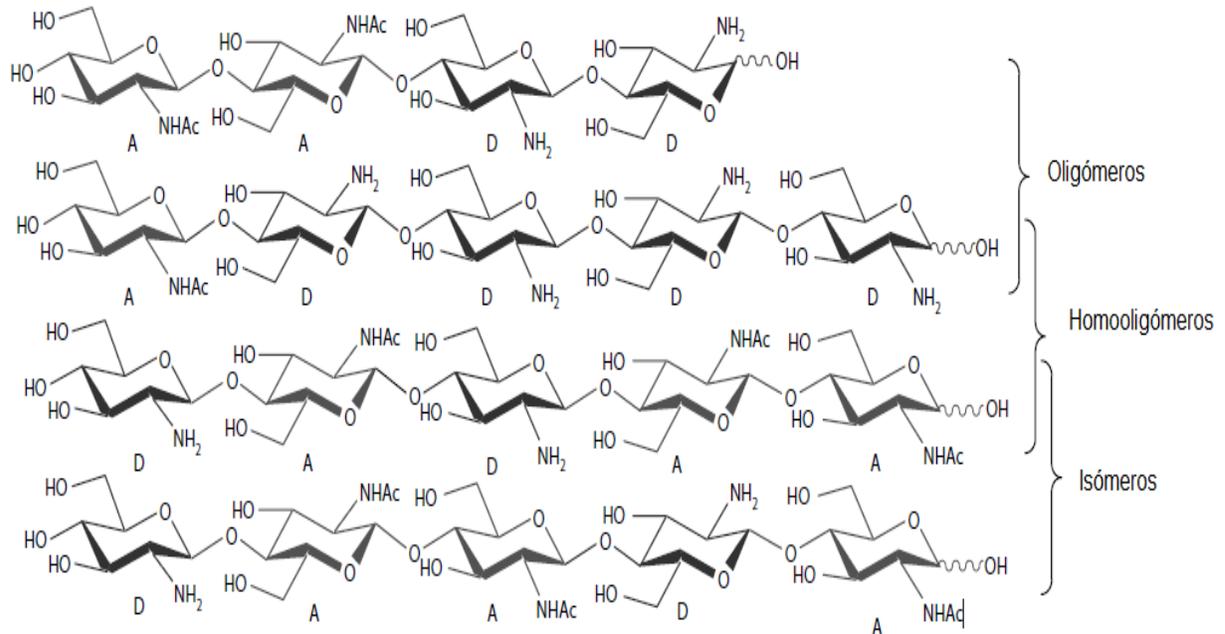


Figura 2. Ejemplos de COS: Oligómeros, Homólogos e Isómeros (Peter y Eberlin, 2010).

1.4.1 Hidrólisis química

Existen varios métodos para la preparación de COS por métodos químicos, los más convencionales son irradiación, desaminación con ácido nítrico, fluorólisis con fluoruro de hidrógeno anhidro y reacciones oxido-reductoras con peróxido de hidrógeno; dentro de éstas, destaca la hidrólisis ácida, por ser la más comúnmente utilizada, los oligómeros obtenidos por este método presentan, principalmente, grados de polimerización (DP) bajos, específicamente se producen cantidades grandes de monómeros hasta tetrameros, mientras que los rendimientos para oligómeros con DP de 5 a 7 son bajos, siendo estos los que presentan una mayor actividad fisiológica, específicamente actividad antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva e incluso antitumoral al ser estimulantes del sistema inmune. (Rupley, 1964, Wen-Seok y col. 2002).

Por otra parte el monómero de GlcN es uno de los suplementos alimenticios más importantes en los Estados Unidos este también es preparado comercialmente por hidrólisis ácida seguido de una purificación del hidrolizado obtenido y re-cristalización posterior. Se ha encontrado que la concentración del ácido es el parámetro que puede ser utilizado para controlar el grado de depolimerización y que la temperatura no es un factor que pueda ayudar a controlar a este proceso (Einbu y col., 2008).

La hidrólisis de la quitina con ácidos normalmente dan como resultado clorhidrato y sulfato de glucosamina, este último es obtenido por el reflujo de quitina con ácido sulfúrico que puede oxidar los grupos -OH primarios y secundarios del polímero, obteniéndose un compuesto muy higroscópico y que se degrada fácil y rápidamente, para evitar este problema, se busca la obtención de sulfato de GlcN a partir de clorhidrato de GlcN añadiendo sulfato de sodio o potasio y co-cristalizando el producto resultante (Mojarrad y col., 2007).

La hidrólisis ácida implica dos procesos principales que son la hidrólisis de los enlaces *N*-acetilo y el rompimiento de los enlaces glicosídicos, que pueden ocurrir con velocidades de reacción muy variables, dependiendo del tamaño del anillo

piranósico, de su configuración, conformación y estructura; estas diferencias pueden emplearse para la caracterización de los polisacáridos posterior a su purificación y la caracterización estructural de los oligosacáridos. Un ejemplo de las diferencias encontradas en las velocidades de reacción de las hidrólisis ácidas es el caso de los quitosanos con grados de acetilación diferentes, donde los enlaces glicosídicos que se encuentran seguidos de una unidad *N*-acetilada se hidrolizan hasta tres veces más rápido que los que se encuentran junto a una unidad *N*-desacetilada; esto puede atribuirse al papel catalítico que representan los grupos acetilo situados en el carbono 2, lo que favorece el rompimiento del enlace y a la presencia de un grupo amino con carga positiva en los residuos de GlcN, que protegería al oxígeno glicosídico de la protonación, resultando en una disminución de la velocidad de hidrólisis (Einbu y col., 2007, Varum y col., 2001).

La obtención de oligosacáridos con DP homogéneos entre 2 y 12 y con F_A variables entre 0-90% se ha estudiado en un proceso de dos etapas, siendo la primera la producción de una mezcla de oligosacáridos de GlcN mediante la hidrólisis ácida de quitosano y la segunda etapa consistió en la *N*-acetilación parcial de los oligómeros con una solución de anhídrido acético (Trombotto y col., 2008).

Por otra parte, a la producción de oligosacáridos mediante hidrólisis con HCl se puede complementar con etapas de fraccionamiento de los COS, esto mediante el uso de membranas de ultrafiltración las cuales realizan cortes de acuerdo a las masas moleculares lo que facilita la evaluación por separado los COS obtenidos, tal es el caso de Ngo y col., (2008) quienes encontraron que los oligosacáridos con tamaños de 1-3 kDa fueron más efectivos que los de tamaño menor a 1kDa en la eliminación del estrés oxidativo en células (Ngo y col., 2009)

Se ha reportado también la depolimerización de quitosanos (F_A 0.59) con el uso de ácido nitroso, donde se encontró que en los residuos *N*-desacetilados se presentaron reacciones intermoleculares por bases de Schiff entre los grupos 2-

amino de las fracciones *N*-desacetiladas y las fracciones 2,5-anhidro-D-manosa lo cual facilitó la hidrólisis del enlace glicosídico (Tommeraas y col., 2001)

1.4.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico β (1-4) con glicosil hidrolasas, es un método prometedor para la generación de COS. En este caso, fracción molar acetilada (F_A), y el DP de la mezcla resultante de COS depende del sustrato empleado y de la especificidad de la enzima utilizada. La quitina y el quitosano se pueden hidrolizar por varias enzimas, dentro de las que se encuentran las quitinasas, las cuales son enzimas hidrolíticas que pueden ser encontradas en varios organismos y presentan aplicaciones en la agricultura así como en la industria farmacéutica y alimenticia (Andragi y Faramarz., 2013).

Con base en su secuencia de aminoácidos, las quitinasas se clasifican dentro de las familias 18,19 y 20 de las glicosil hidrolasas. La familia 18 abarca enzimas de bacterias, hongos, virus, animales y algunas plantas, por otro lado la familia 19 presenta quitinasas pertenecientes a plantas y algunas producidas por el género *Streptomyces*, cabe mencionar que no presentan similitud en sus secuencias de aminoácidos ni en sus mecanismos moleculares, además de que sus estructuras 3-D son completamente distintas. Por último, la familia 20 comprende las β -*N*-acetilhexosaminidasas (Nhasa) de bacterias, *Streptomyces* y humanos (Dahiya y col., 2006).

La hidrólisis enzimática de la quitina se lleva a cabo por dos sistemas sinérgicos y consecutivos: Endoquitinasas (Endo) (EC3.2.1.14), que producen oligómeros solubles, de masa molecular baja, como la quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa, esta actividad enzimática involucra el rompimiento al azar en puntos internos de la cadena del polímero. El segundo grupo de quitinasas, son las exoquitinasas, que actúan progresivamente en los extremos no reductores de la cadena, liberando GlcNAc; dentro de éstas, se encuentran las quitobiosidasas (EC3.2.1.29), que catalizan la liberación progresiva de quitobiosa; y las *N*-

acetilglucosaminidasas, que hidrolizan la quitobiosa y oligómeros de mayor tamaño, liberando GlcNAc (Matsumoto, 2001, Duo-Chuan., 2006). Este sistema se encuentra esquematizado en la Figura 3.

Los microorganismos presentan una producción mayor de quitinasas que las plantas y que los animales, y lo hacen en forma de exoenzimas inducibles, éstas se han sido reportadas de géneros como *Fusarium*, *Trichoderma*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Pseudomonas*, entre muchos otros (Xu-Fen y col., 2002, Tanabe y col., 2000, Ikeda y col., 2009). Así mismo, la obtención de quitinasas a partir de hongos del genero *Trichoderma* ha sido muy estudiada. Sus enzimas quitinolíticas presentan una actividad alta, tanto Endo como exoquitinasa, liberando principalmente monómeros de GlcNAc (Garisto y col.,2003).

Se ha reportado la producción de monómeros de GlcNAc con el uso de quitinasas de *Trichoderma viride* y *Acremonium cellulolyticus*, al mezclar las enzimas de ambas cepas, el rendimiento de la producción del monómero mejoró debido a que las actividades Endo y exoquitinasa fueron diferentes en cada una de las especies y al mezclarlas el rendimiento aumentó hasta 73% (Hitoshi y col., 2003). De igual forma, utilizando celulasas de *Aspergillus niger*, se logró la producción de oligosacáridos de quitosano 80% desacetilado y se encontraron quitoligosacáridos con DP entre 3 y 11, la masa de estos DP fue determinada por MALDI-TOF (Xie y col., 2009).

Por otra parte, se encontró que, utilizando enzimas hidrolíticas producidas industrialmente, tales como papaína, celulasas y pepsina, se producen COS a partir de quitina con rendimiento de 75% para *N*-acetilquitobiosa, mientras que para GlcNAc, 19% y, finalmente, solo 9.5% para quitotriosa; esto, empleando pH de 5.4 y temperatura de 44°C durante 24 horas (Ilankovan y col., 2006).

Un sistemas de reactor dual fue reportado por Jeon y Kim (2000), el sistema consistió en una zona de ultrafiltración por membranas y otra que contaba con un reactor de columna donde las enzimas se inmovilizaron, obteniéndose COS con DP de entre 3 y

6; los cuales presentaron actividad antibacteriana y en una concentración de 0.5 % inhibieron completamente el crecimiento de *E. coli*.

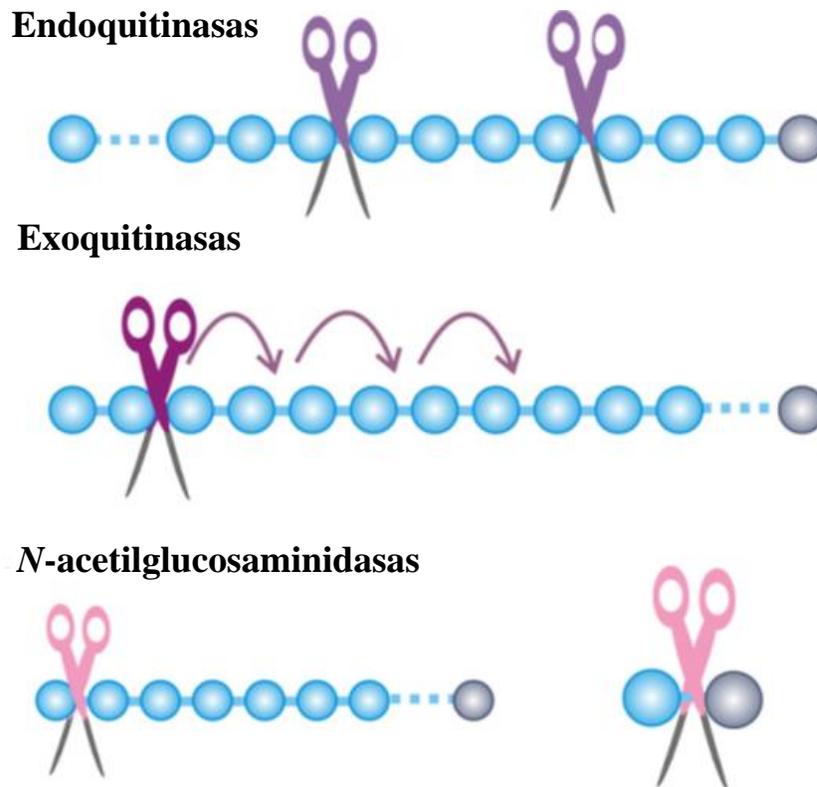


Figura 3. Hidrólisis de quitina mediante quitinasas (modificado de Seidl y col., 2008)

1.5 Mecanismo de acción de las quitinasas

La familia 18 de las glicosil hidrolasas, presente en hongos, tiene una estructura de multidominos:

- La región N-terminal
- El dominio catalítico
- Una región rica en serina/treonina

- Un dominio de unión a quitina
- Una región C-terminal

De cualquier forma la mayoría de las quitinasas carecen de las últimas tres regiones o dominios, que parecen no ser necesarias para la actividad quitinolítica, ya que las enzimas que no presentan estos dominios siguen teniendo actividad (Duo-Chuan y col., 2006). Existen dos mecanismos de acción de las enzimas quitinolíticas, el primero es un mecanismo de retención de doble desplazamiento y el segundo es un mecanismo de inversión de desplazamiento simple. La familia 18 de las quitinasas utiliza una variante especial del mecanismo de doble desplazamiento donde el átomo de oxígeno del carbonilo del grupo *N*-acetilo actúa como nucleófilo llevando a la formación de un ion oxazolinio intermediario (Aalten y col., 2001).

Slamova y col., (2010) sugieren que el mecanismo implica un intermediario enzimático covalente α -glicosilo, en una primera etapa, uno de los dos grupos carboxilo ataca el centro anomérico del sustrato mediante catálisis ácida por el otro carboxilo. El grupo saliente es separado y se forma el intermediario de la enzima glicosídica de la configuración anomérica opuesta. Posteriormente, este intermedio es atacado por una molécula de agua en el sitio anomérico, de nuevo, con ayuda de un carboxilo y, finalmente, se hidroliza el enlace glicosídico y el producto formado conserva la configuración original de sustrato anomérico. En la figura 4 se presenta el mecanismo de catálisis de las quitinasas.

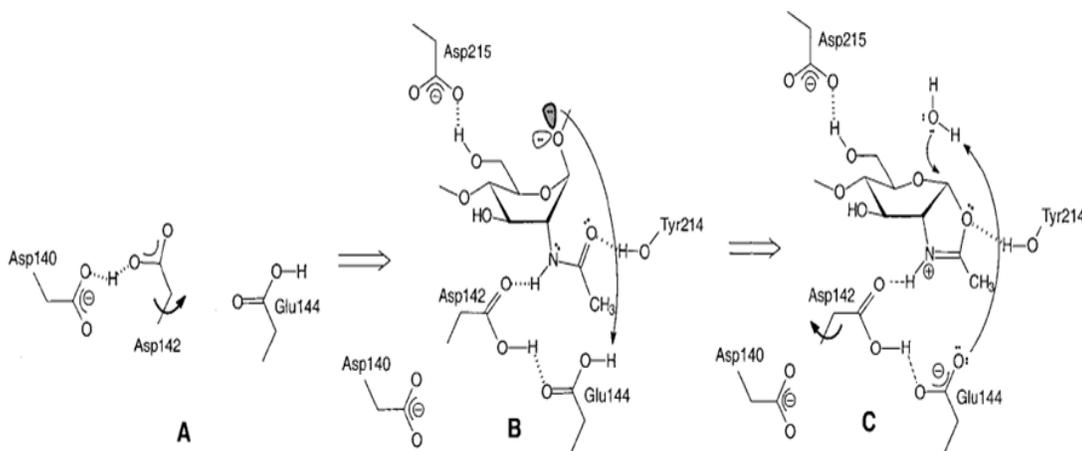


Figura 4. Mecanismo de catálisis propuesto para la mayoría de las quitinasas de la familia 18. A) Enzima en reposo, B) Unión del sustrato, C) (Tomado de Aalten y col., 2001).

La hidrólisis de la quitina puede generar dos productos diferentes que tiene una configuración α o β , esto es, que el oxígeno anomérico del C1 esté en posición axial o ecuatorial respectivamente. Debido a que los enlaces entre los residuos de GlcNAc en quitina son β -1,4 un compuesto con una configuración α requiere ser invertido. Las quitinasas de familia 19 presentan un mecanismo inversor que los hace incapaces de transglicosilar y mediante RMN se descubrió que la hidrólisis enzimática con quitinasas de *S. griseus* producía un anómero β el cual, posteriormente se convirtió en un anómero α , mientras que quitinasas de *Dioscorea opposita* produjo, primeramente, un anómero α que después se transformó a un anómero β por mutarotación (Patil y col., 2000).

1.6 Producción de quitinasas de fuentes diversas

Las quitinasas están presentes en una amplia variedad de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales y participan en sus procesos fisiológicos, como son nutrición, morfogénesis y defensa ante patógenos que contienen quitina en sus estructuras (Adrangi y Faramarzi, 2013).

1.6.1 Quitinasas fúngicas

Las quitinasas producidas por hongos poseen propiedades enzimológicas versátiles y normalmente forman parte de sistemas enzimáticos complejos, entre los hongos se ha explorado ampliamente los géneros *Trichoderma*, y *Penicillium* los cuales fueron descritos como buenos productores de quitinasas (Binod y col., 2005). Binod y col., (2007), emplearon hongos de los géneros *Trichoderma*, *Beauveria* y *Penicillium* para la producción de quitinasas y encontraron que *P. aculeatum* es un buen productor de quitinasas mientras que *T. harzianum* lo es de quitobiosidasas, mencionan que un sistema con la mezcla de ambos hongos podría ser una buena opción para la producción de GlcNAc. Otro hongo productor de quitinasas es *Pacelomyces lilacinus*,

parasito que ataca nematodos que infectan a las plantas, la quitina es uno de los componentes principales de estos nematodos, el hongo produce quitinasas para degradar la capa más gruesa del caparazón del nematodo (Khan y col., 2003).

En este trabajo, se utilizaron las quitinasas del hongo entomopatógeno *L.lecanii*, que tiene una gama de insectos hospederos amplia, incluyendo Homoptera, Coleoptera, nematodos de la soya, pepino y crisantemo, entre otros (Khuo-Chin y col., 2002). En cuanto a la taxonomía del hongo, este anteriormente era clasificado dentro del género *Verticillium*, pero en 2001 fue reclasificado dentro de género *Lecanicillium* situando a todos los patógenos de insectos dentro de este género incluyendo a *L. attenuatum*, *L. lecanii*, *L.longisporum*, *L. muscarium* y *L. nodulosum* los cuales estaban englobados previamente dentro de *Verticillium lecanii*.

La patogenia del parasitismo de *L. lecanii* se produce por adherencia de las esporas a la cutícula del insecto; germinación de esporas y producción de micelio, que coloniza la superficie de la cutícula; penetración del patógeno, desarrollo de hifas y degradación cuticular, la colonización y penetración de la cutícula por el hongo es el resultado de una hidrólisis enzimática, por la acción sinérgica de quitinasas y una presión mecánica, esto produce una invasión masiva de tejidos internos y, finalmente, la asimilación de nutrientes y desarrollo del hongo sobre el cadáver del insecto (Askary y col., 1999)

Ya que las quitinasas producidas por *L. lecanii* hidrolizan el exoesqueleto de varios insectos, se ha utilizado en el biocontrol de insectos plaga y como una fuente de genes de quitinasas útiles en el desarrollo de plantas con resistencia a varias plagas (Zhen-Xiang y col., 2005). Cabe destacar que *L.lecanii* ha destacado por la producción de quitinasas tanto en cultivo sólido (Barranco-Florido y col., 2009; Marín-Cervantes y col., 2008, Rocha-Pino y col., 2011) como en cultivo sumergido (Bing-Lan y col., 2003, Matsumoto y col., 2004, Ramirez-Coutiño y col., 2006).

1.6.2 Quitinasas bacterianas

Las quitinasas producidas por bacterias se utilizan para degradar la quitina y utilizarla como fuente carbono o nitrógeno, estas quitinasas pueden emplearse como agentes potenciales para el control biológico de algunas enfermedades en plantas causadas por hongos fitopatógenos (Jami y col., 2008). Algunos de los géneros más conocidos y estudiados son *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus*, aunque existen también reportes sobre la producción de quitinasas por bacterias como *Pseudomonas sp.*, *Sanguibacter C4* y *Symbiobacterium termophilum* (San-Lang y col., 2008; Yong y col., 2005; Ogawa y col., 2006).

Mitsutomi y col., (2005) reportaron la producción de quitinasas y quitosanasas de *Streptomyces griseus*, cuando se desarrolla sobre quitina coloidal y quitosano respectivamente, encontrando que las quitinasas podían hidrolizar tanto los enlaces con residuos acetilados como los no acetilados, esto al emplear quitosano parcialmente acetilado como sustrato.

Bacillus subtilis W-118 es una cepa aislada del suelo y que tiene la capacidad de producir extracelularmente materiales antifúngicos, este microorganismo fue probado en un medio suplementado con polvo de camarón y cangrejo como fuente de carbono produciendo quitinasas de masa molecular baja y punto isoeléctrico ácido, la aplicación de dichas enzimas logró la inhibición de *Fusarium oxysporum* (San-Lang y col., 2006).

Por otra parte, Sastoque-Cala y col., (2007) lograron la producción de quitinasas de *Streptomyces sp* en condiciones alcalinas y mencionan que las enzimas producidas a partir de microorganismos extremófilos tienen ciertas ventajas sobre las producidas por sus homólogos no extremófilos ya que pueden conservar su actividad catalítica en condiciones ambientales extremas lo cual es común que se presente en los procesos industriales.

1.6.3 Quitinasas en plantas

Uno de los mecanismos de defensa de las plantas contra plagas microbianas y de insectos es la acumulación de proteínas relacionados con la patogénesis las cuales incluyen inhibidores de proteasas y enzimas hidrolíticas capaces de degradar las paredes celulares de los patógenos, dentro de éstas se encuentran las quitinasas que evitan el crecimiento del hongo (Krishnaveni y col., 1999).

Cuando la planta se encuentra en un estado ideal las quitinasas vacuolares y apoplásticas se producen continuamente, esta producción está regulada por factores de estrés ya sean bióticos o abióticos como infecciones, heridas, sequia, frio, entre otros factores. Por otra parte, las fitohormonas como el etileno, el ácido salicílico, auxinas y citosinas también inducen su producción (Fenghua Xu y col., 2007).

Kolossova y col., (2014) demostraron que las quitinasas están involucradas en la defensa de coníferas en contra de insectos y patógenos, mediante la caracterizaron de las quitinasas de *Picea glauca x engelmanni* y *Pinus contorta*, observaron que la inducción de estas se lleva a cabo mediante la inoculación de hongos relacionados con el escarabajo de la corteza del árbol.

Remi y McDonald (1997) trabajaron con *Trichosanthes kirilowii*, una planta medicina de China y mencionan que no todas las quitinasas de plantas tienen actividad antifúngica ni tienen la capacidad de degradar la quitina de los hongos o evitar la germinación de sus esporas, como por ejemplo la quitinasa clase II proveniente del tabaco y la quitinasa clase III proveniente del garbanzo. Por otra parte, al mezclar algunas de estas quitinasas purificadas con proteínas relacionadas con la defensa de las plantas como lo es la β 1-3-glucanasa y algunas proteínas inhibidoras de los ribosomas, se genera una actividad antifúngica elevada que no se presentaría al estar aisladas estas proteínas.

1.6.4 Quitinasas en insectos

En general en los artrópodos las quitinasas están relacionadas con la movilidad, digestión de los nutrientes y regeneración de la cutícula, esta última, está mediado por la producción de quitinasas en el fluido de muda que se acumula en el espacio

entre la epidermis y la vieja cutícula, así como en el tejido intestinal, los productos *N*-acetilados obtenidos de la hidrólisis se reciclan y acumulan para la formación de una nueva cutícula; cabe mencionar que las quitinasas encontradas en el tejido intestinal no sólo presentan la función en la degradación de cutícula, sino también presentan funciones digestivas (Kramer y Muthukrishnan, 1997).

Las quitinasas de insectos juegan un papel muy importante en el ciclo de la quitina, especialmente durante la etapa de muda, producen varias quitinasas con funciones específicas y su expresión esta regulada durante todas las fases de la metamorfosis de manera que favorezca la muda y no inhiba el crecimiento del insecto (Andragi y Faramarzi, 2013).

Para poder caracterizar el proceso de muda o ecdisis así como para entender como la expresión de quitinasas es regulada por sucesos metabólicos y de desarrollo se han estudiado ampliamente las enzimas de insectos como la mosca domestica (*Musca domestica*), el gusano de la seda (*Bombix mori*), y gusano del tabaco (*Manduca sexta*) y se ha logrado probar la existencia de una acción sinérgica entre las Endo y las *N*-acetilglucosaminidasas de estas especies, para la renovación de sus exoesqueletos de estas especies, ya que las Endos actúan primero para la degradación de la quitina presente en la cutícula y, posteriormente, los productos de esta hidrolisis se degradan, por las *N*-acetilglucosaminidasas (Koga y col., 1997, Daimon y col. 2003, Kramer y col., 1993).

1.7 Purificación de quitinasas

Las quitinasas se han purificado empleando precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de permeación en gel, isoelectroenfoque, entre otras. Los rendimientos obtenidos han sido bajos y esto puede atribuirse a la perdida de actividad quitinolítica durante el proceso de purificación y a la acción sinérgica de varias isoformas para la degradación de quitina presente en el extracto crudo (Duo-Chan y col., 2006).

La purificación de quitinasas de *L. lecanii* fue reportada por Fenice y col., (1998) quienes emplearon precipitación con sulfato de amonio, isoelectroenfoque preparativo y por último cromatografía de intercambio iónico, el resultado fue una quitinasa pura de alrededor de 45 kDa, punto isoeléctrico de 6.9 y activa en un rango amplio de temperaturas que iban de 5 a 60°C. La etapa preparativa de isoelectroenfoque ha sido reportada también por autores como Binod y col., (2005), quienes lograron producir y purificar quitinasas de *Penicillium aculeatum* empleando como primer paso en su protocolo de purificación isoelectroenfoque, que no consiguió remover las impurezas de otras proteínas presentes en el extracto por lo que se realizó cromatografía de intercambio iónico y de permeación en gel.

Por su parte Barghini y col., (2013) trabajaron sobre quitinasas tolerantes al frío provenientes del hongo *Lecanicillium muscarium* y obtuvieron 2 enzimas quitinolíticas con pesos moleculares de 61 y 25 kDa, empleando un proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico seguido de cromatografía de filtración en gel, cabe mencionar que un paso extra de purificación fue necesario para una de las quitinasas repitiendo el paso inicial de intercambio iónico con una resina Q-sefarosa.

El empleo de cromatografía de intercambio iónico ha sido ampliamente reportada en la purificación de quitinasas, tal es el caso de Khan y col., (2003) quienes trabajaron con quitinasas del hongo filamentoso *Paecilomyces lilacinus* realizando un protocolo de purificación con una etapa de intercambio iónico empleando una resina DEAE-Sephagel la cual se considera como intercambiador aniónico débil. Por su parte Sukpraist y Wititsuwannakul (2014) purificaron una Endo y una β -N-acetilglucosaminidasa, para el caso de la Endo se siguió un protocolo que involucraba intercambio catiónico y filtración en gel mientras que para la β -N-acetilglucosaminidasa se emplearon dos pasos de intercambio iónico empleando una columna de CM-Sefarosa y DEAE-Celulosa.

Otro tipo de cromatografía empleada para la purificación de quitinasas es la de interacción hidrofóbica, reportada por Ikeda y col., (2009) quienes la purificaron en

tres etapas de cromatografía, interacción hidrofóbica, intercambio catiónico y filtración en gel, cabe resaltar que, en este caso, la quitinasa purificada no fue microbiana sino aislada del estómago del pez de río *Pennahia argentatus*.

1.8 Efecto de los factores físicos y nutricionales en la fisiología de los hongos y la producción de enzimas

Tanto la fuente de carbono como la fuente de nitrógeno y la adición de residuos agrícolas, así como también factores físicos como la aireación, el pH y la temperatura logran afectar la producción de quitinasas extracelulares (Dahiya y col., 2006).

1.8.1 pH

El pH influye en las funciones de la membrana celular, la morfología de la células, la solubilidad de las sales, el estado iónico de los sustratos, la absorción de nutrientes y la biosíntesis de productos; en general, las células solo pueden crecer dentro de un intervalo de pH y la producción de metabolitos también se afecta (Fang y Zhong 2002).

Debido a que muchos hongos patógenos de insectos pueden crecer en medios en intervalos grandes de pH, que varían de 2.5 a 10.5, es probable que tenga un sistema regulatorio para asegurar que las enzimas y otros productos encontrados dentro de las barreras de la célula sean sintetizados solo a pHs donde puedan funcionar efectivamente (St. Leger y col., 1998). En los hongos entomopatógenos los genes relacionados con la virulencia y la secreción de enzimas que degradan la cutícula de insectos, como las quitinasas, están directamente ligados con factores ambientales como el pH; en consecuencia, los hongos pueden regular su microambiente como un mecanismo de adaptación y supervivencia (St. Leger y col., 1999). Ramirez-Coutiño y col., (2010) coinciden con lo anterior, reportando que la síntesis y secreción de las enzimas que degradan las paredes celulares de hongos está regulada por factores ambientales, principalmente el pH, que actúa como señal de crecimiento, virulencia y diferenciación de hongos patógenos en humanos, plantas, insectos y otros hongos.

1.8.2 Agitación y Aireación

En los cultivos sumergidos, la intensidad de agitación puede tener efecto sobre la morfología del hongo, así como en la transferencia de masa. En algunas fermentaciones fúngicas es necesario aplicar velocidades de agitación altas para tener un mezclado adecuado y favorecer la transferencia de masa, especialmente, cuando las células crecen en forma libre y dispersa, lo que resulta en un fluido no-newtoniano con viscosidad aparente alta. Sin embargo, la velocidad de agitación debe controlarse para evitar la generación de esfuerzos de corte altos, ya que pueden llegar a causar daños en el micelio (Abd-Aziz y col., 2008). Felse y Panda (2000) trabajaron en la producción de quitinasas de *Trichoderma harzianum* en bioreactores de tanque agitado, encontrando que una velocidad de 224 rpm, favoreció el crecimiento del hongo y la producción de quitinasas. A velocidades de agitación altas (alrededor de 300 rpm) la producción de quitinasas disminuyó rápidamente, de igual forma que el crecimiento del hongo pero esto de manera más lenta.

La aireación, es un parámetro crítico en la fisiología de los hongos, como en el proceso de la formación de esporas, por lo que una aireación adecuada favorece las características morfológicas del microorganismo (Fenice y col., 2002). Lee y col., (2008) analizaron el efecto de la aireación en cultivos de *L. lecanii*, empleando una agitación de 350 rpm y variando el flujo de aire (0.5 y 1 vvm), encontraron que cuando la aireación es baja (0.5 vvm) la transferencia de oxígeno se convierte en un problema para el crecimiento del hongo y da lugar a la formación de grumos, así como a la disminución de la formación de esporas.

1.8.3 Temperatura

La temperatura también afecta el crecimiento de los microorganismos y, por lo tanto, la producción de enzimas extracelulares influencia su inducción y actividad (Mishra y col., 2013). Narayana y col., (2009) evaluaron temperaturas para la producción de quitinasas desde 15 a los 45 °C, encontrando que la temperatura óptima fue de 35°C, lo que es consistente con lo reportado por otros autores quienes encuentran

temperaturas óptimas entre los 30 y los 40 °C (Nawani y col., 2002, Taechowisan y col., 2003). Por su parte, Jholapara y col. (2013), buscaron optimizar las condiciones de cultivo para la producción de quitinasas evaluando temperaturas de entre 25 y 45 °C, obteniendo la producción máxima a temperaturas de entre 30 y 40°, temperaturas superiores resultaron en la disminución de la producción de quitinasas, lo cual muestra la preferencia mesofílica del microorganismo para la producción de enzimas.

1.8.4 Factores nutricionales

El análisis y conocimiento de los requerimientos nutricionales son de suma importancia para optimizar el cultivo de hongos entomopatógenos como *L. lecanii*, los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos están compuestos de macroelementos como carbono y nitrógeno, los cuales están involucrados en el crecimiento de micelio y la formación de esporas así como en mecanismos de autodefensa e interacción planta-patógeno, los cuales involucran la producción de enzimas hidrolíticas (Mehta y col., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la fuente de carbono es uno de los factores más importantes para la producción de enzimas del tipo de las quitinasas y se ha reportado que el uso de quitina coloidal aumenta su producción; por el contrario, cuando el medio contiene quitina coloidal más glucosa, la producción de quitinasas disminuye debido a la represión que la glucosa provoca (Shirai y col., 2006). De la cruz y col., (1993) coinciden en que el uso de quitina favorece la producción de quitinasas aumentando los rendimientos, paralelamente con el incremento de la concentración de quitina, principalmente cuando es la única fuente de carbono.

Gao y Liu (2010) mencionan que la fuente de nitrógeno y la relación C:N tienen un efecto muy significativo en el crecimiento y esporulación de los hongos, así como en la producción de conidios, tanto en medio sólido como líquido; el gen *chiA*, gen de quitinasas de algunas bacterias marinas, está regulado por la concentración y el tipo de fuente de nitrógeno, encontrando que la expresión de *chiA* se induce por la limitación de nitrógeno y, por el contrario, se reprime al incrementarla (Delpin y Gooman, 2009). Sahima y col., (2013) realizaron pruebas con varias fuentes de

nitrógeno, encontrando que el extracto de malta y de levadura provocaron la mayor producción de quitinasas mientras que la urea y peptona tuvieron un efecto represor en la producción de enzimas quitinolíticas.

1.9 Aplicaciones y Análisis estructural de COS

1.9.1 Aplicaciones de los COS

Los oligómeros de quitina, pentámeros y hexámeros, tienen aplicación en medicina y como alimentos funcionales, debido a su actividad antibacterial y antitumoral así como sus efectos inmunoestimulantes (Takashi y col., 2009). La actividad antitumoral de los oligómeros se debe a la estimulación de las defensas del organismo, ya que no atacan directamente al tumor sino que se incrementa la producción de linfocitos (Jeon y Kim, 2000). Por su parte, Lopatin y col., (1995) mencionan que los COS generan un aumento de lisozima sérica y estimulan el sistema inmune mediante la activación de macrófagos e inducción de células polimorfonucleares. Los oligómeros de quitina son muy atractivos por ser no tóxicos, biodegradables y biocompatibles, haciendo que su gama de aplicaciones sea más amplia que para polímeros sintéticos (Kurita, 1998).

El monómero de GlcN se utiliza como suplemento alimenticio para el tratamiento de la osteoartritis, esto, debido a que presenta un efecto estimulante en la síntesis de mucopolisacaridos, incrementando la producción de cartílago extracelular y a que forma parte de la estructura del tejido de las articulaciones, (Rubin y col., 2001; Il'ina, 2004). Vo y col., (2012) investigaron el efecto de los COS en la respuesta antiinflamatoria, encontrando que logran reducir la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina E2, suprimiendo la expresión de la enzima que sintetiza el NO sin presentar citotoxicidad; los COS con tamaños de entre 1-3 kDa produjeron respuesta mayor, comparados con los de tamaños menores a 1kDa.

Ngo y col., (2008) demostraron que los COS captan radicales libres en los sistemas celulares de manera directa e indirecta, e inhiben los daños biológico-moleculares de los radicales libres en las células y pueden inhibir la actividad mieloperoxidasa

disminuyendo la oxidación del DNA; además, incrementan la producción de glutatión intracelular.

La actividad antibacterial, tanto contra bacterias Gram positivas como negativas, de los COS fue demostrada por Benhabiles y col., (2012), quienes probaron quitina, quitosano y COS, encontrando que estos últimos presentan mayor actividad antimicrobiana y son más fácilmente aplicables, debido que son solubles en agua, a diferencia de los polisacáridos nativos, mencionan que, comercialmente, sería preferible el uso de COS ya que se obtienen directamente de la quitina evitándose así, la etapa de desacetilación requerida en la preparación de quitosano y sus oligosacáridos, es importante mencionar que, en dicha investigación, tanto los oligosacáridos de quitina como los de quitosano presentaron la misma actividad antimicrobiana. Kim y Rajapakse (2005) mencionan que el mecanismo por el que los oligosacáridos parcialmente acetilados producen la inhibición del crecimiento de microorganismos es por alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular lo cual impide la entrada de nutrientes o produce su fuga y, como consecuencia, se produce la muerte del microorganismo. Proponen que la carga positiva de los oligosacáridos facilita la unión con la pared celular, lo que inhibe el crecimiento de la célula bacteriana.

Aun cuando no se encuentra bien demostrada, otra de las aplicaciones de los COS es como antiviral en plantas y animales. Se ha propuesto que esta actividad generada por las cargas catiónicas de los grupos amino presentes en los oligómeros parcialmente acetilados, las cuales tienen la capacidad de activar los mecanismos de defensa de los organismos (Kim y Rajapakse, 2005). Xie y col., (2009) mencionan que los COS con DP de 7 a 14 son inductores de la fitoalexina para la prevención de infecciones por hongos en las plantas. En el trigo (*Triticum aestivum*), homoligosacárido con DP de alrededor de 7 unidades indujeron la actividad peroxidasa en hojas, mientras que heterooligosacáridos indujeron la actividad fenilalanin-amonio-liasa y peroxidasa, mientras que oligómeros completamente desacetilados no presentaron actividad. Para el caso de chícharo, COS con DP de 5-

7 y F_A de 0.33-0.52 fueron más efectivos en la inducción de pisatina (Bahrke y col., 2002).

Por otra parte, suplementar con COS las dietas de peces y crustáceos incrementa el nivel de antioxidantes en camarones, mientras que suplementar su dieta con *GlcNAc* puede llegar a inhibir su crecimiento, por lo que es preferible el uso de quitosano (Niu y col., 2013); en tilapia híbrida, la incorporación de COS en su dieta, mejoró su salud intestinal, cambió la flora intestinal y aumentó la resistencia ante infecciones por *A. hydrophila*, teniendo más efecto los oligosacáridos acetilados que los desacetilados (Qin y col., 2014).

1.9.2 Análisis estructural de COS

La espectrometría de masas (MS) es una de las mejores opciones para obtener información detallada sobre la estructura de los COS, sobre todo, los métodos de ionización suave. Sus ventajas son: muestras pequeñas; detección rápida del compuesto, aun en concentraciones muy bajas (nanomoles a picomoles); la posibilidad de separar los componentes de mezclas complejas, y el hecho de que no es necesaria la preparación de derivados, para aumentar la volatilidad de la muestra. Especialmente, la espectroscopía MS en tándem, produce una gran cantidad de información y es el método de elección para el análisis de la estructura de COS con DP elevados (Peter y Eberlin, 2010).

Boone y col., (1999) emplearon la técnica de ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB) para analizar los COS, encontrando oligosacáridos altamente sustituidos en los extremos no reductores y no sustituidos en los extremos reductores. Por su parte Cederkvist y col., (2006), identificaron oligosacáridos mediante MS en tándem con ionización por nanoelectrospray y análisis cuadrupolo-TOF, esta técnica se eligió por la ventaja de poder utilizar bajas velocidades de flujo de infusión para la muestra en un sistema híbrido, que combina la simplicidad de un cuadrupolo con la alta eficiencia de un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Trombotto y col., (2008) obtuvieron homooligosacáridos de quitina y quitosano que

fueron caracterizados mediante MALDI-TOF, lo cual resultó particularmente útil para estudiar la distribución de los oligómeros con DP de entre 3 y 7 con base en sus grados de acetilación.

Otro método potente para el análisis de la estructura de COS es la espectroscopia de RMN; ésta brinda información sobre los azúcares reductores y no reductores presentes en los COS analizados, así como de las variaciones en sus alrededores (Fukamizu y col., 1992). Cabe mencionar que, mediante esta técnica, la cantidad de muestra requerida es mayor que la empleada en MS y la información obtenida se limita a la identificación de tres unidades de monosacáridos vecinos, mientras que para COS con DP superiores, la RMN muestra la abundancia relativa de díadas y tríadas en la cadena del oligosacárido lo cual es útil para la comprensión de las propiedades fisicoquímicas de los polímeros (Varum y col., 1991).

Kumar y col., (2005) llevaron a cabo la hidrólisis enzimática de quitosano, los quitoligosacáridos obtenidos fueron analizados por C-NMR en estado líquido para conocer el DA, observándose un aumento en la altura del pico correspondiente a $-CH_3$ (≈ 25.0 ppm) y del pico correspondiente a $C=O$ (cercano a 176.0 ppm) esto en la de mezcla de oligosacáridos con distintos DP comparada con el quitosano nativo.

Una alternativa menos explotada es la propuesta por Wang y Hsieh (2002) que consiste en electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser empleando 9-aminopiren-1,4,6-trisulfonato, los límites de detección por esta técnica son de DP de 1 a 6, uno de los inconvenientes de este método es el gran tiempo de preparación de muestra que es de alrededor de 16 h. En la figura 5 se muestra el espectro característico de COS analizados por 1H -RMN.

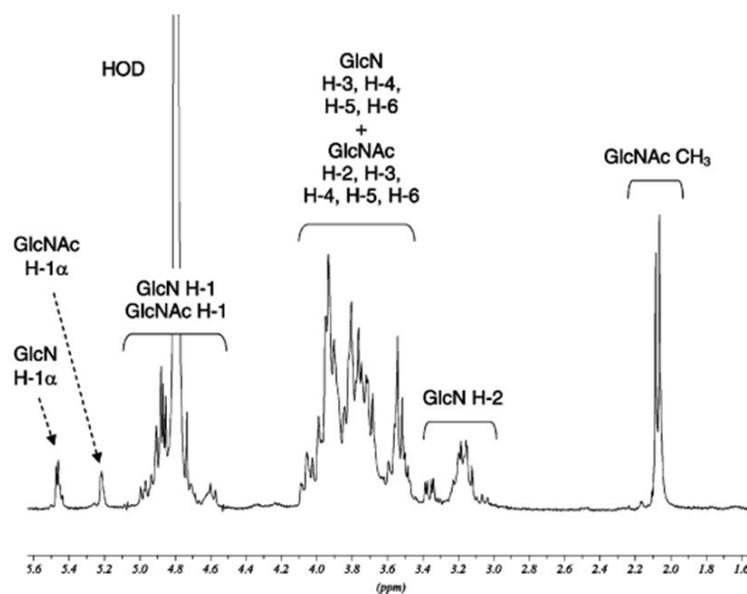


Figura 5. Espectro de ¹H-RMN de COS con DA 25% (Trombotto y col., 2008).

2 JUSTIFICACIÓN

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, sus derivados, que presentan mayor solubilidad, tienen actividad antitumoral, antimicrobiana e inmunoestimulante; sin embargo, la producción de derivados es difícil debido a su alta cristalinidad y baja solubilidad. Actualmente, se comercializan productos derivados de GlcN como el sulfato y clorhidrato de glucosamina, esto se debe principalmente a que la hidrólisis química tiene como consecuencia la desacetilación de los productos y solo puede ser obtenido el monómero desacetilado, mientras que para la obtención del monómero acetilado (GlcNAc) se tendría que agregar al proceso una etapa adicional de acetilación.

En México, el camarón es el producto pesquero de mayor valor y se encuentra posicionado en el 4to lugar de producción pesquera, solo en el 2013 se alcanzó una producción de 102,437 toneladas (SAGARPA, 2013). Sin embargo, aproximadamente el 45% del peso del animal es considerado como desecho (cabeza y tórax) lo cual representa un potencial contaminante de alrededor de 46,000 toneladas. Este residuo se aprovecha muy poco, solo en la elaboración de harinas para alimentación animal, pero en la mayoría de los casos es confinado, sin tratamiento alguno, generando un problema ambiental debido a su facilidad de descomposición, por lo que se pretende contribuir a la obtención de productos de alto valor agregado a partir de los desechos de camarón (López-Cervantes y col., 2006). La fermentación láctica es una alternativa para el tratamiento de estos residuos presentando atractivas ventajas, como bajos costos de inversión y la obtención de productos de alto valor como proteínas, pigmentos, específicamente la astaxantina y la fracción sólida que es la quitina (Cira y col., 2002).

Aun cuando los oligómeros de quitina pueden ser obtenidos por métodos enzimáticos los químicos son los más ampliamente utilizados en la producción industrial, éstos involucran el uso de ácidos concentrados, los oligosacáridos obtenidos tienen baja

F_A, y el proceso genera efluentes tóxicos y problemas ambientales. Es por esto que surge como alternativa la hidrólisis enzimática de la quitina, que se lleva a cabo mediante un sistema sinérgico y consecutivo de quitinasas, obtenidas de fuentes diversas, siendo las bacterias las más frecuentemente empleadas a nivel industrial. El hongo más explotado en esta área ha sido *Trichoderma harzianum*, aunque están por estudiar muchas otras especies, principalmente los entomopatógenos, ya que pueden presentar actividades quitinolíticas importantes.

En el presente trabajo se propone el uso del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* en cultivo sumergido, debido a las ventajas que éste presenta, tales como la facilidad para el escalamiento de los procesos, el control de sus parámetros operacionales como pH, temperatura, requerimientos nutricionales, etc, así como la recuperación fácil de sus productos (Demir y col., 2011). En el grupo de trabajo se encontró que este hongo produce varias proteasas durante el cultivo sumergido, lo que puede reducir la actividad quitinolítica, por lo que es recomendable eliminar la actividad proteásica purificando parcialmente la actividad quitinolítica (Bidochka y Khachatourians, 1994).

Además, la hidrólisis enzimática de la quitina se ve limitada por las fuertes interacciones dipolo-dipolo presentes entre las cadenas del biopolímero lo cual le confiere una alta cristalinidad y complica la penetración de la enzima. Para solucionar este problema, se plantea recurrir a la aplicación de métodos físicos o químicos que modifiquen la estructura de la quitina. Ejemplo de esto es la SE, que es un método útil para aumentar la accesibilidad de celulosa para las enzimas, esto es atribuido a que el tratamiento logra la apertura de los dominios cristalinos y el aumento del tamaño de poro (Li y col., 2007), la utilización de SE así como de la expansión rápida con 1,1,1,2- tetrafluoroetano (R134a) como pretratamientos para la hidrólisis enzimática de la quitina no han sido reportado hasta ahora.

3 HIPÓTESIS

La modificación estructural de quitinas mediante métodos físicos y químicos facilitará la hidrólisis posterior de sustratos quitinolíticos mediada por quitinasas de *Lecanicillium lecanii* obteniéndose así quitoligosacáridos con alto grado de acetilación

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudio de la producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii*, su purificación parcial y aplicación en la hidrólisis de sustratos quitinolíticos modificados estructuralmente para la producción de quitinolíigosacáridos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- » Producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii* en cultivo sumergido en diferentes medios de cultivo.
- » Purificación parcial de Endoquitinasas y *N*-acetilhexosaminidasas.
- » Evaluación de la actividad hidrolítica de las quitinasas sobre sustratos modificados de quitina, empleando quitosano como control, para la producción de oligosacáridos.
- » Caracterización de la estructura de los oligosacáridos producidos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii*

5.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854, se propagó en agar dextrosa de papa (PDA) y se mantuvo a 4°C. La preparación del inóculo se realizó a partir de la agitación mecánica de los cultivos esporulados en PDA (6 días) con una solución de Tween 80 (0.02% p/v) hasta alcanzar una concentración final de 1×10^7 esporas/ml (Bidochka y Kachatourians, 1988) esto se confirmó mediante conteo en cámara de Neubauer de 16 cuadros por cuadrícula y contando 9 cuadrículas del total de la cámara empleando la dilución que fuera requerida. La fórmula empleada para expresar el número de esporas encontrado es la Ec 1.

$$N = nFD \quad (1)$$

Donde **N** es el número de esporas/mL de suspensión inicial, **n** es el promedio del número de esporas contadas en la cámara, **F** representa factor de la cámara empleada (25×10^4) y **D** es la dilución empleada para el conteo.

Por último, la suspensión obtenida se conservó a 4°C para su uso posterior como inóculo en los experimentos.

5.1.2 Condiciones del cultivo sumergido

El cultivo sumergido se realizó en un bioreactor de 3L (Applikon, Holanda) el cual se trabajó al 53% de su capacidad nominal, es decir se emplearon 1.6L de medio de cultivo en cada fermentación controlando la temperatura a 25°C, la agitación a 102 rpm y la aireación a 1VVM por espacio de 144 h, esto siguiendo lo propuesto por Carrasco-Navarro y col., (2011).

El medio de cultivo empleado fue esterilizado durante 15 min a 121°C y ajustado al valor de pH inicial que fuera necesario con la ayuda de HCl o NaOH según el caso,

ambos reactivos en una concentración de 0.1N, se inoculó con la suspensión de esporas a las condiciones mencionadas en el apartado anterior.

5.1.3 Evaluación del efecto de los factores nutricionales y el pH en la producción de quitinasas en cultivo sumergido

Se probaron 2 medios de cultivo, uno de ellos fue el medio mineral (QMM) reportado por Rocha-Pino y col., (2011) y el otro el medio Czapeck (QMC) con algunas modificaciones según lo reportado por De la Cruz y col., (1992), los medios presentaron variaciones entre ellos en lo que respecta a las fuentes de nitrógeno y su composición es mostrada en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Composición del medio Czapeck modificado

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
NaNO ₃	3.7
K ₂ HPO ₄	3
MgSO ₄	0.5
FeSO ₄	0.096
KCl	0.5
Quitina coloidal	10, 30
pH	6

Tabla 2. Composición del medio Mineral

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
K ₂ HPO ₄	2.8
MgSO ₄	1.38
CaSO ₄	0.48
FeSO ₄	0.22
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5
CaCl ₂	0.48
NaH ₂ PO ₄	1.67
Extracto de levadura	1
Quitina coloidal	10,30
pH	6

Con la finalidad de evaluar el efecto del tipo y la cantidad de la fuente carbono, se probaron quitina coloidal y quitina cruda en concentraciones de 10 (QMC10, QMM10)

y 30 (QMC30, QMM 30) g/L en cada uno de los medios. Mientras que, para evaluar el efecto del pH en la producción de quitinasas, se realizaron cultivos manteniendo el pH fijo a 6 y otros cultivos variándolo, manteniendo el pH a 5 por espacio de 72 h y, posteriormente, aumentando en una unidad cada 24 h hasta llegar a pH 8 donde se mantuvo por espacio de 24 h. El control de pH se realizó con la ayuda de HCl y NaOH 1N y se realizaron muestreos cada 24 horas para la determinación de proteína en los sobrenadantes, actividades quitinolíticas de Nhasa y Endoquitinasa y actividad proteolítica neutra.

5.1.4 Preparación de Quitina coloidal

La preparación se basó en el método de Pegg (1988), el cual consiste en disolver quitina con HCl concentrado a 0 °C bajo agitación continua hasta obtener una consistencia ligeramente viscosa. El líquido obtenido se centrifugó a 12700g durante 15 minutos en un equipo Thermo Scientific Legend XTR (EUA). La pasta obtenida se neutralizó mediante lavados con agua destilada y NaOH 0.4 M alternados con centrifugación después de cada lavado.

5.1.5 Obtención del extracto enzimático (E.C.E)

El medio de cultivo final, así como las muestras tomadas cada 24 horas durante la fermentación, se centrifugaron a 4°C y 12,700g en un equipo Thermo Scientific Legend XTR (EUA). El sobrenadante se filtró con papel filtro Whatman No. 40, para retirar los residuos de quitina y micelio presentes en la fracción líquida. Este fue tratado como E.C.E. y refrigerado a 4°C hasta su análisis y purificación.

5.1.6 Análisis de los extractos enzimáticos

5.1.6.1 Determinación de Nhasa

La presencia de actividad *Nhasa* se determinó en los extractos enzimáticos usando *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (*p*NAG) (Sigma Aldrich, EUA) como sustrato; se añadieron 200 μ l del extracto enzimático, 200 μ l de amortiguador de citratos fosfatos 0.2 M pH 5.6, posteriormente se agregó 200 μ l del sustrato *p*NAG a una

concentración de 1.0 mg/ml, se incubó a 37°C durante una hora con agitación (180 rpm). La reacción se finalizó agregando 1 ml de NaOH 0.02M a las muestras y por último se midieron en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Spectronic Genesis 6, EUA) a 400 nm de absorbencia, para realizar la estimación del *p*-nitrofenol liberado empleando una curva patrón mostrada en el Anexo 1 (Coudron y col., 1984). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por ml de enzima por minuto bajo las condiciones específicas (Tronsmo y Harman, 1993).

5.1.6.2 Determinación de Endoquitinasa

La actividad Endoquitinasa se determinó por la reducción de la turbidez de una suspensión de quitina coloidal al 1% (p/v), en amortiguador de fosfatos 50mM a pH 6.7. Se mezclaron 500 μ l de suspensión de quitina con el mismo volumen del extracto enzimático, se incubó a 30 °C por 24 horas y a una velocidad de agitación de 180 rpm para el caso de las muestras, mientras que para los testigos se realizó el mismo proceso pero sin realizar el paso de incubación, posteriormente la mezcla se diluye con 5 ml de agua y se agita vigorosamente para finalmente leerse a 510 nm. El espectrofotómetro fue calibrado con agua destilada. La actividad fue calculada como el porcentaje de la reducción en la turbidez relativa a una suspensión similar que contiene agua en lugar del extracto enzimático. Una unidad de enzima (U) se define como “*la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina en un 5%*” (Tronsmo y col., 1996).

5.1.6.3 Determinación de proteasas neutras (Prot)

La actividad proteolítica se determinó mezclando 75 μ L del extracto enzimático con 500 μ L de sustrato siendo este una solución de caseína al 1% p/v en un amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7. La mezcla se incubó por 1 hora a 30°C con agitación de 180 rpm, se adicionó 1mL de ácido tricloroacético al 5% para detener la reacción y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm, por último se determinó la absorbencia a 280nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la

cantidad de enzima que aumenta 0.001 unidades de absorbencia por minuto al sustrato con respecto a un testigo (Kunitz, 1947).

5.1.6.4 Determinación de proteína por Lowry-Peterson

Para la cinética del cultivo sumergido, la determinación de proteína se realizó por el método de Lowry-Peterson (1977), empleando seroalbúmina bovina como estándar. El método consistió en la adición de 1mL de reactivo de Lowry A a un 1mL de muestra previamente centrifugada, se mezclaron y se incubaron por 10 min a 25°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 25°C se determinó la absorbencia a 750 nm. (Anexo 2).

5.1.6.5 Determinación de proteína por el método de Bradford.

Para el protocolo de purificación del E.C.E. la determinación de proteína se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Bradford (1976), en la modalidad de microensayo, donde 160µL de muestra se mezclaron con 40µL del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, Protein Assay), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbencia a 595nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante una curva estándar utilizando seroalbúmina bovina (Anexo 3).

5.1.6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Para la determinación de la masa molecular de las proteínas presentes en los extractos enzimáticos así como para darle seguimiento a cada una de las etapas de purificación se realizaron geles de electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) según lo propuesto por Laemmli (1970) en donde las condiciones de eléctricas fueron de 150 V por alrededor de 1 hora, el gel de concentración fue al 5% mientras que el de separación fue al 12%.

La tinción de los geles se realizó mediante tinción de plata (Biorad, EUA) y se emplearon marcadores de amplio rango Precision Plus Protein Standard Unstained

(Biorad, EUA). Finalmente se realizó un análisis de las bandas por densitometría empleando el programa ImageJ del NIH (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

5.1.6.7 Zimograma.

Se emplearon geles de poliacrilamida en condiciones semidesnaturalizantes donde la muestra se puso en contacto con β -mercaptoetanol pero no fue sometida a calentamiento. Al gel se le agregó como sustrato 0.01% (p/v) de 4-metilumbeliferil-*N*-*N*-acetil- β -D-glucosamina para el caso de la actividad Endo y 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosamina para la actividad Nhasa (Sigma Aldrich). Después de la electroforesis, el gel se sumergió en 0.1M de amortiguador de acetato de sodio a pH 5.0 y 1% (v/v) de Tritón X-100 en agua desionizada, a continuación se incubó con agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente con la finalidad de remover el SDS. Los geles se transfirieron a amortiguador de acetato de sodio y se incubaron a 37°C para dar lugar a la reacción de hidrólisis quitinolítica. La presencia de actividad enzimática se visualizó bajo iluminación ultravioleta como la presencia de zonas acromáticas usando un transiluminador UV de la marca Biorad (Rocha-Pino et al., 2009).

5.2 Purificación del extracto enzimático

Para la purificación del E.C.E. se empleó el siguiente protocolo de purificación basado en lo propuesto por Carrasco-Navarro y col., (2011):

7.2.1 Precipitación con sulfato de amonio.

Se adicionó sulfato de amonio 20, 40, 60, 80 y 100 % de la concentración de saturación, para determinar en donde precipitan las actividades enzimáticas (Nhasa y Endo). El extracto en presencia del sulfato de amonio se dejó en agitación por 12 horas a 4°C, se centrifuga durante 45 min a 10,000 rpm y 4°C, recuperando el precipitado.

5.2.1 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

La fracción precipitada con sulfato de amonio fue resuspendida en 80 mL de amortiguador 0.05mM Tris-HCl-0.15 M NaCl a pH 7.8 y se le adicionó 4% de Triton X-100, posteriormente se inyectó a una columna de Sefacril S-100 26/60 High resolution (GE Healthcare, EUA) equilibrado y eluyendo con el mismo amortiguador a un flujo isocrático de 1.3 mL/min, la cromatografía fue monitoreada a una absorbencia de 280nm y se colectaron fracciones de 5 mL. Todas las fracciones colectadas fueron analizadas en cuanto a su actividad Nhasa y Endo, así como a su contenido de proteína.

5.3 Modificación de quitinas para hidrólisis enzimática

La quitina, previamente homogenizada a un tamaño de partícula de 177µm fue purificada por la metodología de Cira y col., (2002) la cual consiste en una desmineralización seguida de un proceso de desproteinización empleando HCl y NaOH, ambos a una concentración de 0.4 M en una relación 1:15 quitina/reactivo con agitación leve por espacio de 1 hora a temperatura de 25 °C, una vez purificada la quitina se le realizaron las siguientes modificaciones estructurales con la finalidad de facilitar la hidrolisis enzimática:

5.3.1 Ultrasonicación

La quitina suspendida en amortiguador de citrato-fosfato pH 6 fue ultrasonicada durante 20 min en un ultrasonicador Branson 3510 a una frecuencia de 40 kHz, la concentración de quitina pura fue de 2.5 mg/mL (Barreto-Cardoso y col. 2001)

5.3.2 Desacetilación heterogénea por el método FPT (freezing-degassing-thawing)

Propuesto por Lamarque y col., (2005), consistió en un proceso de desacetilación heterogéneo por multietapas en presencia de NaOH al 50% (p/v) donde el reactor de desacetilación fue sumergido en nitrógeno líquido buscando la congelación del medio, posteriormente se realizó una desgasificación mediante bomba de vacío y por último se permitió la descongelación a temperatura ambiente esto se repitió 6 veces

para garantizar la desgasificación, posterior al último ciclo de FPT el reactor se sumergió en un baño de aceite precalentado hasta que el medio alcanzó 100 °C y se dejó por 20 min para lograr la desacetilación.

5.3.3 Fibrilación de quitina

Siguiendo la metodología de Ifuku y col., (2009) con algunas modificaciones, donde la quitina purificada se puso en contacto con agua al 1% de ácido acético p/v para ajustar el pH a 3 y posteriormente se licuó en una licuadora doméstica en repetidas ocasiones.

5.3.4 SE (Explosión por vapor)

Este pretratamiento se basó en el trabajo de Li y col., (2007) con ciertas modificaciones, el proceso consistió en colocar la quitina dentro de una celda de acero y ponerla en contacto con las cantidades de agua correspondientes para cada condición evaluada, la celda de acero se encontraba contenida dentro de un reactor de 100 mL de acero inoxidable diseñado para soportar altas presiones, este cuenta con una chaqueta de cerámica para poder llevar a cabo el calentamiento, así como con un manómetro y dos termopares independientes para poder monitorear las condiciones de presión y las temperaturas presentes tanto dentro del reactor como en la chaqueta cerámica, está equipado también con dos válvulas de alta presión y un disco de ruptura (válvula de seguridad) En la Figura 6 se puede apreciar el reactor empleado para el tratamiento: Se realizaron 3 etapas de experimentación en las que se evaluaron los parámetros que han sido considerados como determinantes en el tratamiento de SE tales como temperatura, presión, tiempo de residencia y contenido de humedad.

5.3.4.1 Evaluación del efecto de la concentración de quitina y tiempo de residencia

En esta primera etapa se empleó el diseño experimental mostrado en la Tabla 3, tomando como fuentes de variación la relación quitina/agua así como el tiempo de residencia, estos fueron tomados al alcanzar las condiciones de temperatura

establecidas, la cual fue de 180°C, cabe mencionar que en esta primera etapa la presión no fue controlada y solamente fue monitoreada para todos los tratamientos. Una vez que se cumplió el tiempo establecido a las condiciones buscadas para cada experimento se procedió a realizar la descompresión del reactor, abriendo rápidamente la válvula que se encuentra en la parte superior del reactor y colectando los licores obtenidos en un recipiente colocado en hielo para su posterior análisis.

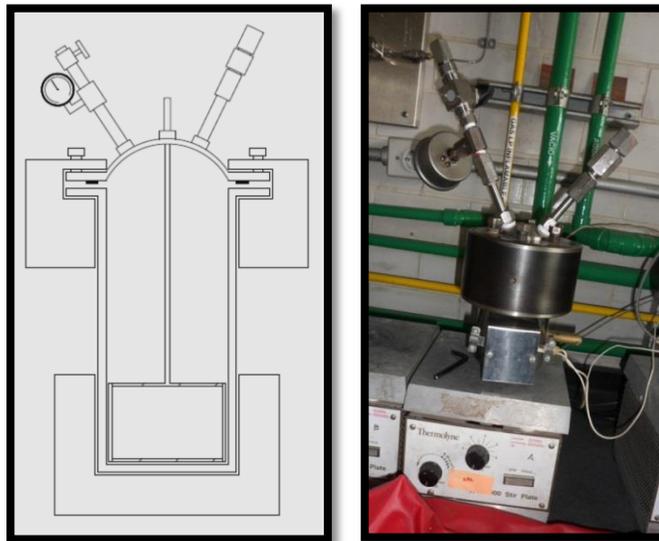


Figura 6. Reactor empleado en el pretratamiento de SE

Tabla 3. Evaluación del efecto de la concentración de quitina y tiempo de residencia en SE

Concentración (g/mL)	Tiempo de residencia (min)
0.1	1
0.2	3
0.4	5
2	8

5.3.4.2 Evaluación del efecto de la temperatura (T) de SE

En una segunda etapa, habiendo ya fijado el tiempo de residencia y la relación quitina:agua, se procedió a evaluar el efecto de la temperatura, esto se llevó a cabo probando temperaturas superiores a 180°C (ya que esta T fue empleada en la etapa anterior), estas temperaturas fueron de 200°C, 220°C y 240°C, de igual forma libre la presión no fue controlada y solo fue monitoreada.

5.3.5 Expansión rápida de R134a supercrítico

En este pretratamiento se llevó a cabo la evaluación del efecto de la presión y la temperatura en el proceso de expansión de rápida de R134a, el mismo reactor empleado para SE fue presurizado con R134a en condiciones supercríticas (scR134a) es decir superiores a T_c 101 °C y T_c 40 bar. El reactor fue alimentado con el fluido orgánico con la ayuda de una bomba de alta presión ISCO 100DX (EUA) conectada a los reactores antes usados en la SE. La T y P finales de trabajo se establecieron al igual que en la experimentación con SE, con ayuda de la chaqueta calefactora cerámica con doble control externo de temperaturas. Se siguió el diseño experimental planteado en la tabla 4 donde se probaron 3 presiones, siendo estas de 40,50 y 60 bar con la temperatura fijada para SE (180°C) y una temperatura por debajo de esta (115°C). La relación quitina/agua fue de 0.1g/mL y el tiempo de reacción fue de 8 minutos, una vez transcurrido el tiempo se realizó la despresurización rápida del reactor, tal como se realizó en el proceso de SE.

Tabla 4. Condiciones para la evaluación de la expansión rápida de scR134a

Muestra	P (bar)	T (°C)
CF4	40	115
CF5	50	115
CF6	60	115
CF7	40	180
CF8	60	180
CF9	50	180

5.4 Caracterización de quitinas modificadas estructuralmente

5.4.1 Grado de acetilación (DA)

Para la determinación del grado de acetilación de las quitinas modificadas se realizó una RMN ^1H , para la preparación de la muestra se siguió lo propuesto por Percot y col., (2003) con la finalidad de depolimerizar completamente la muestra para lograr su solubilización, se pesaron 7-10 mg de quitina y se agregaron 200 μL de DCI en viales de vidrio con tapa, la mezcla se dejó con agitación magnética durante 8h a 50 $^{\circ}\text{C}$ en baño maría, una vez transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 50 μL de y se mezcló con 650 μL de D_2O , se filtró por membranas de nylon de 0.45 μm y se procesó en un espectrómetro Bruker AC 200 a 200Mhz para ^1H y ^{27}Al a 298 $^{\circ}\text{K}$. El grado de acetilación de las muestras se calculó según lo propuesto por Hirai y col., (1991) ecuación 2.

$$DA(\%) = \frac{\frac{1}{3} I_{CH_3}}{\frac{1}{6} H_2 - H_6} \cdot 100 \quad (2)$$

5.4.2 Índice de cristalinidad (I_{CR})

El I_{CR} de los sustratos fue determinado por difracción de Rayos X en un difractómetro (Bruker D8 Advance) con una radiación incidente $\text{CuK}\alpha$ y una longitud de onda $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ en el rango de 2θ 3 – 80 $^{\circ}$ con un tamaño de paso de 0.02 mm. El I_{CR} de las muestras se determinó según lo reportado por Focher y col., (1990) usando las intensidades de los picos (110) alrededor de 2θ de 20 $^{\circ}$ (correspondientes a la zona cristalina) y a 2θ de 16 $^{\circ}$ (zona amorfa) de acuerdo a la ecuación. 3.

$$I_{CR} = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100 \quad (3)$$

5.4.3 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó con un equipo zeta-sizer nano (Malvern, Inglaterra) a partir de una suspensión de 10mg/mL de quitina en dimetilacetamida con 5% de cloruro de Litio, la suspensión fue agitada magnéticamente por 24 horas previas a su determinación.

5.4.4 FTIR

Las muestras de quitina se analizaron con un accesorio ATR (Perkin Elmer, USA) acoplado al equipo de FTIR (Perkin Elmer model 100, Inglaterra) para identificar la naturaleza de los enlaces. Previo al análisis, fueron secadas a 80°C y homogenizadas a 106 µm. Los espectros de ATR-FTIR se obtuvieron a 24°C y 30% de humedad relativa, colocando las muestras en la platina con aditamento para polvos del espectrofotómetro y aplicando presión con el brazo mecánico, los espectros obtenidos fueron el promedio de 60 escaneos en un intervalo de 650-4000cm⁻¹ (Nwe y col., 2008).

5.4.5 Procesamiento de muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos 0.1M a pH 7.4 durante 24 h, posteriormente se les agregó tetraóxido de osmio en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4, se dejaron reaccionar por 2h y se deshidrataron en series de etanol en concentraciones de 30 a 100% en pasos de 30 min, posteriormente se cubrieron con oro y se observaron en microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Tokio) (Zulfiqar y col., 1996).

5.5 Condiciones de hidrólisis enzimática de quitinas modificadas

La hidrólisis se realizó según el método propuesto por Ramirez-Coutiño y col., (2006) con algunas modificaciones, en un medio acidificado con una solución amortiguadora de citratos fosfatos pH 6 al que se le agregó azida de sodio al 0.02% como agente antimicrobiano en un volumen de reacción de 2 mL, la concentración de substrato fue

de 2.5 mg/mL y la concentración de enzima de 0.1 U/mL, empleando agitación constante con una velocidad de 200 rpm y temperatura de 40°C.

Finalmente, el medio se centrifugó por 10 min a 5000 rpm, recolectando el sobrenadante y filtrándolo a través de membranas de nylon de 0.45 μm y refrigerándolo a 4°C, al sobrenadante se le determinó la cantidad de oligosacáridos producidos mediante la metodología de azúcares reductores (AR) propuesta por Miller (1959) empleando una curva de calibración en la que se usó GLcNAc como estándar (Anexo 4).

5.6 Producción de COS por vía química

La obtención de COS mediante vía química se realizó por acetólisis de quitina siguiendo el método propuesto por Kurita y col., (1993) el procedimiento constó de una etapa de hidrólisis de donde se puso en contacto 8.5 g de β -quitina con una mezcla de ácido sulfúrico (12.5 mL) con anhídrido acético (125 mL) a 55°C durante 30 min hasta conseguir una solución rojiza, posteriormente la temperatura se redujo hasta 35 °C y se dejó en agitación durante 24 h, posteriormente se vertió la mezcla en agua fría y se ajustó el pH entre 3 y 4 con la ayuda de 62.5 g de acetato de sodio por último se realizó una extracción con disolventes y evaporación bajo presión reducida lo cual dio como resultado un jarabe de tono amarillento, para la obtención del polvo este jarabe fue secado a 80°C por espacio de 24 horas.

5.7 Análisis del DP y F_A de los COS obtenidos por la hidrólisis de quitinas modificadas

5.7.1 MALDI-TOF

El producto de reacción de las hidrólisis enzimáticas se ultrafiltró por una membrana con un tamaño de corte de 5 kDa (Millipore, USA), los permeados fueron liofilizados y la fracción obtenida de este paso fue mezclada en metanol/agua 1:1, posteriormente 0.5 μL de esta solución fueron mezclados con 2 μL de matriz (25 g/L de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en acetonitrilo, conteniendo 0.1% vol/vol de ácido trifluoroacético).

Las muestras se secaron a temperatura ambiente y los espectros fueron obtenidos usando un equipo MALDI-TOF/TOF 4800 Plus Analyzer (Applied Biosystems) equipado con un láser YAG (Y3Al5O12) de 355 nm, los análisis se llevaron a cabo a 6500 mv, en modo reflectrón. Los resultados se analizaron empleando una base de datos en la que se tomó en cuenta el incremento del DP y los grupos acetilo presentes, así como los aductos correspondientes Na y K (Anexo 5 y 6).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Efecto del medio de cultivo y la concentración de fuente de carbono en la producción de proteasas y quitinasas

La composición del medio de cultivo es uno de los factores que favorecen o limitan la producción de enzimática, específicamente de las quitinasas extracelulares provenientes de microorganismos. La optimización del medio es importante, no solo para maximizar los rendimientos y la productividad, sino también para minimizar los costos de producción (Ghaem y col., 2010). En la Figura 7 se muestra el efecto del medio de cultivo y la cantidad de quitina en la producción de quitinasas y proteasas. El medio QMC10 presentó una producción de Nhasas y Endo significativamente más altas que las obtenidas con los otros medios de cultivo evaluados, siendo estas de 0.012 (144 h) y 5.57 U/mL (96 h) respectivamente, así como una actividad de proteasas de 0.42 U/mL. Los tiempos en los que se encuentra las producciones máximas de Endo y Nhasa representan el comportamiento común en el que se producen estas enzimas, donde los productos obtenidos de la hidrólisis de Endo son los substratos empleados por lo cual la Endo precede la actividad de Nhasa.

Por otro lado, la producción de proteasas mayor se encontró en el medio QMM10 siendo de 0.56 U/mL. La actividad proteolítica presente en los cultivos (QMM30, QMC10 y QMC30) no presentaron diferencia significativa entre ellos y los tiempos de producción máxima se encontraron a las 96 h en todos los casos.

Los medios QMM30 y QMC30 presentaron actividades Nhasa de 0.0027 y 0.0076 U/mL y de Endo de 2.32 y 1.22 U/mL respectivamente, siendo estas significativamente menores que las obtenidas con el medio QMC10, esto puede atribuirse a la mayor cantidad de carbono presente en el medio (30 g/L). Esto concuerda con lo reportado por Giuliano y col., (2001), quienes encontraron que los niveles altos de amonio y glucosa reprime la expresión y secreción de enzimas quitinolíticas, a excepción de la actividad Nhasa, que se si producen pero solo en

niveles muy bajos; sin embargo, cuando ambos nutrientes (nitrógeno y carbono) se encuentran limitados la actividad enzimática se incrementa.

Se ha encontrado que la regulación de la expresión de Nhasa y Endo es diferente, ya que, mientras la Nhasa se induce por COS de masa molecular baja y sus productos, la expresión de las Endos no se ve directamente inducida por sustratos quitinolíticos sino, más bien, por la limitación de carbono y condiciones de estrés, al grado de que el efecto inductor de la quitina coloidal puede reprimirse cuando la fuente de carbono si está presente en altas concentraciones (Viterbo y col., 2002, Mach y col. 1999).

Barreto y col., (2004) mencionan que la producción de enzimas quitinolíticas está muy regulada por la concentración de la fuente de carbono, encontrando que ésta pueden tener una regulación dual, lo que significa que concentraciones bajas puedan inducir la producción y secreción de enzimas quitinolíticas, mientras que concentraciones altas pueden tener un efecto represor, tal es el caso de QMC 10 y QMC30 donde se aprecia que, a pesar de ser el mismo medio de cultivo, el hecho de incrementar la cantidad de quitina coloidal provocó la disminución de la producción de quitinasas, específicamente disminuye de 0.012 y 5.57 a 0.007 y 1.22 U/mL para Nhasa y Endo respectivamente.

La fuente de nitrógeno fue estudiada por Binod y col. (2007), que probaron varias fuentes tales como extracto de levadura, caseína, peptona, triptona, NaNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, donde el NaNO_3 incrementó la actividad Endo al doble, estos resultados son similares a lo reportado en este trabajo donde el medio enriquecido con NaNO_3 (QMC) presentó los niveles de producción más altos de Endos, el cuales fue de 5.57 U/mL comparado con lo encontrado en el medio QMM10 donde se presentó una actividad Endo de 2.66 U/mL.

Los resultados encontrados en el presente trabajo difieren de lo reportado por Gohen y col. (2006) y por Lopes y col. (2008) quienes encontraron que las fuentes de nitrógeno inorgánicas no aumentan la producción de enzimas quitinolíticas, mientras que las fuentes orgánicas, como la peptona, incrementaron la actividad quitinolítica de *Moniliophthora pernicioso*, principalmente cuando se encontraba quitina coloidal en el medio como inductor.

Jami y col.,(2008) también probaron varias fuentes de nitrógeno encontrando que el sulfato de amonio fue el más favorable para la producción de quitinasas, en este trabajo QMM10 y QMM30 contienen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuentes de nitrógeno en concentración de 7.5 g/L siendo esta más elevada que la concentración empleada en dicha investigación (1.5 g/L), por lo tanto, la cantidad de sulfato de amonio podría ser la que este limitando la producción de enzimas quitinolíticas. Caso similar es lo reportado por Nawani y col., (2005) quienes mencionan que un exceso en los elementos traza así como de sales, en general, puede llegar a suprimir el crecimiento de algunas cepas como *Streptomyces viridochromogenes*.

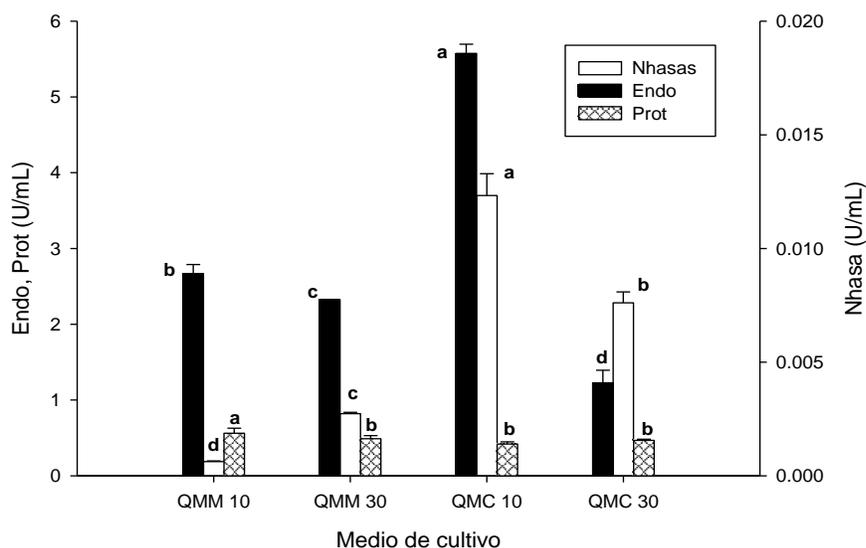


Figura 7. Efecto del medio de cultivo y cantidad de quitina en la producción de proteasas neutras y quitinasas. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

Efecto de la fuente de carbono en la producción de quitinasas y proteasas
Además de la quitina, existen varias fuentes de carbono que pueden actuar como inductores; entre estos están glucosamina, *GlcNAc*; quitobiosa y quitoligosacáridos. La respuesta al inductor depende de cada microorganismo, debido a que ciertas fuentes de carbono funcionan como inductores para la producción de quitinasas mientras que, para otros microorganismos, la misma fuente de carbono puede actuar

como represores, tal es el caso de la glucosa que reprime la producción de las quitinasas (Matsumoto, 2004).

Los hongos entomopatógenos, como *L. Lecanii*, mejoran su crecimiento y esporulación cuando tienen monosacáridos y disacáridos tales como la sacarosa, celobiosa, manosa y fructosa como fuentes de carbono, mientras que los polisacáridos no promueven la producción de biomasa (Manhong y XingZhong 2006). Sastoque y col. (2007) reportan que la actividad quitinolítica puede inducirse por sustratos químicamente definidos como es el caso de la quitina coloidal comercial así como desechos industriales más complejos como el extracto de camarón, ambos incrementaron la producción de enzimas quitinolíticas cuando se usaron en concentraciones de 15 y 10% para quitina coloidal y extracto de camarón respectivamente.

Con base en las actividades Nhasa y Endo altas, así como la actividad de proteasas baja del medio QMC, fue seleccionado para probar el efecto de la fuente de carbono, evaluando la quitina coloidal y la quitina cruda. La Figura 8 muestra los resultados de las actividades volumétricas usando medio QMC y ambos tipos de quitina. Los medios suplementados con quitina cruda las actividades Nhasa más bajas, específicamente 0.0007 y 0.0004 U/mL para QMC10 y QMC30 respectivamente, comparados con los valores obtenidos en el medio en el que se agregó quitina coloidal como fuente de carbono, donde se obtuvo 0.012 y 0.008 U/mL para QMC10 y QMC30 respectivamente.

Las actividades Endo obtenidas en el medio con quitina cruda fueron también menores (1.81 y 1.49 U/mL para QMC10 y QMC30 respectivamente) que las obtenidas con quitina coloidal, siendo de 5.57 y 1.22 U/mL para las concentraciones de 10 y 30 g/mL respectivamente. Estos resultados pueden ya que la quitina cruda es un sustrato complejo, insoluble en agua y que tiene que ser hidrolizado a COS para ser introducida en la célula antes de ser asimilada, lo que no ocurre con la quitina coloidal ya que, durante su preparación, se utiliza HCl concentrado, que hidroliza parcialmente la quitina, obteniéndose una superficie de contacto mayor. (Howard y col., 2003; Lopes y col., 2008).

Nawani y col., (2002, 2005) probaron tanto quitina comercial en hojuelas como quitina coloidal, encontrando que el medio suplementado con quitina coloidal presentó actividad quitinolítica rápidamente (a partir de las 48 h) alcanzando su máximo en un tiempo de 96 h. Ésto se atribuyó a que este sustrato presenta fácil acceso para el microorganismo, posteriormente, hubo un descenso en la actividad enzimática, que fue atribuido al agotamiento del sustrato. Al emplear quitina en hojuela, los tiempos de producción de quitinasas se incrementaron, alcanzando el máximo a las 264 horas, una vez que las hojuelas estaban completamente disueltas en el medio. En otros trabajos se ha reportado que la quitina coloidal, al ser un sustrato fácilmente asimilable, puede llegar a reprimir la producción de quitinasas ya que se pueden ir generando productos de hidrólisis de la quitina que inhiben la actividad quitinolítica. Es importante mencionar que dependiendo del tipo de quitina que se emplee es el patrón de quitinasas producidas en el medio ya que se sugiere que el microorganismos detecta el tipo de fuente de carbono que se está empleando y produce las quitinasas apropiadas para poder degradarla (Khan y col., 2010).

Consistente con lo mencionado anteriormente, Fenice y col. (1996) encontraron actividades quitinolíticas mayores con quitina cruda pero los picos de actividad aparecen en tiempos más prolongados (120h), también reportan que la quitina cruda favoreció el crecimiento de hongo, asociado con mayor producción de proteína en el extracto y, por lo tanto, una actividad específica menor.

En nuestro caso, los resultados encontrados difieren de lo anterior en el tiempo de producción enzimática máxima, ya que las actividad más elevadas de Nhasa se encontraron a las 144 h con el uso de quitina coloidal mientras que con el uso de quitina cruda se encontraron a las 120 h. En el caso de las Endos los cultivos suplementados con quitina coloidal presentaron las máximas actividades a las 96 y 144 h para las concentraciones de 10 y 30 g/L respectivamente, mientras que para los cultivos donde se empleó quitina cruda los máximos aparecieron a las 72 horas (actividades máximas descritas anteriormente). Cabe mencionar que el uso quitina cruda arrojó siempre actividades enzimáticas significativamente menores a las obtenidas con quitina coloidal, lo cual puede sugerir que los valores obtenidos para

quitina cruda no eran las producciones máximas y que estos podrían aparecer en tiempos más prolongados.

En cuanto a la producción de proteasas, los medios enriquecidos con quitina coloidal produjeron 0.42 y 0.46 U/mL (QMC10 y QMC30 coloidal respectivamente) ambas a las 96 horas, lo cual fue similar con la producción de proteasas encontrada en el cultivo con quitina cruda a 30g/L (QMC30 cruda) la cual fue de 0.43 U/mL a los mismos tiempos que los cultivos con quitina coloidal, por su parte la menor cantidad de proteasas fue obtenida con el medio QMC10 cruda presentando 0.12 U/mL en tiempos a tiempos iniciales de la fermentación.

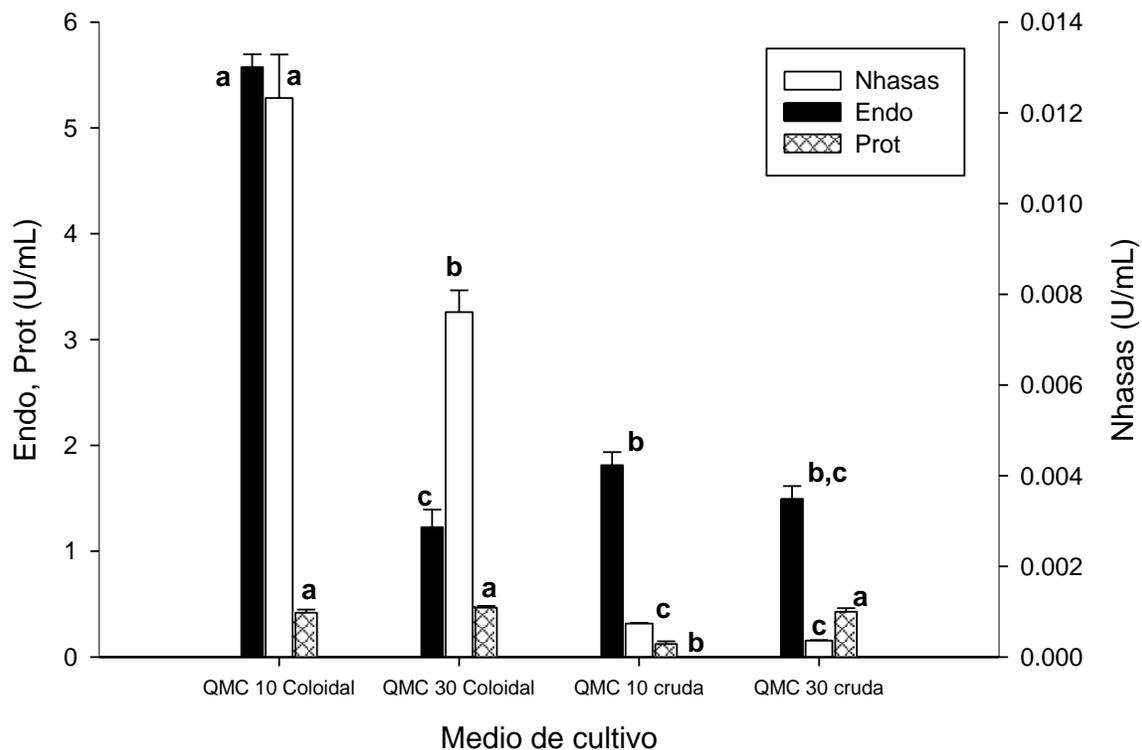


Figura 8. Efecto del tipo de fuente de carbono en la producción de quitinasas y proteasas neutras de *L. lecanii*. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

6.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Una vez evaluadas las fuentes de carbono y seleccionado el mejor medio de cultivo, se procedió a evaluar el efecto del pH del medio sobre la actividad enzimática Nhasa y Endo, ya que puede afectar funciones de la membrana celular, morfología, estructura celular, solubilidad y asimilación de nutrientes y la formación de metabolitos. (Fang y Zhong, 2002). Las actividades enzimáticas del cultivo con pH variable y fijo se muestran en las Figuras 9 y 10 respectivamente, donde los valores de actividad quitinolítica más altos se encontraron variando el pH del cultivo a las 96 h alcanzando 0.03 U/mL para Nhasa y 2.26 U/mL para Endo. Contrario a esto, el cultivo con pH fijo a un valor de 6, presentó una producción de quitinasas menor y sus puntos de actividad máxima para Nhasa se encontraron en un tiempo mayor (48h más), mientras que la actividad máxima de Endo se mantuvo a las 96 h, específicamente se obtuvieron 0.012 y 5.57 U/mL para Nhasa y Endo respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ramírez-Coutiño y col. (2010) usando *Verticillium fungicola*, donde la producción de quitinasas extracelulares aumentó cuando el pH del medio de cultivo se incrementó de 5 a 8, encontrando sus actividades máximas entre las 132 y 144 h.

Quijano-Govantes y col. (2004) obtuvieron resultados similares, mostrando un incremento significativo en la producción de enzimas quitinolíticas cuando se llevaba a cabo variaciones en el pH, con la diferencia de que ellos reportan valores de pH óptimos de 8 y 7 para la producción Nhasa y Endo respectivamente, caso similar es el reporte de Ramírez-Coutiño y col., (2010) quienes reportan pH de producción óptima de 7 y 8 para Nhasa y Endo respectivamente, en nuestro caso los picos de producción de ambas enzimas coincidieron a pH 6 como se mencionó anteriormente.

Durante el cultivo donde modificó el pH, se encontraron las actividades máximas a un pH 6, ya que al incrementar el pH a 7 y 8 las actividades quitinolíticas empezaron a disminuir drásticamente alcanzando valores de 0.004 y 0.93 U/mL para Nhasa y Endo respectivamente, aunado a esto, la actividad proteolítica empieza incrementó a

las 120 h alcanzando su máxima producción la cual fue de 1.105 U/mL. Este comportamiento de disminución puede ser atribuido a que las proteasas podrían estar hidrolizando a las quitinasas. Cabe mencionar que aunque las actividades volumétricas de Endo, son mayores en el medio cuando el pH se mantiene fijo (5.57 U/mL) que cuando hay una variación en el pH (2.26 U/mL), al comparar las actividades específicas (Tabla 5) se justifica y respalda la elección del medio QMC10 con pH variable como las mejores condiciones para producción de enzimas quitinolíticas ya que las enzimas se encuentran con mayor purificación y la cantidad de proteasas también es menor. Las actividades específicas de ambas enzimas quitinolíticas se incrementaron al variar el pH. En el medio con pH variable se produjeron menos proteasas, comparado con los cultivos a pH fijo, aun así, es necesaria la purificación de las quitinasas para eliminar las proteasas del extracto enzimático ya que estas, como se observó anteriormente, podrían hidrolizar a las quitinasas en etapas posteriores durante su aplicación. Cabe mencionar que los tiempos de producción máxima de proteasas se ven retrasados cuando el pH es variable encontrándose a las 120 h mientras que para el caso de los cultivos a pH fijo el pico de producción se encontró a las 96 h, esto es consistente con lo reportado por St. Leger y col., (1996) quienes mencionan que en cultivos de *L. lecanii* empleando medio mineral a pH inicial de 6, encontraron un patrón en donde la proteasas precedieron a las quitinasas y éstas se mantuvieron en niveles basales hasta las 72 h alcanzando sus actividades máximas a las 120h.

Tabla 5. Actividades específicas de enzimas quitinolíticas y proteasas a pH fijo y variable a sus tiempos máximos de producción

Enzima	Actividad Específica (U/mg proteína)	
	pH fijo 6	pH variable
Nhasa	0.029	0.6124
Endo	3.332	47.320
Proteasa	1.59	8.99

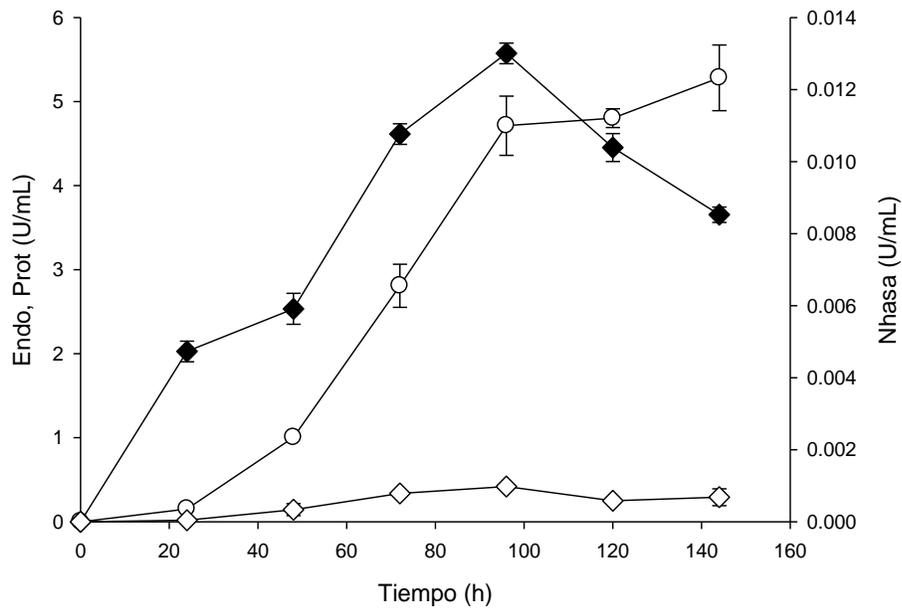


Figura 9. Cinética de la producción de enzimas quitinolíticas de *Lecanii*, en medio QMC10 a pH fijo. Símbolos: Proteasas neutras (◇), Endoquitinasa (◆) y Nhasa (○). La desviación estándar corresponde al promedio de 3 repeticiones.

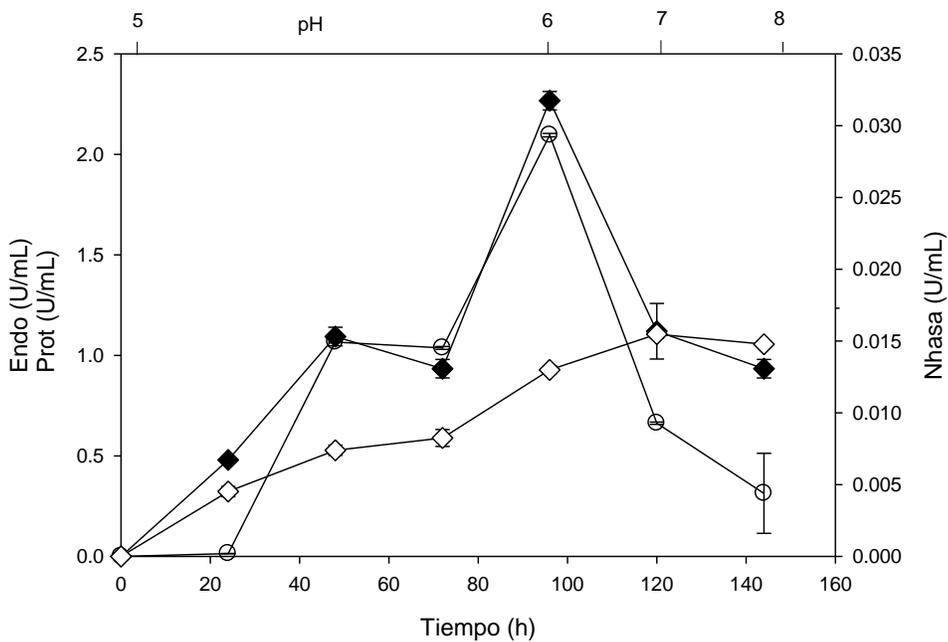


Figura10. Cinética de la producción de enzimas quitinolíticas de *Lecanii*, en medio QMC10 a pH variable. Símbolos: Proteasa (◇), Endoquitinasa (◆) y Nhasa (○). La desviación estándar corresponde al promedio de 3 repeticiones.

Se realizaron geles de electroforesis SDS-PAGE de las cinéticas donde se empleó el medio QMC10 con quitina coloidal variando el pH (Fig.11) mostrando las bandas más intensas alrededor de los 50 y 37 kDa lo cual corresponde a los pesos moleculares de quitinasas según lo reportado por Liu y col.. (2003). Rocha-Pino y col. (2011) quienes encontraron bandas con actividad exoquitinasa de 32 y 50 kDa para cultivos sólidos y bandas de 32 y 45 kDa para cultivo sumergido, ambos suplementados con quitina coloidal. Por otra parte, Barranco-Florido (2009) reporta 3 bandas de proteína con pesos moleculares de 31, 45 y 58 kDa en cultivo sólido empleando un medio con exoesqueletos de camarón.

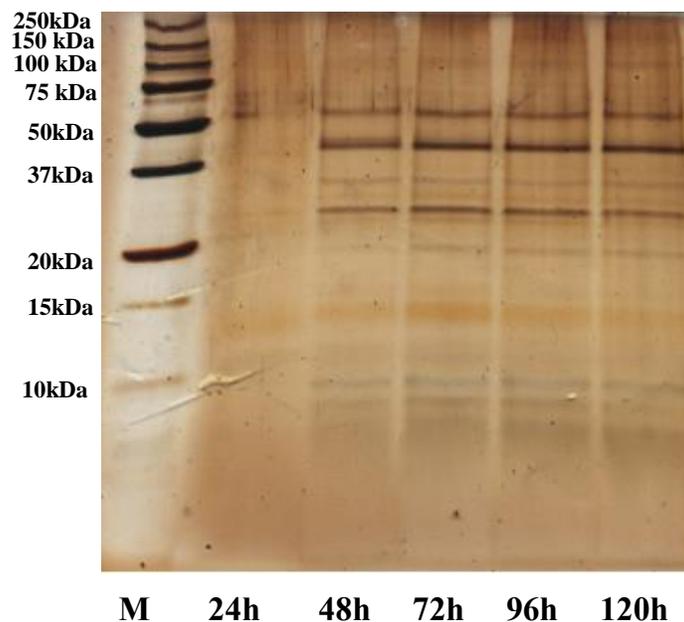


Figura 11. SDS-PAGE de los extractos enzimáticos crudos de *L.lecani* de cinéticas con medio QMC10 variando el pH.

6.3 Purificación parcial de quitinasas

6.3.1 Precipitación con sulfato de amonio

En los extractos crudos enzimáticos las proteínas de interés se encuentran en una solución acuosa de baja salinidad. Al incrementar la concentración de sales en la

solución mediante la adición de sulfato de amonio, en porcentajes entre el 20 y 95%, la proteína comienzan a ceder al intercambio iónico, sustituyendo su interacción con las moléculas de agua por interacciones con iones de amonio y sulfato, de esta manera la proteína disminuye su solubilidad y precipitan. Existen reportes donde la saturación con sulfato de amonio tiene la finalidad de remover ciertos contaminantes tales como polisacáridos, este es el caso de Barghini y col., (2013) emplearon un porcentaje de saturación del 20-80%.

En este caso los porcentajes de saturación probados fueron 20, 40, 60 y 80 buscando aquel en el que la actividad enzimática acumulada fuera la más elevada, en la Figura 12 se observa que el porcentaje de saturación que presenta la mayor actividad es la del 40-60%, siendo esta de 85.2907 U/mg proteína, aun cuando la actividad aparentemente es mayor a 80% de saturación (91.3239 U/mg proteína) estadísticamente no existe diferencia significativa entre ellos, por lo que se decidió trabajar con un porcentaje de saturación del 60% en purificaciones posteriores, buscando emplear la menor cantidad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que fuera posible. Esto es similar a lo reportado por Taylor y col., (2002) quienes reportan que la fracción de 60% de saturación presentó la mayor actividad de Nhasa siendo esta de 199.5 U/mg de proteína, por su parte Carrasco-Navarro (2011) obtiene resultados similares donde la fracción precipitada del 40-60% de saturación presento la mayor actividad enzimática (alrededor de 110 U/mg de proteína) sin haber un incremento significativo con respecto a la fracción precipitada del 60-80%.

El porcentaje de recuperación de la enzima en este paso de purificación fue del 73% lo cual es superior a lo reportado por Wang y col., (2008) quienes emplearon saturación al 90% obteniendo un porcentaje de recuperación del 60%, por otra parte el antecedente directo de este trabajo en cuanto purificación, que es el trabajo de Carrasco-Navarro (2011) reporta un porcentaje de recuperación superior siendo del 98%, en el caso de Taylor y col., (2002) se reporta un 83.7% de recuperación para una quitinasa del hongo *Stachybotrys elegans*, mientras que Tikhonov y col., (2002)

reportan una saturación del 35% recuperando el 95 % de la actividad enzimática inicial esto en la purificación de una quitinasa de *Verticillium chlamydosporium*.

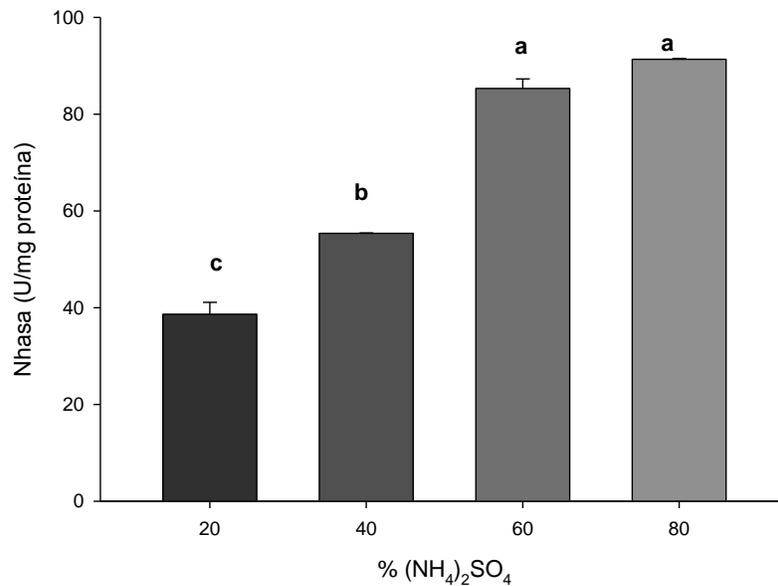


Figura 12. Actividad específica de Nhasa obtenida en medio QMC10 y en saturación con (NH₄)₂SO₄. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey.

6.3.2 Cromatografía de exclusión molecular

La fracción precipitada con sulfato de amonio fue resuspendida en 40 mL del amortiguador 50mM de Tris-0.15 M NaCl con 4% de Triton X-100 esto con la finalidad de ayudar a la solubilización de las proteínas y la resolución de las técnicas de purificación ya que a medida que aumenta la concentración de sal durante la precipitación con (NH₄)₂SO₄ las proteínas exponen sus zonas hidrofóbicas generando la aglomeración de las mismas.

Dicha fracción fue inyectada en la columna de exclusión molecular Sephacryl S-100, los resultados de la elusión se muestran en la Fig. 13, donde se observa que las fracciones con mayor actividad se encuentran entre la 19 y la 23 para ambas enzimas, alcanzando un máximo de 0.195 U/mL (3.75 U/mg de proteína) para la Nhasa y 0.72 U/mL (13.84 U/mg de proteína) para la Endo en la fracción 22 y 21 respectivamente, lo cual nos indica que las enzimas no fueron separadas en esta etapa, siendo esto favorecedor en la aplicación de las quitinasas para la hidrólisis de quitina ya que favorece el sistema sinérgico y consecutivo en el que los productos de hidrólisis de una de las enzimas funcionan como sustrato para la otra.

Durante esta etapa de purificación, la recuperación fue del 8.6% lo cual es un tanto bajo comparado con la literatura, como lo reportado por Kawachi y col., (2001) quienes obtuvieron un rendimiento del 18%, Binod y col., (2005) con una recuperación del 21.4% y Souza y col., (2003) con 74% de recuperación tras filtración en gel, esto se puede atribuir a que el rendimiento está basado únicamente en la recuperación de 5 fracciones (con un volumen de 5 mL cada una) del total que se colectaron durante la cromatografía.

La actividad enzimática es similar a lo reportados por Binod y col., (2005) para una quitinasa de *Penicillium aculeatum*, quien encontró actividad entre 0.18 y 0.203 U/mL en las fracciones obtenidas de exclusión molecular con una columna Sephacryl S-200, por su parte Wang y col., (2008) emplearon la misma columna de exclusión molecular (Sephacryl S-100) para la purificación de una quitinasa de *Pseudomonas* sp TKU015 obteniendo una actividad específica de 0.022 U/mg de proteína lo cual se encuentra por debajo de lo reportado en este trabajo.

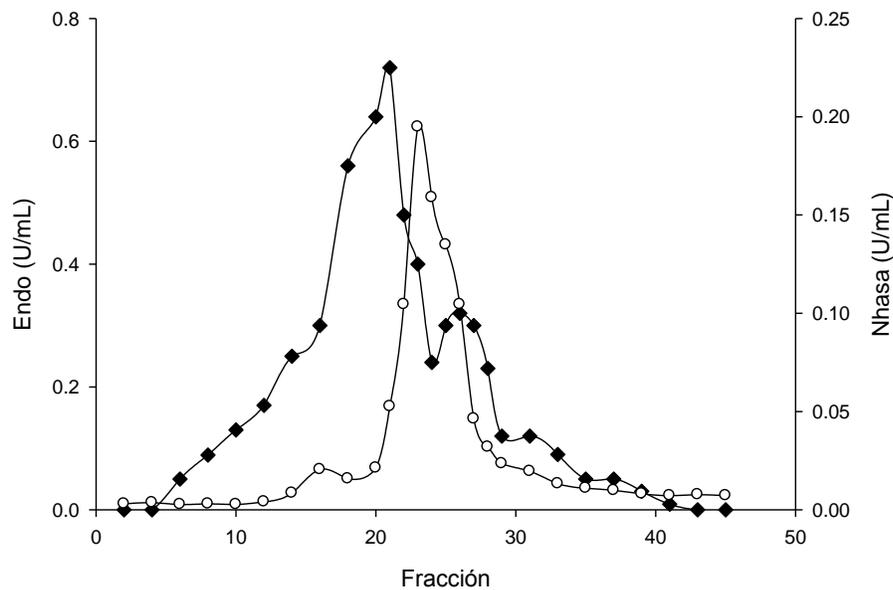


Figura 13. Actividad Nhasa y Endo en fracciones de SEC. Símbolos: Endo (◆), Nhasa (○).

Por último, es importante mencionar que en la etapa del precipitado con sulfato de amonio había presencia de proteasas, específicamente 3.46 U/mL, posterior a la exclusión molecular no se detectaron proteasas en las fracciones, que es el objetivo que se buscaba, eliminar con la purificación parcial, eliminar las proteasas.

6.3.3 SDS-PAGE y Zimogramas

Se realizó coloración de plata en los geles de electroforesis (Figura 14) para observar las proteínas presentes en cada una de las etapas de purificación (E.C.E, precipitación con sulfato de amonio y exclusión molecular). En el E.C.E. se presentan bandas de poca intensidad debido a su baja concentración mientras que las bandas presentes en el precipitado con sulfato de amonio (PP) tienen más intensidad debido a la que fue sometida la proteína en esta etapa; posterior a la separación con la columna de exclusión molecular, prácticamente solo se observan 2 bandas (Figura 15A), una de ellas de 50 kDa y otra de 38 kDa. Las bandas encontradas en los geles corresponden con trabajos previos como el de Carrasco y col., (2011), a una Nhasa y a una Endo respectivamente. Por su parte Rocha-Pino y col., (2011) detectaron

bandas de actividad quitinolítica a 32 y 45 kDa obtenidas en cultivo sumergido de *L. lecanii* en un medio suplementado con quitina, caso similar es lo reportado por Bing-Lang y col., (2003) quienes reportan bandas correspondientes a quitinasas a 35 y 50 kDa en condiciones similares a las mencionadas en el trabajo anterior. Wang y col., (2008) mencionan que los pesos moleculares de la mayoría de las quitinasas de origen microbiano están entre los 40-65 kDa rango dentro del cual se encuentran los pesos de las enzimas purificadas en este trabajo confirmando el hecho de que sean enzimas quitinolíticas.

Se realizaron también zimogramas de las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática, empleando sustratos de 4-metilumbeliferil-*N-N-N*-acetil- β -D-glucosamina para la actividad Endo y 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosamina para la actividad Nhasa (Figura 15B y 15C), confirmándose la presencia de actividad tanto Endo como Nhasa de las fracciones seleccionadas. Barreto y col., (2004) purificaron una quitinasa de 30kDa del hongo entomopatógeno *Metharizium anisopliae* encontrando zonas acromáticas correspondientes a quitinasas de distintos tamaños en zimogramas donde se empleó glicol quitina como sustrato, por lo cual no se pudo diferenciar cuál de las dos actividades fue la que estuvo presente ya que dicho sustrato no es específico para Nhasa o Endo.

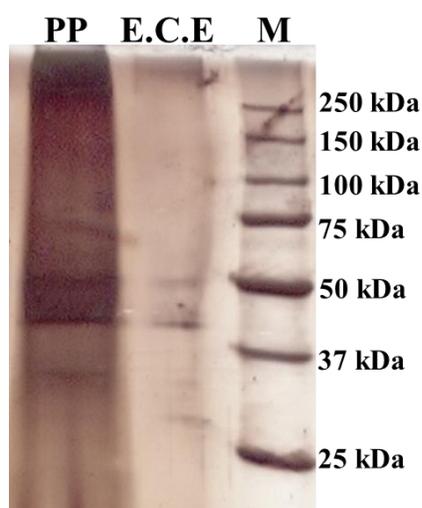


Figura 14. Electroforetograma de E.C.E a las mejores condiciones de cultivo y PP60

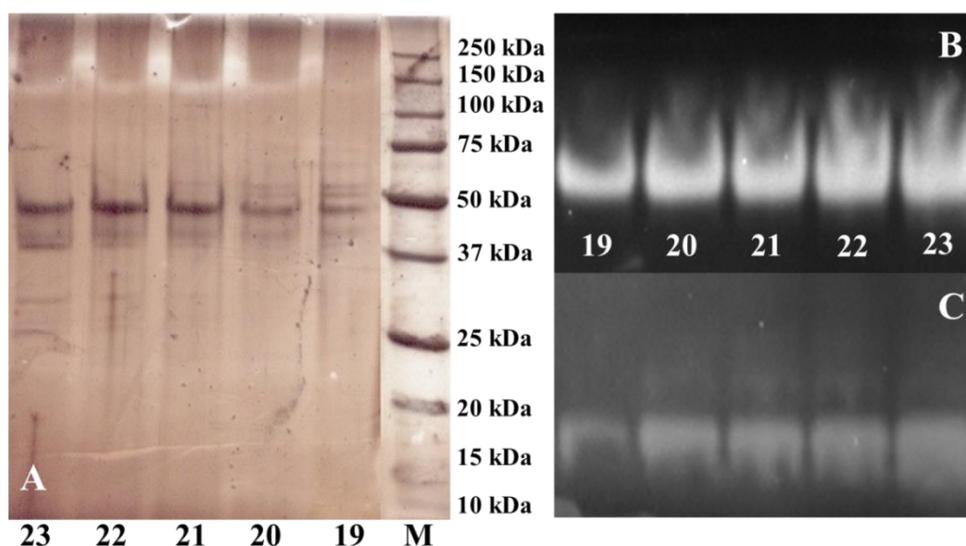


Figura 15. Electroforetograma de SEC (A), Zimogramas de actividad Nhasa (B) y Endo (C).

6.4 Caracterización de quitinas modificadas estructuralmente

La quitina empleada como materia prima (CP) para los tratamientos de modificación estructural fue despigmentada, desmineralizada y desproteinizada previamente; su análisis proximal arrojó valores de humedad del $6.65 \pm 0.22\%$, cenizas $1.06 \pm 0.03 \%$ y proteína: $1.52 \pm 0.18\%$, éstos son similares a los obtenidos por Cira y col., (2002) quienes reportan alrededor del 2% de proteína residual y aproximadamente 0.9% de sales de calcio, esto, posterior a la purificación química de quitina obtenida por fermentación láctica de los residuos de camarón. El I_{CR} inicial de la quitina nativa fue de 88.13% mientras que el DA encontrado fue de 98.14% lo cual es similar a lo reportado por Pacheco y col. (2011) para quitina obtenida a partir de la fermentación láctica de los residuos de camarón, la cual presentó un I_{CR} de 86.4% y un DA de 94%. En la figura 16 se presenta un espectro de 1H -RMN de quitina. Los espectros de 1H -RMN de quitinas empleadas como sustrato se muestran en el Anexo 7.

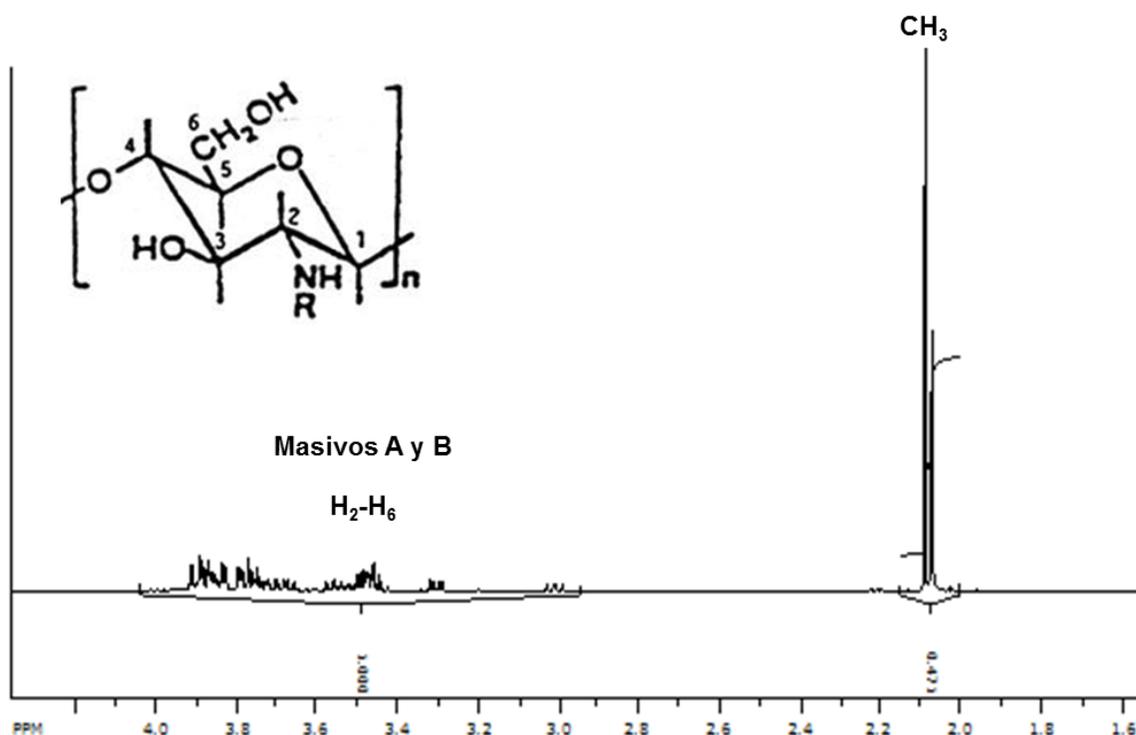


Figura 16. Espectro ¹H-RMN característico de quitina

A continuación, se detalla el efecto de cada uno de los pretratamientos sobre el polímero de quitina en cuanto al I_{CR} y el DA.

6.4.1 Ultrasonificación

La quitina sometida a ultrasonificación presentó una disminución del 5.44% en su DA comparado con la CP alcanzando un valor de 92.70%, esto puede ser atribuido al principio de la ultrasonificación el cual se basa en proporcionar la energía necesaria para lograr la ruptura de enlaces presentes en el polímero tratado, se ha reportado que este tratamiento puede llevar a la degradación inmediata de la cadena de quitina y a cierto grado de desacetilación, la intensidad de estos procesos está directamente relacionado con el tiempo que dura el tratamiento, especialmente si se lleva a cabo a pH bajo (Mislovicova y col., 2000)., en el presente trabajo el pH del proceso de

ultrasonicación fue cercano a la neutralidad (pH 6), esto aunado al corto tiempo de tratamiento (20 min) pudieron haber contribuido a que no se llevara a cabo una desacetilación mayor de la quitina.

Por otra parte, la ultrasonicación logró la disminución del I_{CR} con lo que se obtuvo un I_{CR} de 85.5 lo cual representa un 2.63% menos que el I_{CR} de CP, cabe mencionar que este tratamiento fue el que logró la menor disminución del I_{CR} . Kjartansson y col. (2006) reportan también una disminución de alrededor del 9% en el I_{CR} de quitinas al ser sometidas a ultrasonicación por espacios de 1 y 4 horas, mencionando que el hecho de que haya una reducción en el I_{CR} indica que hay una modificación en los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares lo cual puede incrementar la posibilidad de que las modificaciones posteriores, químicas o enzimáticas, a las que se someta la quitina sean más eficientes. En la figura 17 podemos observar el espectro de la quitina ultrasonicada de CP, encontrando que la ultrasonicación no provocó cambios drásticos en la estructura de la quitina ya que los espectros son muy similares entre ellos y muestran las principales bandas características de la quitina, esto es consistente con lo reportado por Barreto-Cardoso y col., (2001) y Kajartansson y col., (2006) quienes reportan cambios mínimos entre los espectros de quitina nativa y ultrasonicada. Algunas de las bandas características son la de 3400 cm^{-1} asignada a $-\text{OH}$, 3265 cm^{-1} asignada al grupo CH_3 , la banda de alrededor de 1627 cm^{-1} correspondientes a la amida I ($\text{C}=\text{O}$), la de 1553 cm^{-1} que corresponde a la amida II (N-H) y las bandas entre de 1060 cm^{-1} que corresponde a la tensión del C-O-C (Rumegan y col., 2014).

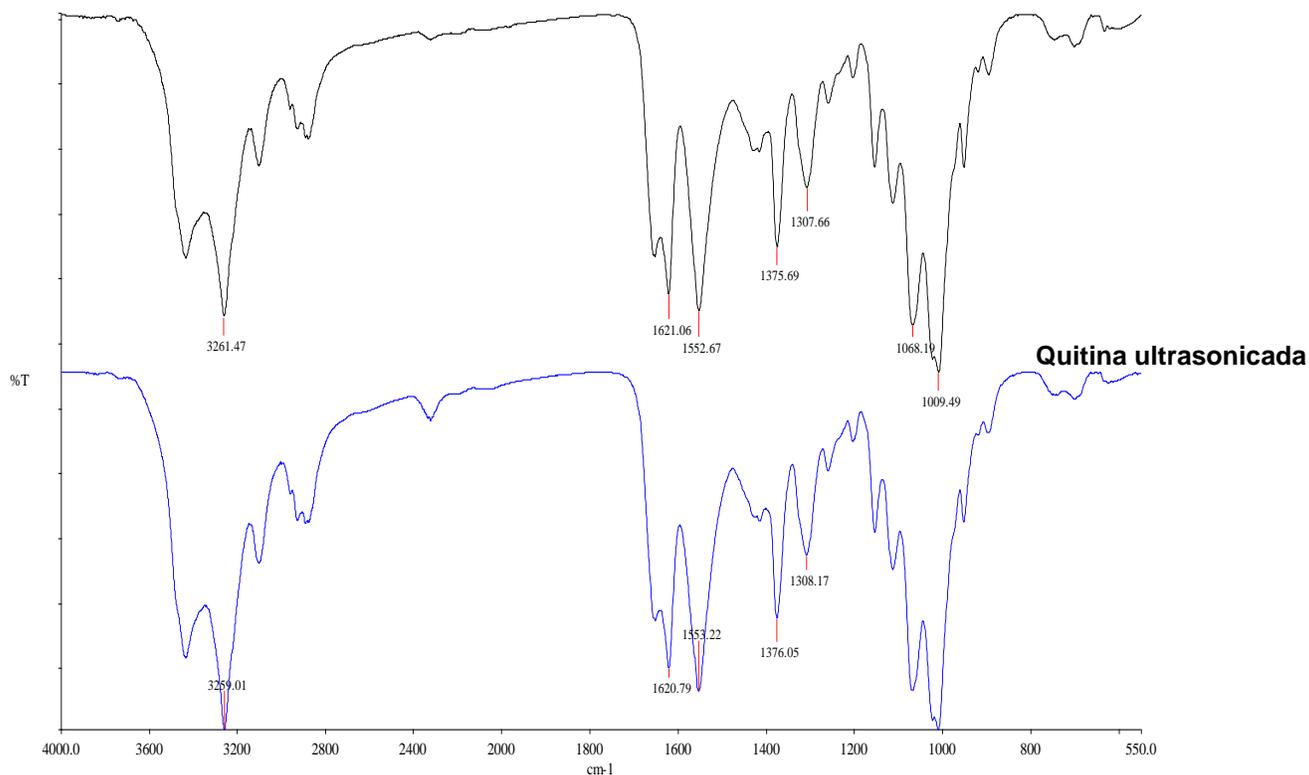


Figura 7. Espectro FTIR de quitina ultrasonificada y Quitina purificada mostrando las bandas características del polímero de quitina.

6.4.2 Desacetilación por FPT

Las quitinas sometidas a desacetilación presentaron un I_{CR} inferior al encontrado para las quitinas tratadas por SE y ultrasonicación, alcanzando un I_{CR} de 68.4% para el quitosano con DA de 4.86% lo cual representa una disminución del 29.73% comparado con CP. En la tabla 6 se muestran las características de DA e I_{CR} encontradas para estos materiales, donde se aprecia que ambos parámetros están directamente relacionados ya que conforme el DA disminuye lo hace también el I_{CR} . Esto ha sido también reportado por autores como Pacheco y col., (2011) y Zhang y col., (2006). Taghizadeh y Davari (2006) atribuyen este hecho a que cuando el DA disminuye hay un incremento en el número de grupos laterales de la cadena por lo tanto la probabilidad de empacamiento de la cadena disminuye y de igual forma lo hace la cristalinidad, esto puede deberse al creciente número de grupos voluminosos

de la cadena en donde se puede dar un impedimento estérico bloqueando así las interacciones.

En la figura 18 se presentan los espectros FTIR de las quitinas desacetiladas comparados con CP. Se observa una banda de absorción amplia entre los 3000 y 3500 cm^{-1} la cual corresponde a $-\text{OH}$ y NH mientras que la banda presente alrededor de 2900 cm^{-1} está asignada a C-H, por otro lado alrededor de los 1630 cm^{-1} aparece la banda asignada al $-\text{NH}$ de la amina primara la cual va disminuyendo mientras que la banda de 1550 cm^{-1} va en aumento conforme el DA disminuye, esto nos indica la prevalencia de los grupos NH_2 que se forman durante el proceso de desacetilación para la obtención de quitosano, dichos resultados coinciden con lo reportado por Kumirska y col., (2010).

Tabla 6. DA e I_{CR} de quitinas desacetiladas por FPT

Muestra	DA (%)	$I_{\text{CR}(110)}$
C 52	52	80.3
C 23	23	69.6
C 4.86	4.86	68.4

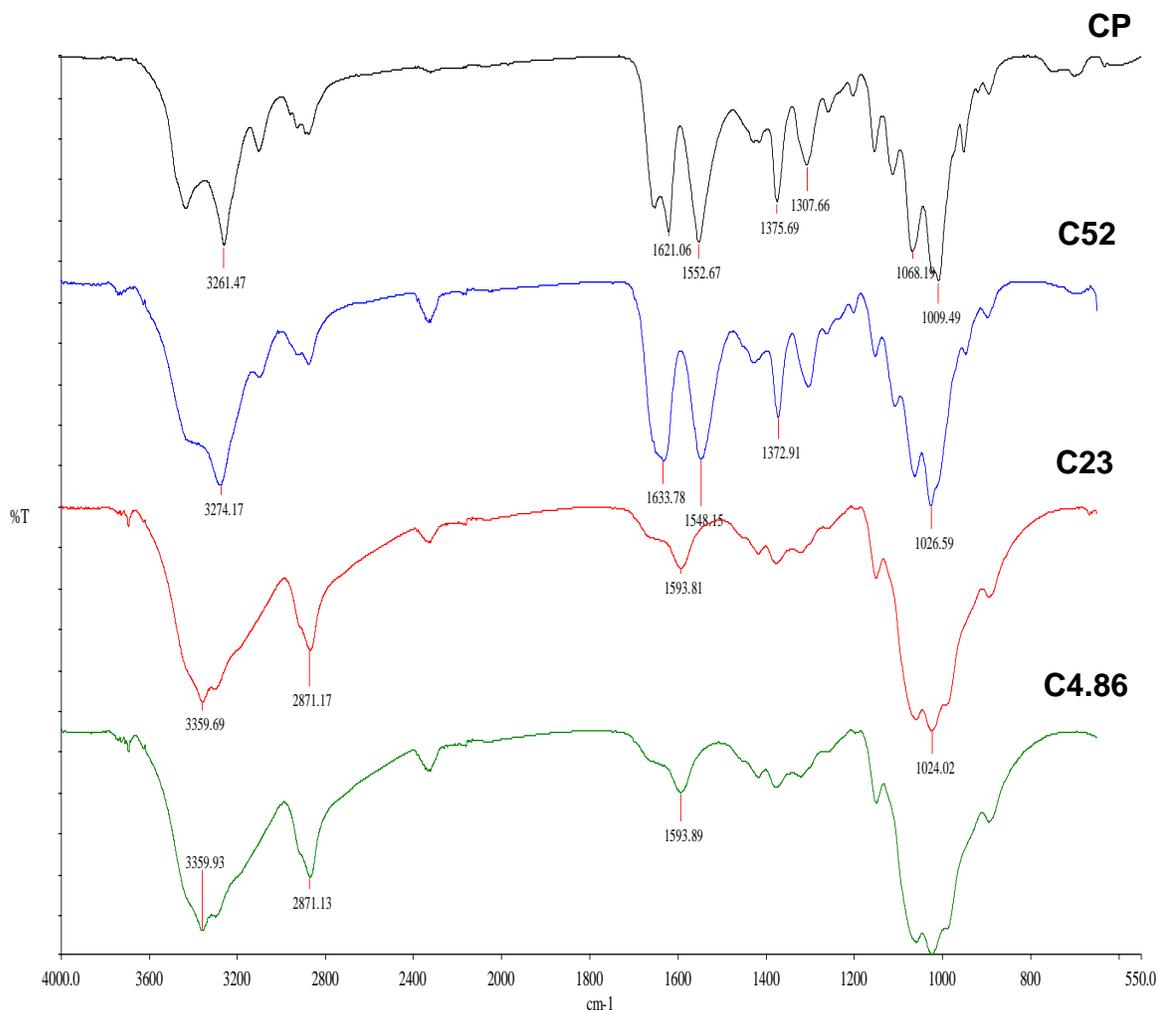


Figura 8. Espectro FTIR de quitina purificada y quitinas desacetiladas por FPT con DA de 52, 23 y 4.86, presentando cambios en las bandas correspondientes a -NH.

6.4.3 Steam explosion (SE, explosión por vapor)

6.4.3.1 Efecto de la concentración de quitina y tiempo de residencia

El tratamiento de SE logró que el I_{CR} de las quitinas disminuyera después de los 3 minutos de tiempo de residencia y posteriormente permaneció constante (Figura 19 A y B). El mayor descenso en el I_{CR} fue 11.28% ($I_{CR}= 76.85\%$) con una disminución en el DA de 3.7% (DA=94.47), esto para el tratamiento con concentración de quitina de 0.1 g/mL y 8 min de tiempo de residenciar.

Focher y col., (1990) quienes realizaron SE en presencia de NaOH con el fin de desacetilar la quitina, mencionan que el orden inicial de las moléculas no sufre una modificación irreversible durante el SE y puede ser recuperado. De igual forma, Wang y col., (2009) reportan que, para residuos celulósicos el polimorfismo cristalino de los polímeros, no se destruye durante el proceso o bien sólo se ve una muy leve disminución en la intensidad de la difracción del pico cristalino, independientemente de la duración de los tratamientos, aun cuando al SE se le atribuye la depolimerización de cierta parte del región cristalina, la estructura microcristalina no se ve afectada significativamente. En su caso, probaron tratamientos de 2 a 10 minutos y no encontraron diferencia entre los de 3 y 6 min en cuanto a cristalinidad se refiere. Similar a este reporte es el de Sun y col., (2014) quienes no encontraron diferencia significativa en la cristalinidad de residuos celulósicos al tratarlos por SE durante 5 y 8 min reportando I_{CR} de 49.80 y 50.42 % para 5 y 8 min respectivamente.

Es notorio que, conforme se disminuye la concentración de quitina, se ve un efecto mayor en la reducción del I_{CR} , es decir a mayor cantidad de agua mayor es el efecto de la temperatura y por lo tanto el efecto del SE, esto según lo reportado por Moreno-González (2011).

En cuanto al DA de las quitinas sometidas a SE se observa una leve disminución en pasando de 98.14% encontrado en la CP a 93.37% presente en el tratamiento con 0.2 g de quitina/mL de agua y 5 min de tiempo de residencia (Tabla 7), esto es evidencia de que la modificación estructural resultado del SE no genera una desacetilación drástica en el polímero.

En la Figura 20 se muestran los espectros de FTIR de las quitinas tratadas con SE a 0.1 g/mL 8 min siendo esta la que presentó el menor I_{CR} en comparación con la CP. Las dos bandas intensas que se presentan en 1,652 y 1,620 cm^{-1} (Figura 18A) corresponden a la torsión del grupo carbonilo. Al respecto Jang y col., (2004) reportan que la banda de la amida I varía con la estructura cristalina debido a los puentes de hidrógeno intra e inter moleculares presentes entre la quitina, en este

estudio se menciona también que la banda de la amida I se presenta como un doblete en el caso de la α quitina que es más cristalina y como un solo pico en el caso de la β quitina debido a sus interacciones dipolo-dipolo débiles, las bandas del doblete encontrado en la α quitina corresponden a : 1) Los puentes de hidrógeno presentes entre los grupos carbonilo de la amina I y la amina II apareciendo a 1660cm^{-1} y 2) Al enlace de hidrógeno entre el extremo $-\text{CH}_2\text{OH}$ de la cadena y el grupo carbonilo, esta es la que aparece a 1620cm^{-1} .

Cabe mencionar que la banda de $1,650\text{cm}^{-1}$ de la quitina nativa disminuyó considerablemente después del SE y el hombro encontrado a $1,632\text{cm}^{-1}$ ya no fue detectado después de dicho tratamiento (Figura 19B), lo cual se puede atribuir a una reducción en los puentes de hidrógeno. La torsión del C=O a $1,021\text{cm}^{-1}$ se ha empleado como una banda de referencia para la determinación del DA (Duarte y col., 2002) en este trabajo se encontró una banda amplia a esta frecuencia después de SE que también puede ser atribuida a la reducción de los puentes de hidrógeno. La relación de absorbencias de $1,379\text{cm}^{-1}$ y $2,900\text{cm}^{-1}$ se ha propuesto como un índice de referencia para la cristalinidad de la quitina, por lo cual una disminución en esta relación indica una disminución en dicho parámetro. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una relación $A_{1379\text{cm}^{-1}}/A_{2900\text{cm}^{-1}}$ inicial de 5.5, la cual disminuyó a 5 con el tratamiento de SE. Con base en la disminución de la cristalinidad y esperando que este fenómeno consiga aumentar la hidrólisis enzimática se decide fijar estas condiciones (0.1 g/mL y 8 min) para esta etapa.

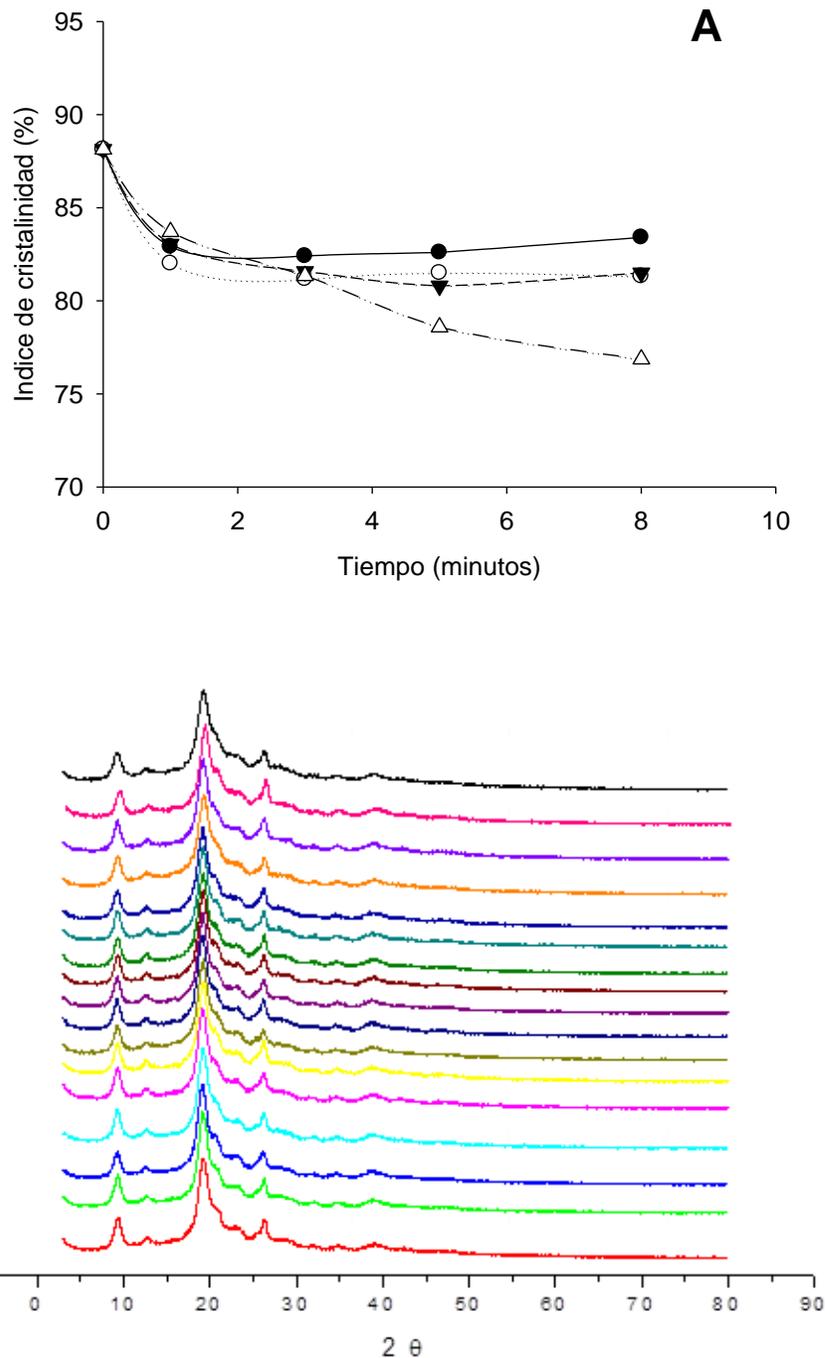


Figura 9. Efecto del SE en el I_{CR} de quitina. A) I_{CR} de quitinas con respecto al tiempo y concentración. Símbolos 2g/mL (●), 0.4 g/mL (○), 0.2 g/mL (▲) y 0.1 g/mL (△). B) Difractograma de quitinas tratadas por SE.

Tabla 7. DA de quitinas tratadas por SE

Tiempo de Reacción (min)	Concentración (g/mL)	DA (%)
1	0.1	95.47
3	0.1	95.08
5	0.1	94.53
8	0.1	94.47
1	0.2	95.33
3	0.2	95.04
5	0.2	93.37
8	0.2	93.62
1	0.4	95.85
3	0.4	96.09
5	0.4	96.55
8	0.4	95.73
1	2	95.41
3	2	94.32
5	2	95.40
8	2	94.38

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

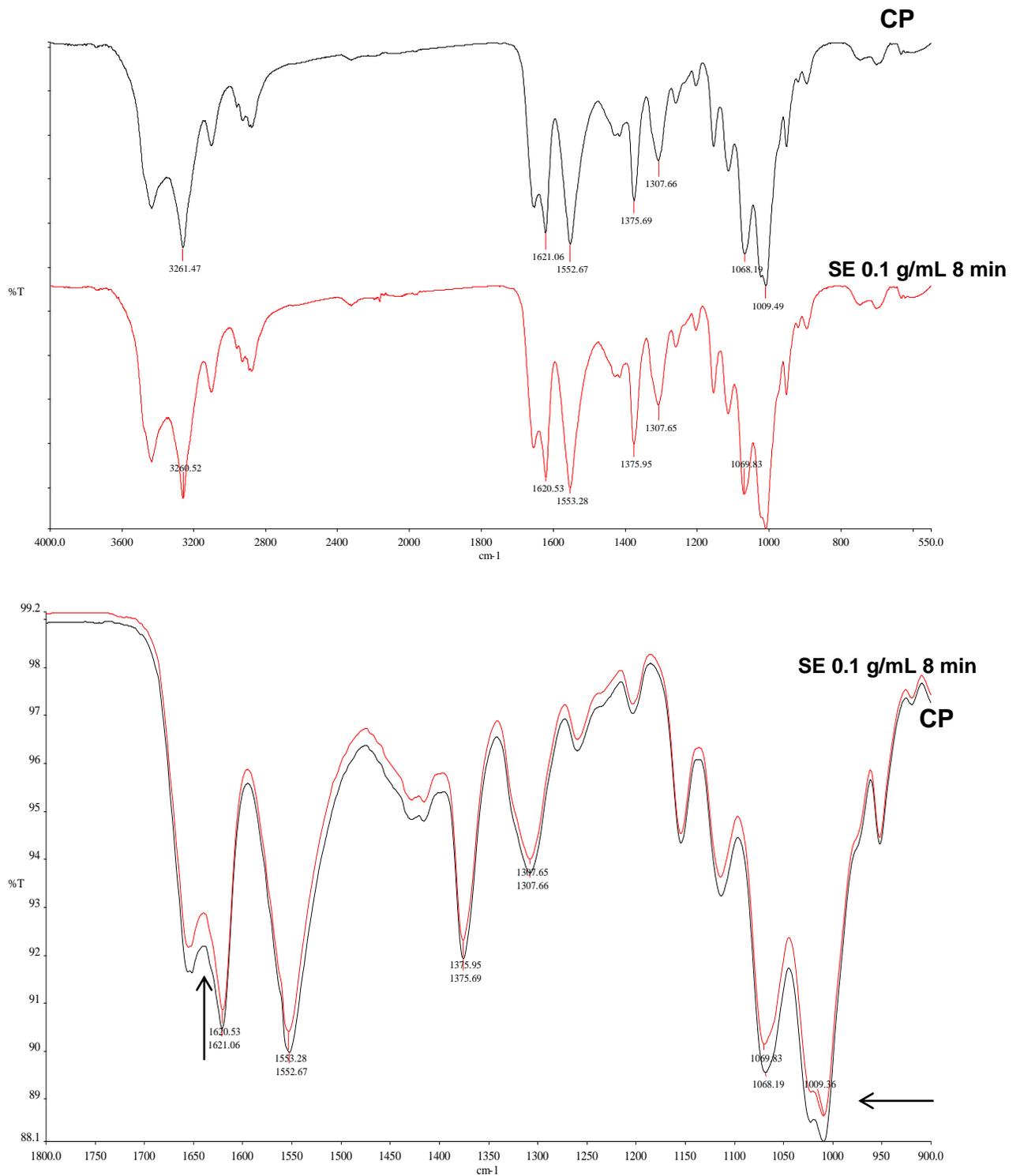


Figura 10. Espectro FTIR de quitina A) SE 0.1 g/mL 8 min y B) Acercamiento a las bandas con cambios.

6.4.3.2 Caracterización de quitinas SE variando temperatura

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de relación quitina/agua y el tiempo de residencia (0.1 g/mL y 8 min) se procedió a evaluar el efecto de la temperatura probando tres niveles diferentes (200, 220 y 240°C) siendo todas ellas superiores a las empleadas en los experimentos anteriores (180°C). En la figura 21 se muestran los azúcares reductores presentes en el licor obtenido en el proceso de SE, encontrando que, al emplear temperaturas de 180 °C no hubo presencia de azúcares reductores en el licor mientras que conforme se incrementó la temperatura, también incrementó significativamente la cantidad de azúcares reductores presentes en el licor, siendo la producción mayor de 0.26 mg/mL para el tratamiento a 240°C, lo cual podría representar hidrólisis de la quitina, estos resultados son similares a lo reportado por Moreno-González y col. (2011), quienes mencionan que, a mayor temperatura, se hidroliza una cantidad de materia mayor, independientemente de la relación líquido/sólido que se emplea en el proceso, pero esto también podría ocasionar una degradación parcial a oligosacáridos.

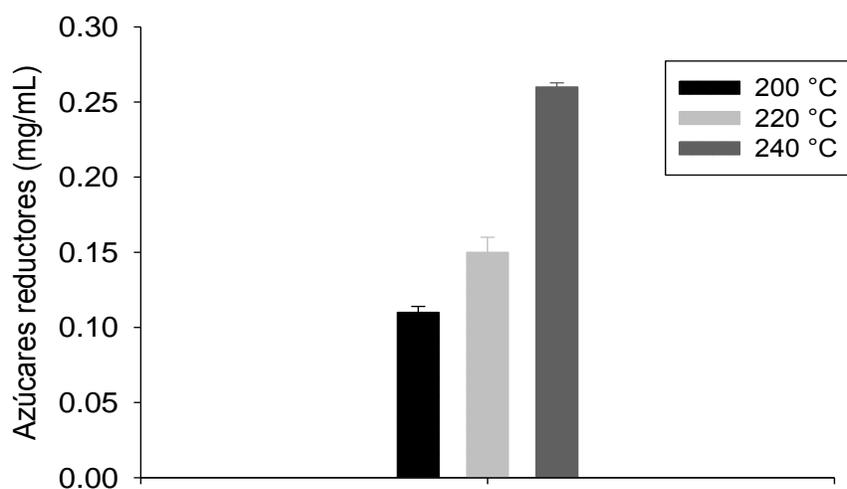


Figura 11. Azúcares reductores presentes en licores obtenidos de SE empleando diferentes temperaturas (200, 220 y 240 °C)

En la tabla 8 se muestran los DA e I_{CR} de las quitinas tratadas con SE a temperaturas de 200 a 240 °C comparada con los tratamientos a 180°C, el incremento de la temperatura fue directamente proporcional a la presión dentro del reactor, alcanzando hasta 30 bar para la temperatura de 240 °C, mientras que los tratamientos iniciales a 180°C se mantenían a una presión de 10 bar.

Por otra parte se puede observar que el tratamiento que generó el I_{CR} menor es el de 240°C, presentando una disminución del 15.03% comparado con CP y un 3.75% si se compara con el I_{CR} de la quitina SE a 180°C. Esto puede ser atribuido a las altas temperaturas empleadas y al aumento de la presión, ya que, bajo estas condiciones, algunos de los puentes de hidrógeno pueden romperse. Horn y col., (2011) mencionan que, a temperaturas superiores a los 200°C, se obtienen productos más oscuros con tendencia a un tono marrón y que aumenta la cantidad de cenizas presentes en las fracciones obtenidas del pretratamiento, lo que coincide con lo encontrado en nuestro caso ya que también se obtuvieron quitinas con tonos oscuros comparados con la quitina sin tratar al emplear sobre todo la temperatura de 220 y 240 °C.

En cuanto al DA hay una disminución de alrededor del 10% con respecto a CP y alrededor del 7% con respecto a la quitina tratada a 180°C, sin embargo no se observa una diferencia marcada entre las temperaturas de 200 a 240°C es decir el I_{CR} y DA se mantienen estables a temperaturas entre esos rangos. La desacetilación presentada se puede deber a que por las altas temperaturas el agua pudiera llegar a actuar como un ácido diluido, este mismo proceso daría pie a la formación de ácido acético proveniente de los grupos acetilo hidrolizados lo cual podría generar cierto grado de hidrólisis lo cual se puede observar en los resultados de azúcares reductores en los licores (Alvira y col. 2010).

En la Figura 22 se muestran los espectros de FTIR de las quitinas mencionadas anteriormente, mostrando las bandas características de 3400 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} , 1553 cm^{-1} y 1060 cm^{-1} , se observa también que la banda cercana a los 3400 cm^{-1} se hace

más prominente según aumenta la intensidad de los tratamientos esto puede sugerir que durante el SE hay una ruptura parcial de los enlaces de hidrógeno intramoleculares en el C-3 y C-6 de la unidad glucopiranososa lo cual da lugar a variaciones en la fuerza de los enlaces de hidrógeno de los hidroxilos presentes, esto es reportado por Focher y col., (1997).

Tabla 8. Efecto de la temperatura de SE en el I_{CR} y DA de quitinas

Muestra	DA (%)	I_{CR}	Presión (bar)
Nativa	98.14	88.13	No aplica
C180	94.47	76.85	10
C200	87.00	76.1	12
C220	88.81	75.3	20
C240	88.94	73.1	30

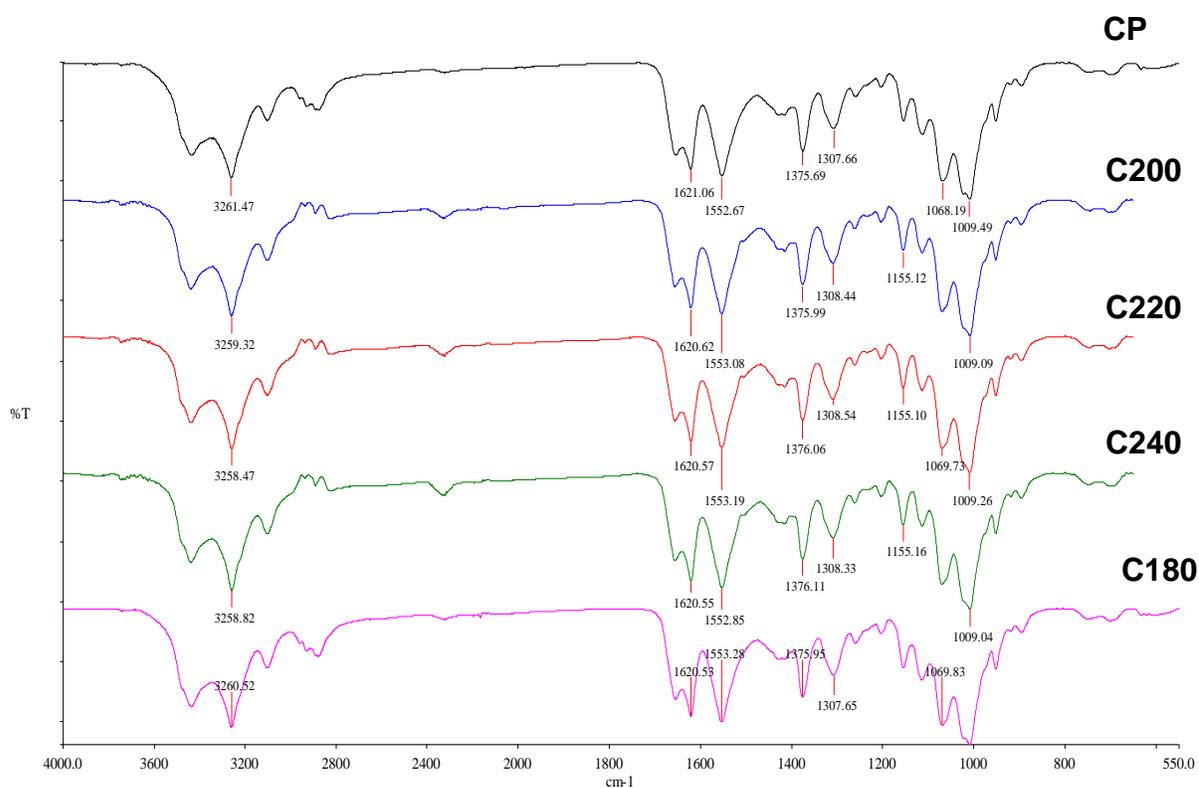


Figura 12. Espectro FTIR de CP y quitinas tratadas con SE a 180, 200, 220 y 240 °C.

6.4.4 Expansión rápida de scR134a

R-134a es un compuesto de baja toxicidad ya que es considerado GRAS y de aplicación biomédica como propelante en el tratamiento del asma, entre otros, no es inflamable, no daña la capa de ozono además de ser fácilmente reciclable. El conjunto de estas características aunado a su polaridad que favorece la solubilidad de substratos, permiten que el R-134a comprimido sea explotado industrialmente, como en el caso de procesos de extracción de productos naturales, también han sido reportadas sus ventajas como disolvente no convencional en procesos, como la síntesis del polímero poli-L-láctido, mediante polimerización por apertura de anillo vía enzimática en condiciones subcríticas de R134a reportada por Guzmán-Lagunes y col. (2012).

En cuanto a los procesos de propagación de presión inducida por expansión, Fletcher y Anderson (1990) mencionan que la energía transferida de un fluido caliente a uno frío, forma vapor de alta presión el cual mientras se expande puede

fracturar las estructuras de los materiales sometidos a estos procesos, estas tasas de transferencia de alta energía implican que la onda de choque provoque una fragmentación y una alta velocidad de mezclado de estos dos líquidos, sugiriendo que la expansión rápida puede ser comparada con una detonación química de igual forma Cho y col., (2007) respaldan esta fenómeno evaluando el efecto de freón sobre materiales de poliestireno y encontrando zonas agrietadas en la superficie del material al ponerse en contacto con el haloalcano.

Por otro lado, la presión aplicada en los procesos de modificación estructural juega un papel importante en las propiedades de los polímeros tales como tamaño y volumen de poro así como en el área superficial, Hebb y col., (2003) trabajaron con R134a a presiones de 16 a 32 bar encontrando que conforme aumentaba la presión se aumentaba levemente el área superficial de contacto del polímero evaluado, se menciona que la dependencia del incremento del área superficial a la presión es muy leve comparado con procesos en los cuales se emplea CO₂ supercrítico. Para el caso del efecto de la temperatura en estos procesos Calvosa y col., (2010) menciona que la solubilidad de sólidos en los fluidos supercríticos (FSC) se puede prever como la mejora de la solubilidad ideal basada en la presión de vapor por si sola. Esta mejora se ve aumentada con la presión del fluido (densidad) y a presiones de alrededor del punto crítico de la mejora es más pronunciada debido a un fenómeno microscópico conocido como "clustering" donde las moléculas del solvente se acumulan sobre un soluto y la densidad local de solvente se incrementa. Mustapa y col., (2009) encontraron que, a mayores temperaturas, se presentó el máximo rendimiento y lo atribuyen al hecho de que las tasas de transferencia de masa se incrementa al aumentar la temperatura y explican que el aumento de temperatura aumenta la presión de vapor de los solutos y, por lo tanto, los rendimientos.

En la tabla 9 se presenta la caracterización de las quitinas sometida a este proceso, se puede apreciar que el tratamiento que presenta la mayor disminución en el I_{CR} es CF8 alcanzando un I_{CR} de 73.87% este tratamiento es el que presenta las condiciones más severas en cuanto a presión y temperatura, siendo de 60 bar y

180°C, por otra parte el menor DA se encontró en la quitina CF4 con un grado de acetilación de 76.52% lo cual representa una disminución del 21.62%. La cantidad de azúcares reductores presentes en el licor obtenido durante el proceso fueron menores (un máximo de 0.12 mg/mL para la muestra CF7) a los encontrados en las quitinas tratadas por SE a 240°C y el I_{CR} más bajo encontrado dentro de estas muestras es similar al que presentó C240 (73.1%), lo cual demuestra que efectos similares pueden ser alcanzados empleando la expansión rápida de R134a siendo las condiciones para este proceso más suaves en cuanto a temperatura pero a presiones mayores, es importante mencionar que las presiones alcanzadas en este tratamiento fueron de 40, 50 y 60 bar empleando temperaturas más suaves que las probadas anteriormente de 115 y 180°C.

El tamaño de partícula de las quitinas tratadas fue determinado empleando un equipo zetasizer nano y se presenta en la Figura 23, donde se puede observar que la mayoría de las muestras presentan tamaños de partícula de alrededor de 1µm a excepción de la muestra CF7 la cual presenta un tamaño inferior a los otros tratamientos específicamente de 609 nm; en el caso de la quitina CF9 se observa en el gráfico tamaños de partícula de alrededor de 34 nm pero es importante notar que no es el único tamaño de partícula presente en esta muestra ya que también se detectaron tamaños de alrededor de 1200 nm, este fenómeno no se presenta en la CF7 donde los tamaños son más uniformes, es por eso que se selecciona para realizarle el tratamiento de fibrilación, cabe mencionar que CP presentó un tamaño de partícula superior a todas las quitinas pretratadas por este proceso siendo de 1762 nm, lo cual sugiere que el tratamiento aplicado logra una reducción en el tamaño.

Tabla 9. Caracterización de quitinas tratadas por expansión rápida de R134a

Muestra	AR (mg/mL)	DA (%)	I _{CR}	Presión (bar)	Temperatura (°C)
CP	No aplica	98.14	88.13	No aplica	No aplica
CF4	0.04	76.52	78.27	40	115
CF5	0.10	75.66	81.28	50	115
CF6	0.08	77.98	77.99	60	115
CF7	0.12	77.86	79.19	40	180
CF8	0.01	75.58	73.87	60	180
CF9	0.05	81.74	77.86	50	180

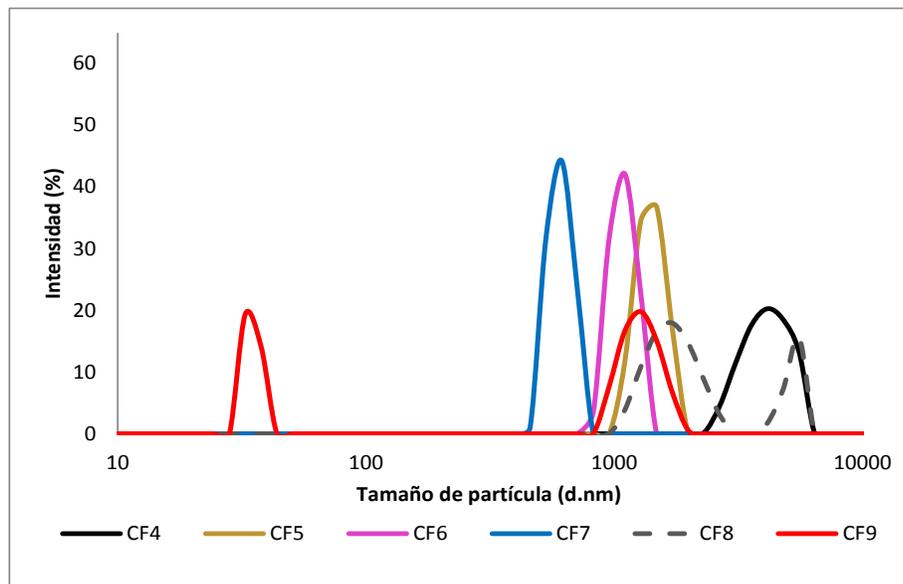


Figura 13. Distribución de tamaño de partícula de quitinas tratadas por expansión rápida de scR134a

En la Figura 24 podemos observar los espectros de FTIR de las quitinas sometidas a la expansión rápida R134a mostrando al igual que en la mayoría de los tratamientos anteriores las bandas características de la quitina a 3400 cm^{-1} asignada a $-\text{OH}$, 3265 cm^{-1} asignada al grupo CH_3 , la banda de alrededor de 1627 cm^{-1} correspondientes a la amida I ($\text{C}=\text{O}$), la de 1553 cm^{-1} que corresponde a la amida II (N-H) y las bandas entre de 1060 cm^{-1} que corresponde a la tensión del C-O-C , en el caso de la banda correspondiente a la amida II (1553 cm^{-1}) debería de ir aumentando conforme disminuye el DA, como se mencionó anteriormente en el apartado de quitina desacetilada, esto no es tan evidente debido a que la disminución máxima en el DA fue de 21.62% para CF_4 pero aun así se logra apreciar un leve incremento en la intensidad al compararla con el espectro de CP.

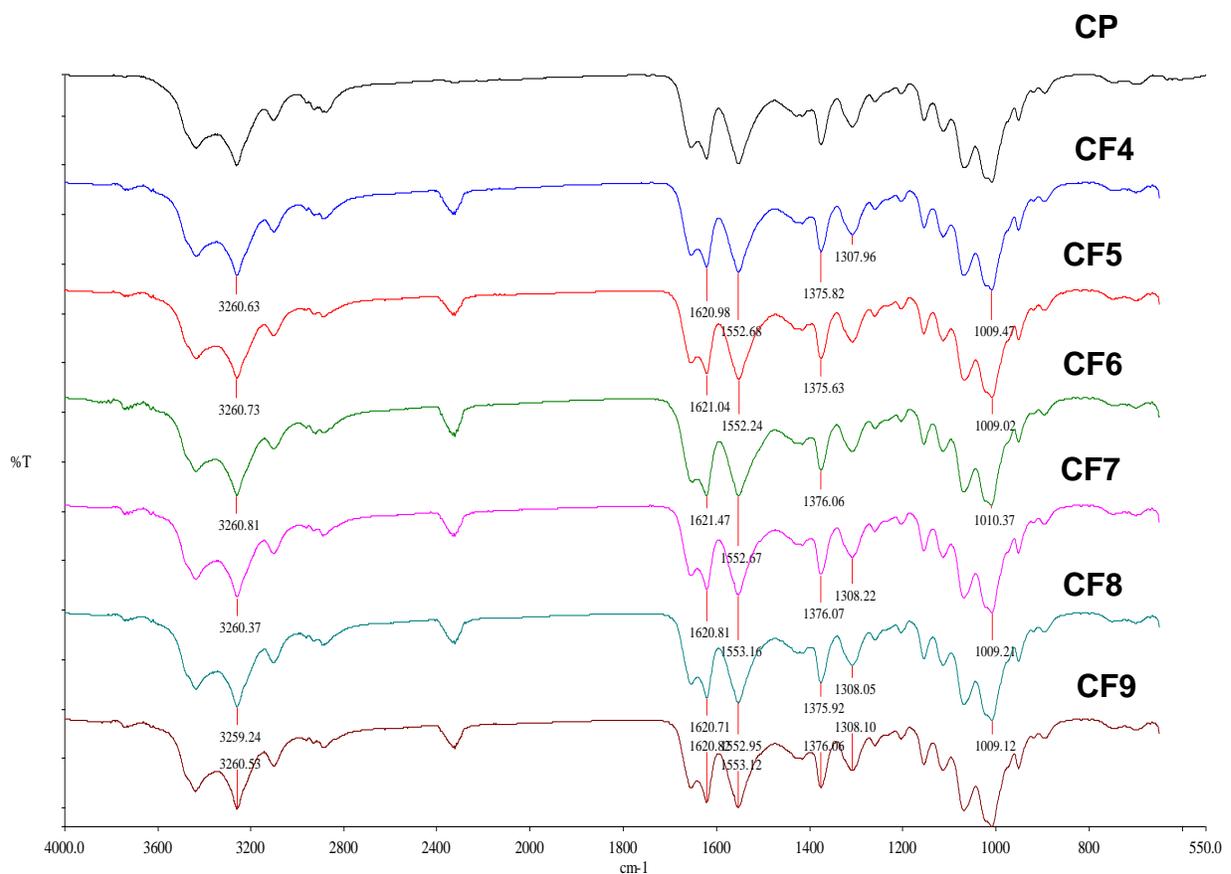


Figura 14. Espectros de FTIR de quitinas tratadas por descompresión de scR134a

6.4.5 Fibrilación de quitina

Una vez realizado el proceso de fibrilación, esto con la finalidad de reducir el tamaño de partícula para facilitar la dispersión del substrato en el medio y probablemente facilitar la hidrólisis, el tamaño de partícula de esta quitina (CFN) fue de 609nm a 240nm. Estos tamaños son superiores a los encontrados por Ifuku y col. (2009) quienes reportan nanofibrillas de tamaños uniformes de entre 10 y 20 nm esto debido a que emplean además de la fibrilación un sistema denominado “star burst” que implica altas presiones mecánicas para la reducción de tamaños. Ifuku y col, explican que la protonación de los grupos amino de la quitina a pH 3 facilita la formación de fibras y mantienen un estado de dispersión estable mediante repulsiones electroestáticas entre las nanofibrillas de la quitina con superficies catiónicas. Tratamientos similares han sido aplicados en la fibrilación de pulpas *Pinus radiata* (93.2% contenido de celulosa) mediante el uso de molino a 1500 rpm y pasando las muestras en repetidas ocasiones por este equipo (1-30 veces), encontrando que sus tamaños de partícula después del tratamiento fueron de entre 20 y 50 nm de ancho y más de 1µm de longitud, además reportan una disminución en el I_{CR} de sus fibras de alrededor del 20%, esto para el tratamiento en el que la pulpa fue sometida a molienda por 30 veces (Iwamoto y col., 2007).

CFN no presentó un cambio significativo en su DA, siendo este de 78.7% y 77.9% antes y después del proceso de fibrilación respectivamente, mientras que el I_{CR} presentó una reducción del 10.4% comparado con CF7 y un 19.3% comparado con CP, alcanzando un I_{CR} de 68.8%, este valor es inferior a lo reportado por Salaberria y col., (2014) quienes encontraron un I_{CR} 85% para nanofibrillas de quitina mostrando picos de difracción a 2θ de 9.5, 19.5, 21, 23.5 y 26.5 ° que corresponden a los planos de 020, 110, 120, 101 y 130 respectivamente, los cuales son característicos de las nanoformas de quitina, se mostraron las reflexiones más intensas a 9.5 y 21° mientras que las de menor intensidad se encontraron a valores de 2θ superiores (Figura 25). Ifuku y col. (2009) reportan también una reducción en el I_{CR} al comparar las nanofibrillas con la quitina comercial esto puede ser atribuido a las condiciones

ácidas empleadas que podrían estar removiendo considerablemente la parte amorfa de la quitina comercial, así como al procedimiento mecánico realizado a la muestra.

Nakagawa y col., (2013) coinciden en que la reducción en el tamaño de partícula influencía directamente la cristalinidad de la quitina, encontrando I_{CR} del 94 y 40% para quitinas de 127 y 20.6 μm respectivamente, mencionan también que las quitinas tratadas para reducción de tamaño presentan cambios en la zona de alrededor de 1600 cm^{-1} en los espectros de FTIR, mostrándose una mayor intensidad en esta banda conforme disminuye el tamaño de partícula, fenómeno que no es tan evidente en nuestro trabajo (Figura 26) como lo es en el de ellos, lo cual se puede deber a que sus diferencias de tamaños entre cada muestra es mayor a la encontrada en este trabajo, ya que ellos reducen el tamaño hasta en un 83%, mientras que en este caso se logra una disminución del 60%, sin embargo, se presentan en CFN las bandas entre 3400 y 3200 cm^{-1} correspondientes a --OH y NH respectivamente, así como la banda correspondiente a la amida I a los 1620 cm^{-1} y a la amida II los 1553 cm^{-1} las cuales son características de quitina. La presencia de bandas características de quitina en el espectro de CNF muestra que la quitina no se vio modificada estructuralmente (Salaberria y col., 2014).

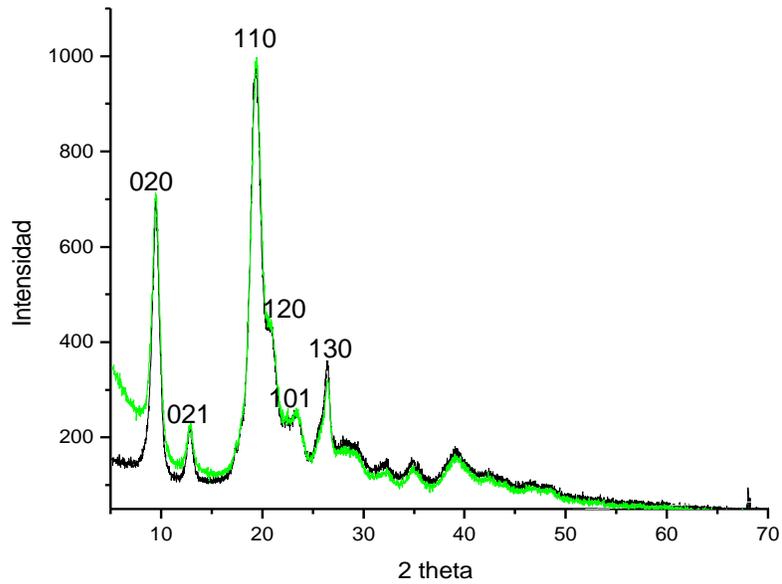


Figura 15. Difractogramas de CF7 (---) y CFN (---)

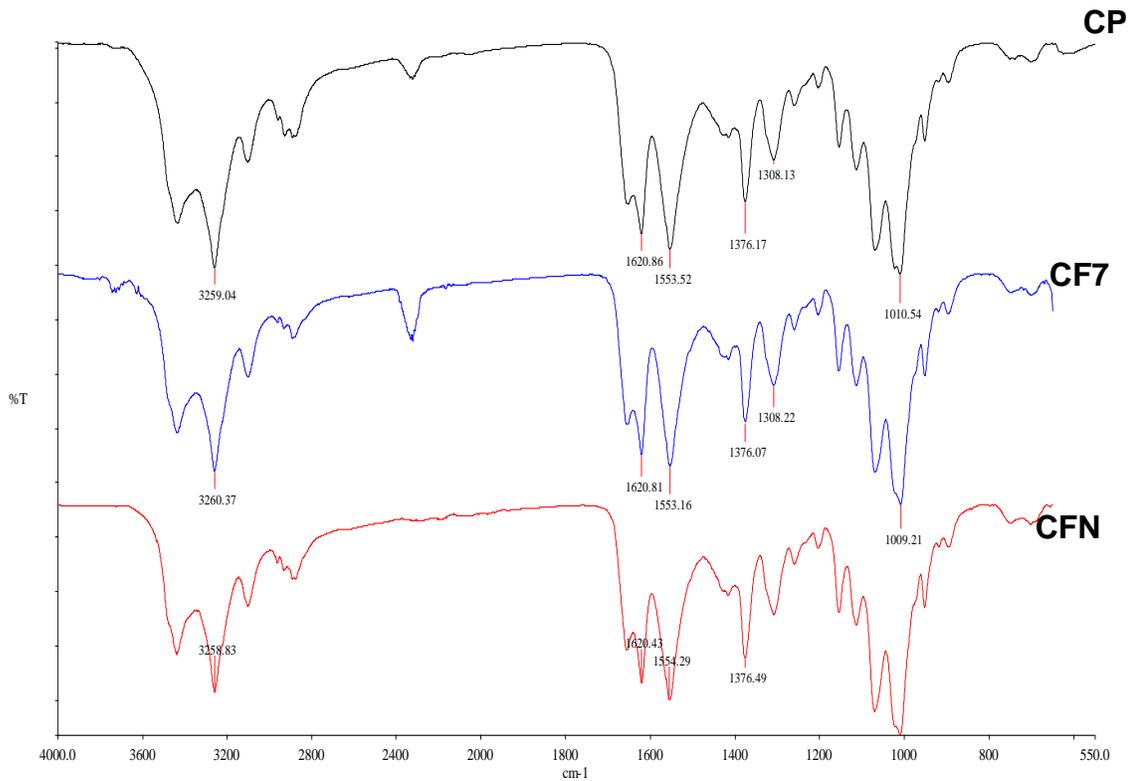


Figura 16. Espectro FTIR de CFN comparado con CP y CF7

Se realizaron SEM de CP, CF7 y CNF en sólido, las cuales se muestran en la figura 27. Se observan diferentes morfologías para cada una de las muestras, es evidente que la purificación química no cambia la quitina mostrando su estructura altamente compacta con superficies lisas y homogéneas siendo aparentemente planas. Posterior al tratamiento de expansión rápida de scR-134 la superficie de la hojuela de quitina empieza a mostrar signos de agrietamiento con una superficie rugosa lo cual según lo reportado por Wang y col., (2009) puede ser indicativo de el reacomodo de las fibras del polímero. Por último, tras realizar el proceso de fibrilación de quitina, se presenta una morfología mucho más fracturada, abierta y con formación de láminas, es decir se observa la separación de ciertas fibras, lo cual podría favorecer el acceso de las enzimas o reactivos químicos al polímero, el tamaño observado en SEM es mayor al encontrado en dispersión debido probablemente a la agregación durante el pretratamiento aplicado a la muestra para la SEM.

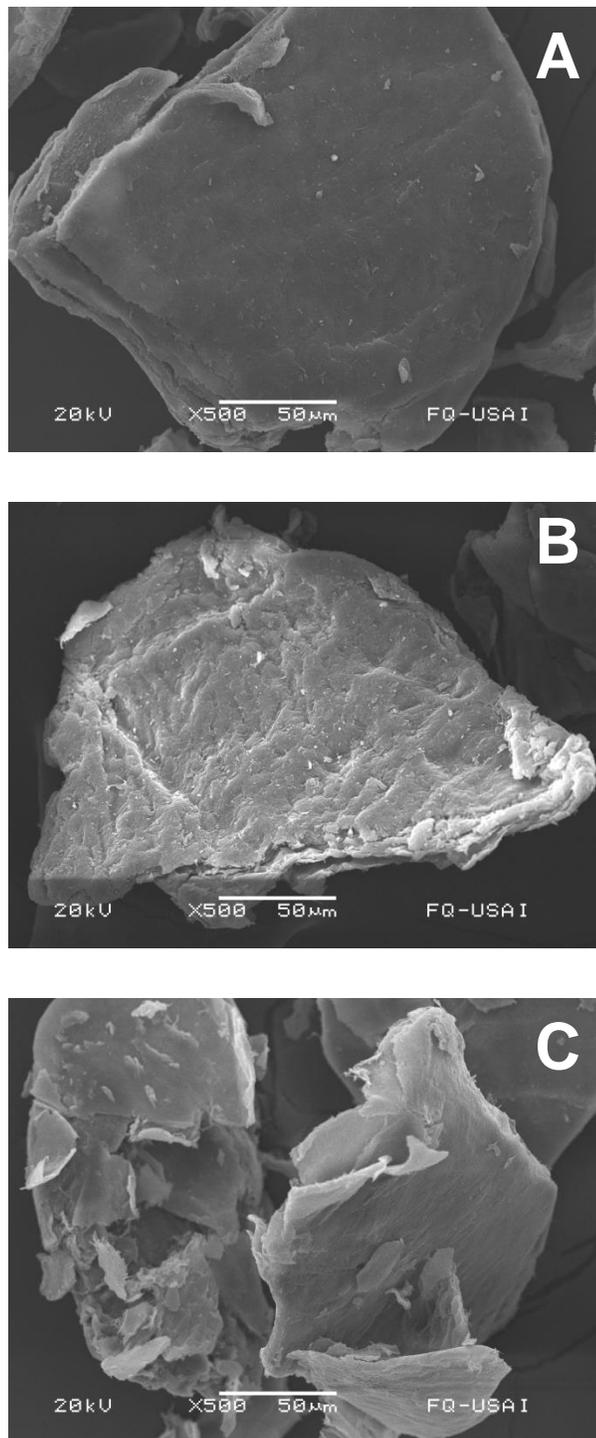


Figura 17. Micrografías electrónicas de barrido: A) CF, B) CF7 y C) CFN

6.5 Hidrólisis enzimática de quitosanos y quitinas pretratadas por SE y sonicación

Los azúcares reductores así como la producción de GlcNAc fueron monitoreados de las 24 a las 144h durante la hidrólisis de todos los substratos. Como se observa en la figura 27 A y B), la muestra de quitina ultrasonicada tuvo su máxima producción a las 72 h con 0.12 mg/mL de azúcares reductores y 0.25mg/mL de *GlcNAc* (10.14% de rendimiento GLcNAc/quitina). El comportamiento del incremento en la producción de oligosacáridos hasta las 72 h puede ser atribuido a la depolimerización producida durante la ultrasonificación ya existen reportes como el de Kjartansson y col., (2006) quienes mencionan que la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad puede llegar a ocasionar la producción de fragmentos de quitina que sean solubles (oligosacáridos), esto debido a los altos esfuerzos de corte generados durante el crecimiento y colapso de las burbujas de cavitación generadas en la onda del campo acústico que se da en el tratamiento, esto podría proporcionar un substrato para Nhasa y la posible explicación para la disminución en la producción después de este tiempo se puede deber a una transglicosilación de la enzima, como se ha reportado por Chavan y Deshpande, (2013).

La quitina tratada por SE con condiciones de 0.1 g/mL (quitina/agua) y 8 min presento su máximo a las 144 h con una producción de azúcares reductores y GlcNAc de 0.37 mg/mL y 0.59 mg/mL, respectivamente (23.6% Rendimiento GLcNAc/quitina). Mientras que la quitina SE con condiciones de 0.4 g/mL por 5 min alcanzo la producción máxima de azúcares reductores a las 144h pero con una producción relativamente menor, siendo de 0.18 mg/mL para azúcares reductores y 0.38 mg/mL para GlcNAc lo cual representa un 15.1% de rendimiento GLcNAc/quitina), ambas quitinas SE, aun cuando sus condiciones de tratamiento fueron distintas presentaron una producción mayor de azúcares reductores y GlcNAc que CP. A pesar de que la aplicación de SE en quitina ha sido muy escasamente reportada, existen diversos trabajos con residuos celulósicos en donde se constata que la aplicación de SE mejora considerablemente la posterior hidrólisis enzimática, tal es el caso de Moniruzzaman (1995) quien menciona que la desfibrilación obtenida

como efecto colateral de SE expone un área de reacción grande en la superficie del polímero, lo cual mejora la accesibilidad y por lo tanto la hidrólisis enzimática, Ruiz y col., (2008) coinciden con lo reportado anteriormente encontrando que el proceso de SE mejora dramáticamente la hidrólisis enzimática de celulosa con una mayor producción de azúcares al realizarse el proceso.

Los resultados presentados en este trabajo son similares a los reportados por Fukamizu y Kramer (1985) con una producción máxima de 0.44 mg/mL de azúcares reductores a las 7 h, empleando una mezcla de quitinasas y encontrando que esta mezcla mejoró la producción de COS comparada con las hidrólisis donde se empleó una Nhasa pura. El hecho de que la hidrólisis enzimática se vea mejorada al emplear una mezcla de quitinasas se ha reportado anteriormente por autores como Suzuki y col., (2002) quienes encontraron que al emplear una mezcla de tres quitinasas (ChiA, ChiB y ChiC1) la producción de azúcares reductores se incrementó en casi un 100%, y cuando se realizó una mezcla de dos quitinasas los rendimientos se vieron incrementados entre un 45 y 80% dependiendo de la combinación de quitinasas empleada.

Cabe mencionar que el substrato empleado en el trabajo Fukamizy y Kramer (1985) fueron β -quitinoligosacáridos con DP de 6 los cuales son substratos de más fácil acceso para la enzima y por lo tanto su hidrólisis es llevada a cabo en tiempos relativamente cortos, mientras que los materiales quitinosos empleados en este trabajo al ser más complejos requieren de una fase de adaptación donde se lleve a cabo la apertura de las zonas cristalinas ,por parte de la enzima, y queden expuestas las fibras de la quitina, tal como lo reportan Lonhienne y col., (2001).

Los azúcares reductores y la producción de GlcNAc obtenidos de la hidrólisis de quitinas desacetiladas DA 4.86, 23 y 52 fue menor que los obtenidos a partir de quitina ultrasonicada y SE pero superior a los encontrados para CP, alcanzando sus máximos valores entre las 96 y 120 h de reacción, el hecho de que las quitinasas tuvieran preferencia sobre las quitinas desacetiladas antes que por CP se puede atribuir a que al haber una menor cantidad de grupos acetilos las zonas amorfas del polímero quedaran expuestas hacia las enzimas facilitando su degradación.

De cualquier manera para el quitosano DA 4.86 se presenta un descenso en la producción después de las 72 h, este comportamiento se puede atribuir a baja disponibilidad de unidades acetiladas, presentándose las producciones mayores de azúcares reductores y GlcNAc en el quitosano DA 23 (0.11 mg/mL y 0.068 mg/mL respectivamente con un 2.72% Rendimiento GLcNAc/quitina).

Se ha reportado que la familia 18 de las quitinasas presenta una catálisis asistida por sustrato, por lo tanto la enzima requiere una unidad acetilada y se ha demostrado que las quitinasas de *Serratia marcescens* pueden degradar quitosanos con una fracción acetilada (F_A) de hasta 0.13 (Sorbotten y col., 2005). Por su parte Xie y col., (2001) reportan actividad quitinolítica sobre quitosano con DA 20 así como glicol quitina y no logró la hidrólisis de quitobiosa lo cual sugiere que esta enzima tiene especificidad por sustratos poliméricos con enlaces β -1,4, ellos atribuyen el hecho de que una quitinasa hidrolice quitosano a que estas enzimas rompen enlaces de GlcNAc-GlcNAc mientras que una quitosanasa hidroliza enlaces entre GlcN-GlcN, en el caso de un quitosano que presenta tanto fracciones acetiladas como desacetiladas, la quitinasa se encarga de hidrolizar enlaces de GlcNAc-GlcN, además de que los quitosanos presentan una mayor solubilidad comparados con la quitina altamente cristalina, siendo la solubilidad de los sustratos un factor definitivo para que la enzima pudiera hidrolizarlos.

Nakagawa y col., (2013) reportan una tendencia general, en donde la disminución en el tamaño de partícula y el I_{CR} generan un aumento en la hidrólisis de la quitina pero encuentra que el tamaño de partícula óptimo para cada una de las quitinasas fue distinto, siendo la quitina con un tamaño de 43.7 μm la que generó los mayores rendimientos para ChiA, además de presentarse una hidrólisis más rápida, mientras que para ChiB y ChiC se mostró un rendimiento mayor al emplear quitina de 24.3 μm como sustrato, en reportes anteriores por Nakagawa y col., (2011) quitinas con tamaño menor (10.1 μm) eran requeridas para alcanzar los mismos rendimientos, atribuyendo esto, principalmente, a la preferencia del sistema enzimático por alguno de los sustratos, caso similar es lo encontrado en este trabajo ya que a pesar de

que CFN presentó un tamaño de partícula e I_{CR} menor (240 nm e I_{CR} 68.8%) que la quitina SE 0.1 g/mL 8 min (911 nm e I_{CR} = 76.85%), la producción de azúcares reductores fue mayor en este último sustrato (Figura 28) alcanzado los 0.37 mg/mL mientras que para CFN la producción fue de 0.198 mg/mL lo cual representa una 46% menos, esto también puede ser atribuido al DA de las quitinas ya que la quitina SE presentó un 94.47% mientras que CFN presentó un 77.9% (16.57% menor), como se mencionó anteriormente las quitinasas pueden hidrolizar sustratos hasta con una F_A de 0.13 pero la obviamente la disponibilidad de los residuos acetilados requeridos por la enzima es menor y esto conduce a rendimientos también menores.

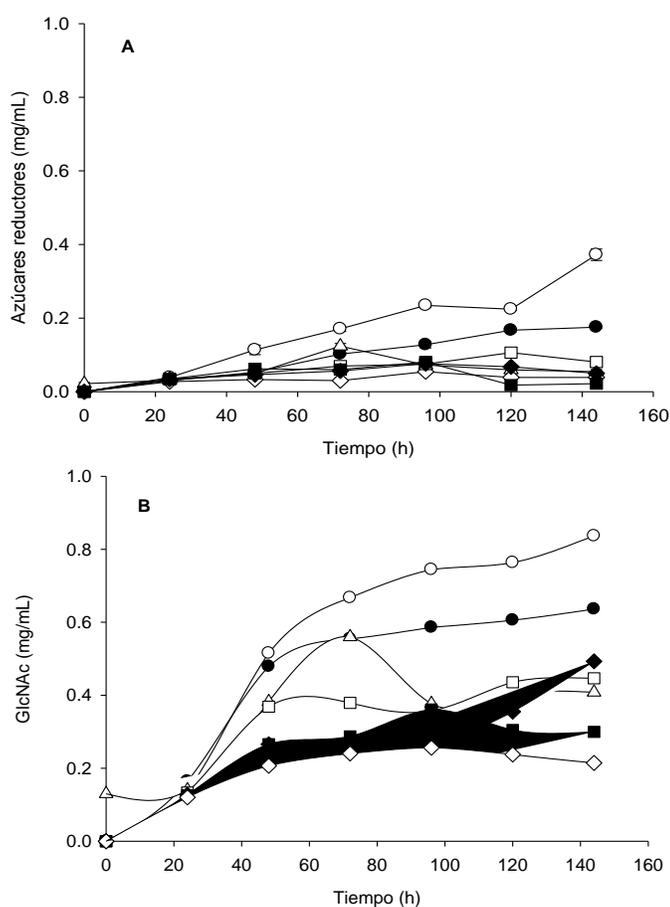


Figura 18. Cinética de hidrólisis enzimática A) Azúcares reductores, B) GlcNAc determinada por HPLC. Sustratos: CP (◇), quitina ultrasonificada (△), SE 0.1 g/mL, 180 °C (○), SE 0.4 g/mL 5 min, 180 °C (●), quitosano DA 52 (◆), quitosano DA 23 (□) y quitosano DA 4.86 (■).

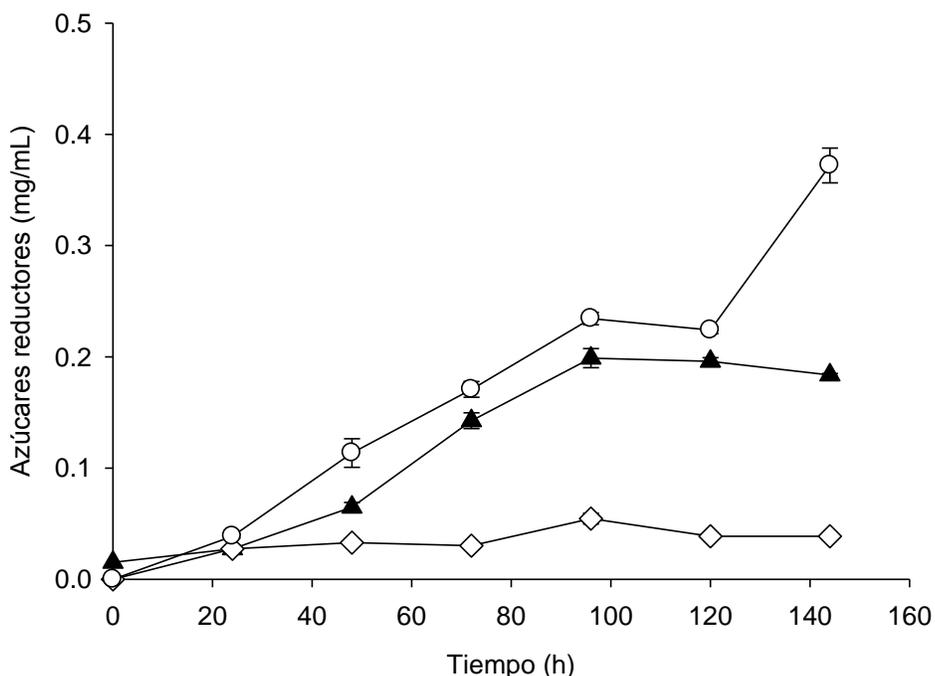


Figura 19. Azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis enzimática de CP (◇), SE 0.1 g/mL, 180 °C (○) y CFN (▲).

6.6 Determinación del DP de COS por MALDI-TOF

En términos químicos, la estructura de cualquier compuesto está definida por la conectividad de todos los átomos y su estereoquímica, incluyendo la configuración y conformación de la molécula. La estructura y el análisis de COS por espectrometría de masas se limitan a la determinación del número de fracciones acetiladas y desacetiladas y su ubicación en la cadena de los oligosacáridos, es decir su secuencia (Peter y Eberlin, 2010). A continuación se muestran los espectros de MALDI-TOF de las muestras obtenidas de hidrólisis enzimática de quitinas pretratadas en sus tiempos de mayor producción para cada sustrato, así como muestras de COS obtenidos químicamente por hidrólisis ácida y acetólisis de quitina. La asignación de la identidad los picos se llevó a cabo con base en la tabla de

incrementos reportada en el Anexo 5, tomando en cuenta la formación de aductos de sodio y potasio lo cual implica un incremento en las relaciones (m/z) de 22.98 y 39.09 respectivamente, la aparición de estos se puede deber al uso de algunos reactivos como lo son los amortiguadores (los cuales presentaban estos elementos en su composición) a lo largo del proceso desde la etapa de producción del extracto enzimático hasta la purificación parcial de las enzimas.

La hidrólisis de la quitina SE presentó oligosacáridos con DP de 2, 3, 4 y 5 (Figura 29) siendo los más abundantes el dímero desacetilado (D2) seguido del trímero parcialmente acetilado (D2A1), en general esta mezcla de COS presento un F_A de 0.28 por otra parte la hidrólisis de quitina ultrasonicada (Figura 30) presento el mismo F_A que la quitina SE, con la presencia de dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros siendo de igual forma D2 y D2A1 los oligosacáridos más abundantes, pero es evidente que las intensidades de los picos correspondientes a estas m/z no son tan intensos como los encontrados para SE disminuyendo de 90 y 60% a 50 y 30% para D2 y D2A1 respectivamente, lo cual coincide con lo encontrado en el análisis de azúcares reductores y HPLC donde se encontró que la quitina SE presento una mayor hidrólisis que la ultrasonicada, cabe mencionar que el número de homólogos (COS con el mismo DP pero diferente número de grupos acetilo presentes) fue también mayor para quitina SE. Para el caso de CFN (Figura 33) se obtuvieron DP entre 2 y 5 al igual que las quitinas SE y ultrasonicada pero la presencia de grupos acetilo fue mayor encontrándose un F_A de 0.45 siendo este valor el más elevado que se encontró en todas las muestras analizadas, los COS más abundantes fueron dímeros y trímeros parcialmente acetilados (D1A1 y D2A1), además se encontró un mayor número de homólogos del pentámero (D5, D4A1, D3A2 y D2A3) mientras que para la quitina SE y ultrasonicada se detectó la presencia de pentámeros pero únicamente en su forma desacetilada (D5).

Se analizó también el quitosano con DA 52 a dos tiempos (24 y 96 h) de hidrólisis para comparar los patrones de COS producidos durante la cinética, encontrando que en ambos tiempos la mayor producción fue de GlcN y GlcNAc, los F_A fueron similares entre ellos (0.29 y 0.24 para las 24 y 96 h respectivamente) pero como era de

esperarse fueron menores a los encontrados para la quitina SE y ultrasonicada debido a que estas quitinas presentaron DA de 94.47 y 92.7% respectivamente, por su parte los DP encontrados a las 24 h fueron de 1 a 3 mientras que a las 96 h ya se empezaron a detectar tetrámeros parcialmente acetilados (D3A1) encontró también una mayor intensidad relativa de GlcNAc a las 96 horas.

La Figura 34 muestra el espectro de MALDI-TOF de la quitina tratada por acetólisis un F_A de 0.26, y la producción de COS con DP de 2 a 6 lo cual es superior a lo reportado por Kurita y col., (1993) quienes reportan la presencia de monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros únicamente esto al realizar la acetólisis de β -quitina, siendo el dímero el que se encontró en mayor proporción lo cual es coincidente con lo encontrado en esta investigación donde el dímero presento una intensidad relativa del 90% seguido del trímero parcialmente acetilado (D2A1) con una intensidad relativa del 45%.

Los oligosacáridos comerciales obtenidos por hidrólisis química de quitina presentan DP de 2 a 6 (Figura 35) con la mayor producción enfocada hacia el dímero desacetilado (D2) con intensidades relativas cercanas al 97%, es importante mencionar que esta muestra presenta desacetilación es decir su F_A fue de 0, lo cual puede limitar la aplicación de estos productos ya que la mayoría de las actividades biológicas se ven influenciadas por el DP y acetilación, esto puede ser atribuido al hecho de que la hidrólisis química de quitina en medios ácidos involucra 3 etapas que envuelven la hidrólisis del polisacárido en unidades monoméricas más pequeñas, la producción de *GlcNAc* y por último la conversión de *GlcNAc* a glucosamina, es decir la hidrólisis no es limitada a los enlaces glicosídicos sino que también se presenta una hidrolisis de los grupos acetilados del polímero debido a las condiciones tan agresivas empleadas (Einbu y col., 2007).

Aun cuando ambos métodos químicos coinciden en la producción de COS con DP de 2 a 6 así como en la producción de quitina enfocada hacia la producción mayoritaria del dímero desacetilado (D2), el método de acetólisis presento un F_A así como un numero de homólogos mayor que los obtenidos en el procesos de hidrólisis ácida, esto puede ser atribuido que durante la acetólisis de quitina la hidrólisis ácida

empleada se ve acompañada del uso de anhídrido acético más el posterior ajuste de pH con acetato de sodio.

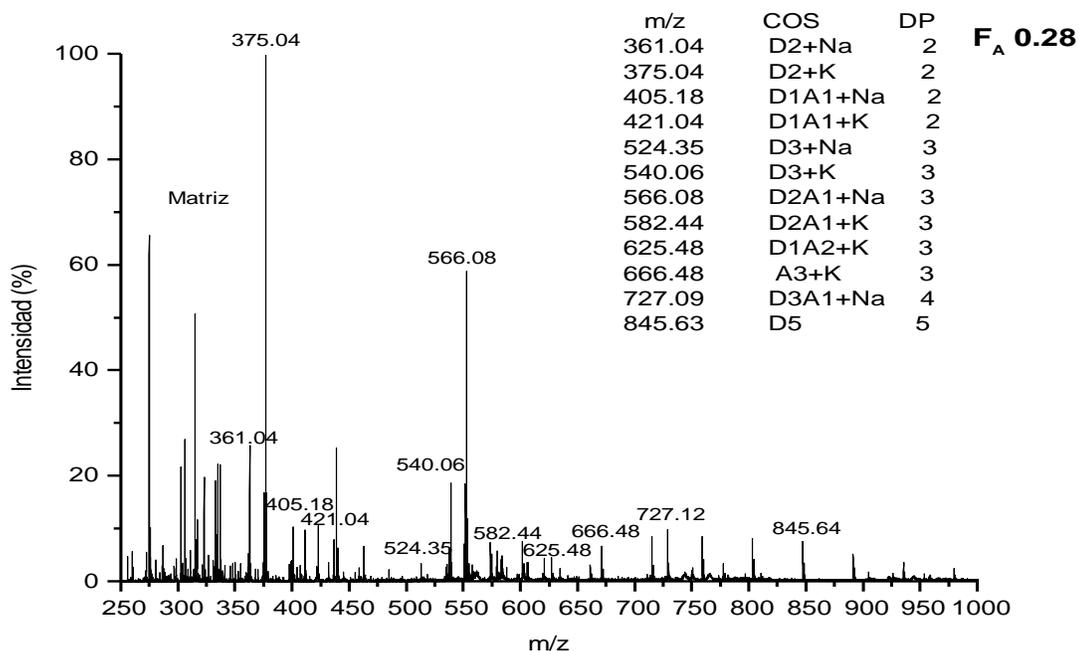


Figura 20. Espectro de MALDI-TOF de la hidrólisis de quitina SE 0.1 g/mL 8 min

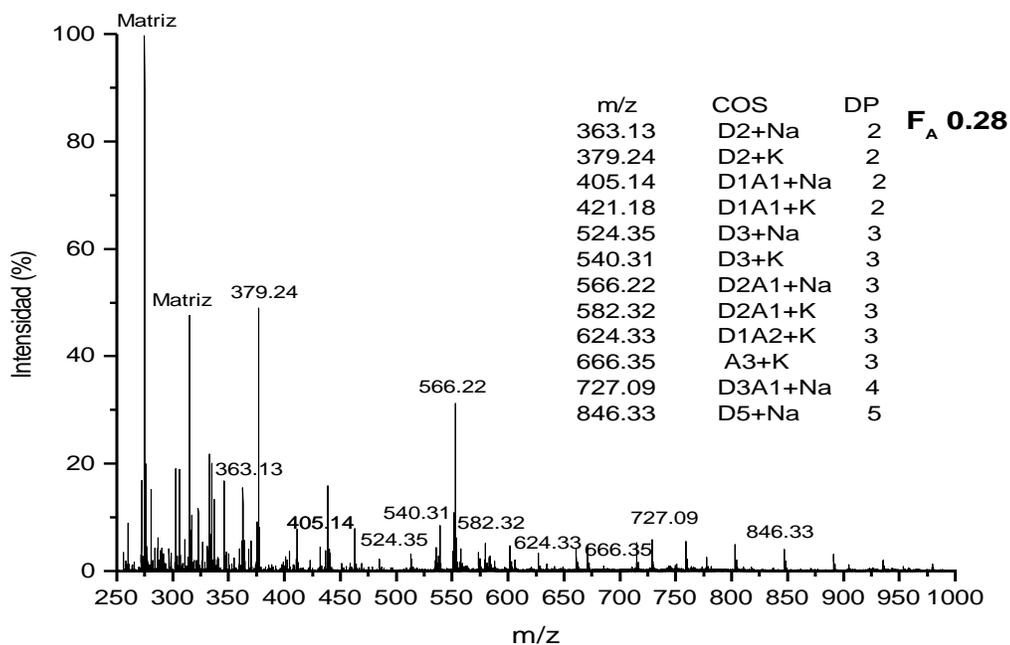


Figura 21. Espectro de MALDI-TOF de la hidrólisis de quitina ultrasonicada.

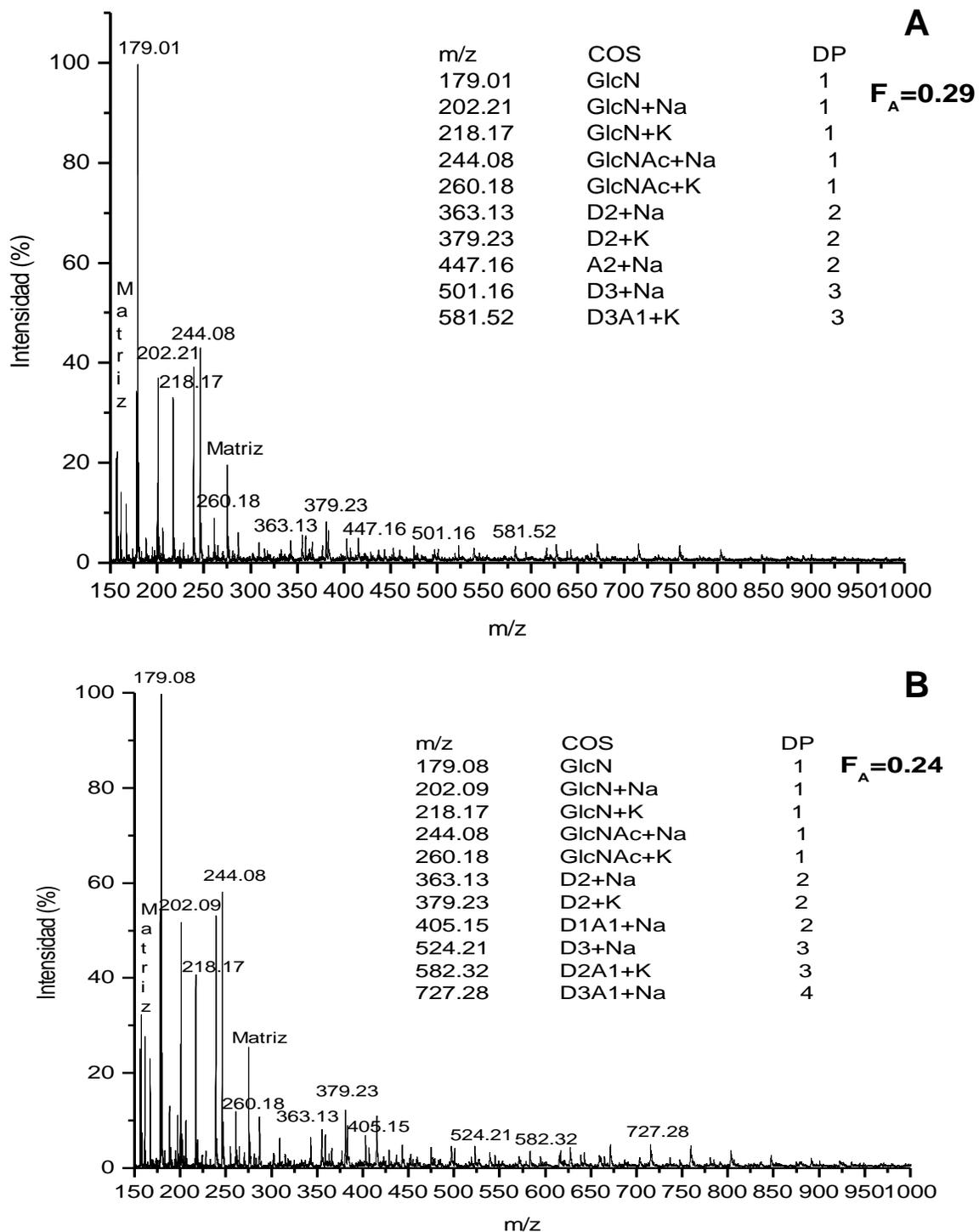


Figura 22. Espectro de MALDI-TOF de hidrólisis de quitosano DA52 por A) 24 h y B) 96 h

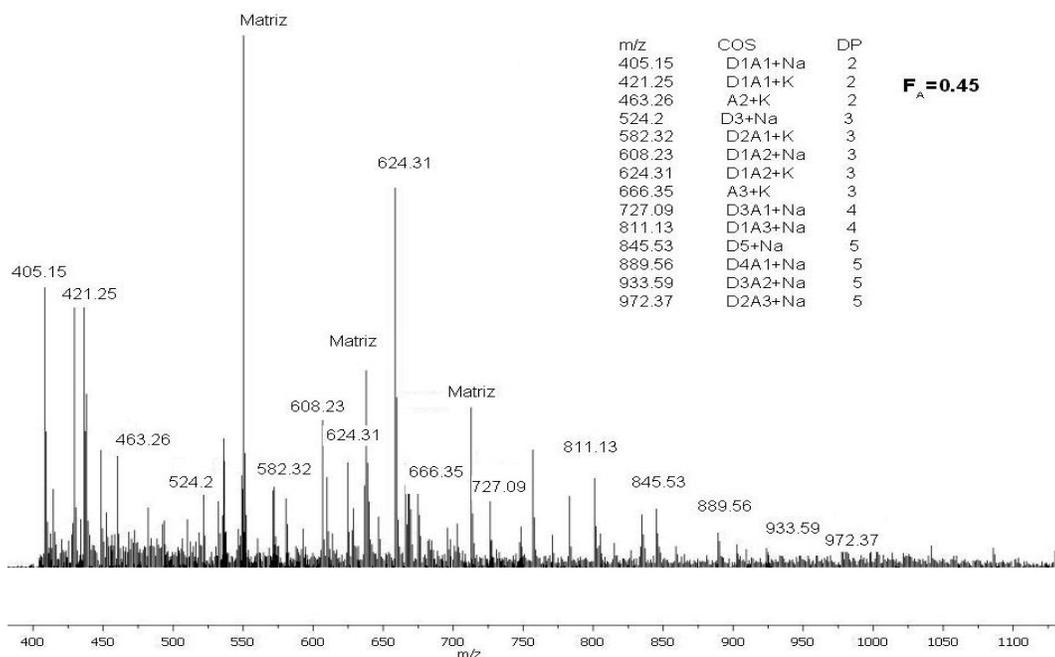


Figura 23. Espectro de MALDI-TOF de quitina CNF hidrolizada enzimáticamente.

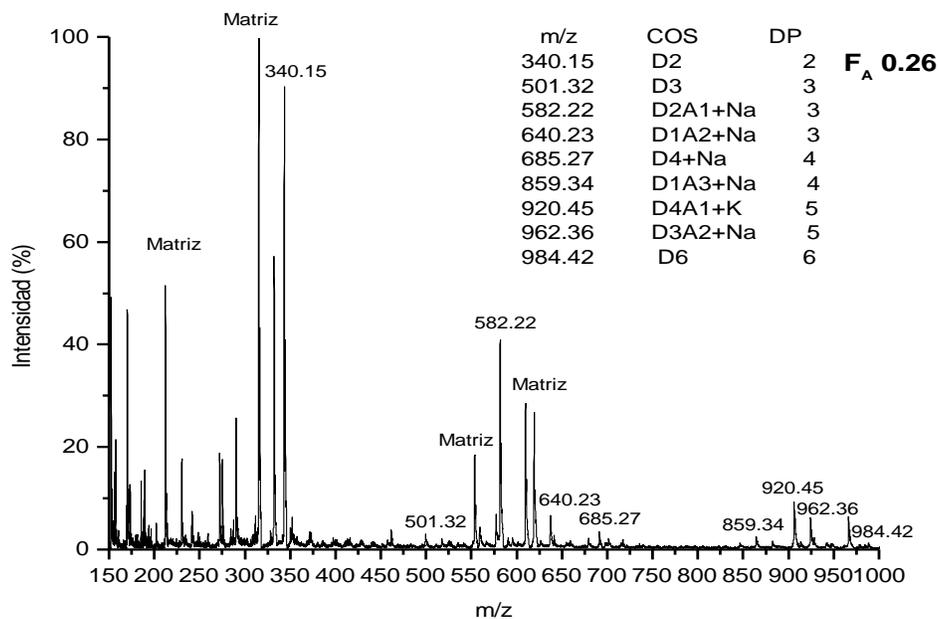


Figura 24. Espectro de MALDI.TOF de quitina hidrolizada químicamente por acetólisis.

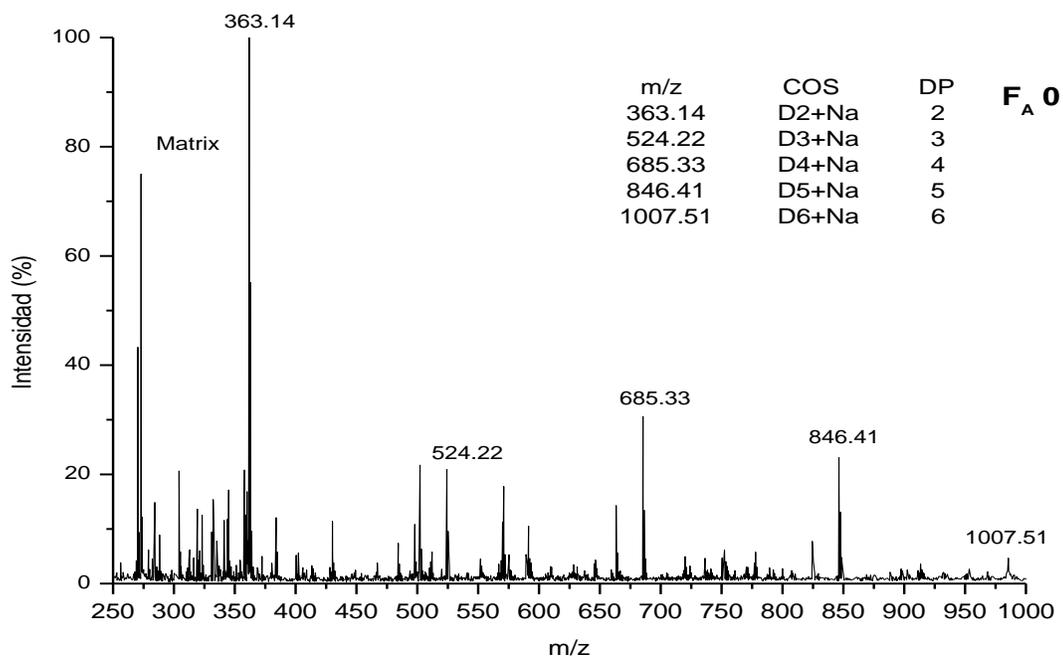


Figura 25. Espectro de MALDI-TOF de COS comerciales marca KYTOLIFE.

7 CONCLUSIONES

Lecanicilium lecanii, en medio QMC10 suplementado con quitina coloidal produjo más enzimas quitinolíticas a las 96 h de cultivo, mientras que las proteasas lo hicieron a las 120 h, el uso de quitina cruda, a pesar de ser una fuente de carbono de más fácil obtención, produjo una actividad quitinolítica muy por debajo de la obtenida con quitina coloidal. Por otro lado, la purificación parcial mediante GPC-SEC permitió separar las proteasas de la Nhasa y la Endo y las proteínas presentes en las fracciones de SEC analizadas por SDS-PAGE presentaron bandas de 38 y 50 kDa, su actividad quitinolítica fue corroborada mediante zimogramas con sustratos específicos para cada una de las quitinasas.

Los resultados demuestran que todos los pretratamientos logran modificaciones estructurales de la quitina disminuyendo el I_{CR} y en algunos casos el DA ligeramente, siendo la expansión rápida de R134a en combinación con el proceso fibrilación el que logró la reducción mayor en el I_{CR} y DA alcanzando 68.8 y 77.9% respectivamente, seguido por el tratamiento de SE donde se alcanzó una disminución del 11.28% en el I_{CR} comparado con CP.

Las quitinasas obtenidas del hongo *L. lecanii* lograron hidrolizar tanto quitinas modificadas como quitosanos, consiguiendo la producción de oligómeros de quitina con DP entre 2 y 5 siendo la quitina CFN la que produjo los COS con el F_A más elevado (0.45), por otra parte, la producción química de oligosacáridos por hidrólisis ácida o acetólisis generó mezclas con F_A menores, variando entre 0 y 26 respectivamente y con DP hasta de 6. Al no existir en la literatura reportes sobre SE o expansión rápida de R134a en quitina, este trabajo propone un proceso novedoso para la modificación estructural de quitina que, además de ser suave, no tóxico y ambientalmente amigable, su combinación con SE mejora la oligomerización enzimática y permiten la producción de oligosacáridos *N*-acetilados.

8 PERSPECTIVAS

La purificación parcial de quitinasas de *L. lecanii* logra la producción de un sistema sinérgico y consecutivo compuesto por N.acetil-hexosaminidasa y Endo así como la eliminación de proteasas pero es necesario considerar una mejora en el uso de estas enzimas durante el proceso de hidrólisis ya que la actividad residual de las quitinasas después de 24 h disminuye drásticamente lo que podría estar afectando la producción de los COS este fenómeno podría ser solucionado agregando enzima o sustrato en una segunda ocasión a la mitad del tiempo de hidrólisis, esto ha sido reportado en algunas investigaciones para hidrólisis enzimáticas que duraban alrededor de una semana, en nuestro caso al usar como sustrato α quitina y sus formas modificadas no sería tan necesaria la adición de sustrato en una segunda ocasión ya que regularmente las quitinasas no logran consumir en un 100% este tipo de sustratos aun en tiempos prolongados de hidrólisis.

Otro aspecto a resaltar en esta etapa es el uso del surfactante Tritón X-100 ya que a pesar de que este logró el objetivo de mejorar la solubilización de la proteína durante la precipitación con sulfato de amonio, no se logra la remoción total del mismo durante los pasos posteriores de purificación (cromatografía de exclusión molecular) y sigue presente durante la hidrólisis y por lo tanto en los productos obtenidos de la misma lo cual representa un problema recurrente durante el análisis de estos productos por MALDI-TOF, por lo que sería recomendable sustituir el surfactante por el uso de acetonitrilo al 10% como se ha reportado en otros trabajos.

Considerando los resultados favorables en cuanto a la disminución del I_{CR} obtenidos con el tratamiento de SE se recomienda seguir trabajando en esta línea ya que la investigación sobre SE en quitina es muy escasa, además sería recomendable profundizar en el efecto que tiene este tratamiento en la desacetilación de quitina ya que representaría una alternativa a los métodos químicos con los cuales se generan residuos contaminantes y a su vez los quitosanos obtenidos presentan cierto grado de depolimerización.

Otra alternativa sería el empleo de los productos obtenidos de steam explosión como sustrato para las enzimas quitina-desacetilasas con la finalidad de obtener quitosano biológico, esto con base en los resultados obtenidos en donde el SE y su consecuente reducción en el I_{CR} logran mejorar el acceso de las quitinasas a los sustratos, mejorando los rendimientos en la producción de COS.

9 TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES

9.1 TRABAJOS PRESENTADOS

- Presentación: **“Producción de β -N-acetilhexosaminidasa por *Lecanicillium lecanii* inmovilizado”** en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en Querétaro, Querétaro (2011)
- Presentación: **“Hidrólisis enzimática de quitina por quitinasas de *Lecanicillium lecanii*”** en 6th Iberoamerican Chitin Symposium y 12th International Conference of chitin y chitosan en Fortaleza, Brasil (2012)
- Presentación: **“Chitinases production from *Lecanicillium lecanii* y their application in chitin hydrolysis”** en 23rd Enzyme Mechanisms Conference en Coronado Bay, California (2013)
- Presentación: **“Effect of carbon source on the production of \square -N-acetylhexosaminidases y chitin deacetylases from *Colletotrichum gloeosporioides* in solid state y submerged cultures”**en 23rd Enzyme Mechanisms Conference en Coronado Bay, California (2013)
- Presentación: **“Effect of chitin pretreatment in the production of chitinoligosaccharides by chitinases of *Lecanicillium lecanii*”** XV Nacional Congreso de Biotecnología y Bioingeniería, Cancun Quintana Roo . (2013)
- Presentación: **“Effect of temperature y pressure in steam explosion as pretreatment of chitin for enzymatic hydrolysis”**. 1st Biotechnology world symposium, 9no. Encuentro Nacional de Biotecnología IPN, Tlaxcala, Tlaxcala.

9.2 ESTANCIAS

- Estancia de Investigación en la Universidad Claude Bernard LYON 1 en Lyon, Francia en Enero-Abril 2014. Obtención y Caracterización de muestras de quitinolíigosacáridos.

9.3 PUBLICACIONES

- Villa-Lerma G., Gonzalez-Marquez H., Gimeno M., López-Luna A., Barzana E., Shirai K. (2013). Ultrasonication y steam explosion as pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. *Bioresource Technology*. 146:794-798.
- Guadalupe Villa-Lerma, Humberto González-Márquez, Miquel Gimeno, Stéphane Trombotto, Laurent David, Shinsuke Ifuku Keiko Shirai. Rapid expansion of supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (r134a) on the enzymatic hydrolysis of chitins by chitinases of *Lecanicillium lecanii* En preparación.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Short Communication

Ultrasonication and steam-explosion as chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*



Guadalupe Villa-Lerma^a, Humberto González-Márquez^a, Miquel Gimeno^b, Alberto López-Luna^a, Eduardo Bárzana^b, Keiko Shirai^{a,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros, San Rafael Atlixco 186, Mexico City C.P. 09340, Mexico
^b Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Mexico City C.P. 04510, Mexico

HIGHLIGHTS

- Sonication and steam explosion are proposed for chitin pretreatment and their further use in enzymatic hydrolysis.
- Chitosans were also evaluated as substrates for chitinases.
- Steam explosion reduces crystallinity of chitin and enhanced enzymatic hydrolysis.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2013
 Received in revised form 30 July 2013
 Accepted 1 August 2013
 Available online 13 August 2013

Keywords:

Chitin
Lecanicillium lecanii
 Chitinases
 Steam explosion

ABSTRACT

In this study, chitin oligosaccharides have been successfully produced using chitinases from submerged fermentation of *Lecanicillium lecanii*. The highest Hex, Chit and Prot production was 0.14, 0.26 and 2.05 U/mg of protein, respectively, which were attained varying pH from 5 to 8 after 96 h. Culture conditions conducted at constant pH of 6 resulted in significantly lower enzyme production. The crude enzyme was partially purified by salting out with (NH₄)₂SO₄ followed by size exclusion chromatography to isolate the chitinase mixture for further chitin hydrolysis assays. In this regard, chitin substrates were pretreated with sonication and steam explosion prior to enzymatic reaction. Structural changes were observed with steam explosion with 11.28% reduction of the crystallinity index attained with the lowest chitin/water ratio (0.1 g/mL). Pretreated chitins reached the highest production of reducing sugars (0.37 mg/mL) and GlcNAc (0.59 mg/mL) in 23.6% yield.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chitin is a naturally abundant polysaccharide composed of β-1–4 linkages of mainly *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) repeat units, and in lesser extent (<80%) of *D*-glucosamine units (GlcN). Chitin and chitosan presented several commercial uses and are industrially obtained from exoskeletons of crustaceans (Jang et al., 2004). There is an increasing biomedical interest on chitin oligosaccharides (GlcNAc)_{2–7} owing to the biological activities such as antibacterial, antitumor and immune enhancing effects (Kuroiwa et al., 2009). The chemical methods for chitin hydrolysis involve the use of acids at high concentrations, where the formed oligomers might be deacetylated in a process with poor reaction control. Alternatively, enzymatic methods offer selective hydrolysis in mild and environmentally friendly conditions for chitin oligosaccharide production. The enzymatic hydrolysis of chitin is carried out by a complex chitinolytic system that include endochitinases (EC

3.2.1.1.4), exochitinases (EC 3.2.1.14), chitobiase (EC 3.2.1.30) and β-*N*-acetyl hexosaminidases (EC 3.2.1.52) (Chavan and Deshpande, 2013). *Lecanicillium lecanii* has attracted much interest owing to its application in biological control and chitinases production in submerged and solid substrate cultures (Bing-Lan et al., 2003; Marín-Cervantes et al., 2008; Fenice et al., 2012). Noteworthy, *L. lecanii* has been reported to produce several proteases during cultivation in submerged culture using a medium supplemented with grasshopper cuticle (Bidochka and Khachatourians, 1994). The presence of proteases in the crude enzyme (CE) might reduce the chitinolytic activity in the hydrolysis and therefore, partial purification of chitinases is pursued.

However, in addition to these direct effects on enzyme production, further chitinase-mediated hydrolyses of chitin are generally restricted by the strong dipole–dipole interactions among biopolymer chains that define highly crystalline domains. To circumvent this drawback, we have investigated the effect of sonication and steam explosion (SE) as chemical-free methods. Generally, sonication in chemical processes includes faster reaction rates, higher product yields and reduction on energy consumption. Recently,

* Corresponding author. Tel.: +52 55 58 04 4921; fax: +52 55 58 04 4712.
 E-mail address: smk@xanum.uam.mx (K. Shirai).

Ajavakom et al. (2012) examined the ultrasonic wave and micro-wave assisted acidic hydrolysis of chitin toward the monosaccharide GlcNAc production, however, to this date reports on ultrasonication-assisted enzymatic hydrolysis of chitin or chitosan are absent in the literature. Additionally, SE is pointed as an useful method to increase cellulose accessibility for enzyme in several biomass sources regarding critical factors as the opening of crystalline domains and increased pore size volumes (Li et al., 2007), and alike to the low wave radiation methods, the application of SE as pretreatment for enzymatic chitin hydrolysis have not been reported hitherto. This study describes the advantages of the chitin oligosaccharide production from sonicated and SE chitinous substrates by partially purified chitinases of *L. lecanii*.

2. Methods

2.1. Microorganism and culture conditions

L. lecanii ATCC 26854 was cultured on potato dextrose agar at 25 °C for 7 days and maintained at 4 °C prior to use. Spore suspension was prepared with sporulated cultures of strains by shaking with sterile Tween 80 solution (0.01% v/v) up to a concentration of 10^7 spores/mL. Culture was conducted in a 3L reactor (Applikon BV, Holland) at 102 rpm, 1 vvm, 25 °C for 96 h, using Czapeck medium with the following composition in g/L: NaNO₃ (3.73), Na₂HPO₄ (3.0), MgSO₄ (0.5), FeSO₄ (0.096), KCl (0.5) pH was set at 5 for 72 h and shifted to 6 for 24 h.

2.2. Determination of enzymatic activities and protein contents

Samples were centrifuged at 12,700g and 4 °C for 25 min, the supernatants were considered as the CE and analyzed for *N*-acetylhexosaminidase activity (Hex) using as substrate *p*-Nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosamine where one unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute. The determination of endochitinase (Chit) activity was carried out using colloidal chitin and the unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to reduce the turbidity of a colloidal chitin suspension in 0.05 absorbance units. Protease activity (Prot) of the crude enzyme was determined using casein substrate 1% (w/v) and the enzyme activity was defined as the amount of enzyme needed to produce an increase in absorbance of 0.001/min at 280 nm. Protein determination was carried out by the method of Bradford (BioRad, USA).

2.3. Purification methods

CE was precipitated by adding ammonium sulfate, leading to 60% of saturation then centrifuged at 18,566g at 4 °C for 40 min. The precipitates (concentrated CE) were solubilized in 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl at pH 7.8 and injected in a Sephacryl™ S-100 High Resolution 26/60 column (GE Healthcare, USA). Elution was carried out using an isocratic flow of 1.3 mL/min of solution 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.15 M NaCl at pH 7.8.

2.4. Electrophoresis and zymograms

SDS-PAGE was carried out using wide range molecular mass markers (Bio-Rad), the electrophoresis gel was stained by silver nitrate (Bio-Rad, USA) and analyzed with the ImageJ 1.41o software (National Institutes of Health, USA). The presence of enzyme activities was observed in the zymograms with the substrates 4-methylumbelliferyl-*N*-*N*-*N*-acetyl- β -D-glucosamine for Chit activity and

4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamine for Hex activity (Trudel and Asselin, 1989).

2.5. Pretreatment of chitin by FPT deacetylation, sonication and SE

Chitin was obtained and purified from lactic acid fermentation. Heterogeneous deacetylation of chitins was carried out according to the freezing-pumping-thawing (FPT) method (Pacheco et al., 2011). Chitin was pulverized and sieved to a particle size of 177 μ m before treatment. A chitin sample was treated by sonication for 20 min in citrate phosphate buffer 50 mM at pH 6 (Barreto-Cardoso et al., 2001). Another sample of chitin was subjected to SE in a 100 mL stainless steel high-pressure reactor equipped with an external ceramic body heating jacket, manometer, two high-pressure valves (Swagelok, USA) and safety rupture disk (Swagelok, USA). Chitin ratios of 0.1, 0.2, 0.4 and 2 g/mL of deionized water were prepared and SE process was carried out at a temperature of 180 °C and 1 MPa (Li et al., 2007) varying residence time of 1, 3, 5 and 8 min.

2.6. Chitinous substrate characterization: degree of acetylation (DA) and crystallinity index (I_{CR})

Chitin was ground (size 106 μ m) and dried at 80 °C. ATR-FTIR spectra of the samples were acquired at 24 °C and 30% RH by coupling the ATR accessory (Perkin Elmer, USA) to FTIR equipment (Perkin Elmer 100, UK) The spectra were collected by averaging 60 scans at 4000–550 cm^{-1} spectral resolution. For DA determination, samples of chitin were treated according to the procedure described by Percot et al. (2003) using DCl/D₂O and for the case of chitosan samples were dissolved in HCl/D₂O, both samples were analyzed by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy in a Bruker (Advance III 500, Germany) at 200 MHz with 3-(trimethylsilyl)propionic acid as internal reference. DA of chitins and chitosans were calculated from integration of assigned signals on the NMR spectra as reported by Pacheco et al. (2011). I_{CR} of chitinous substrates were determined by X-ray diffraction measurements in a diffractometer (Bruker D8 Advance) with an incident radiation CuK α and wave length of $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ in the range of $2\theta = 4.5\text{--}50$ °C with steps of 0.02°. I_{CR} of the samples was determined according to the method reported by Focher et al. (1990) using the intensities of the (110) peaks at around $2\theta 20^\circ$ (corresponding to the maximal intensity) and at $2\theta 16^\circ$ (corresponding mainly to the amorphous halo contribution).

2.7. Chitinase-mediated hydrolysis of chitin

Hydrolysis was conducted in a citrate phosphate buffer 50 mM pH 5, the substrate concentrations for both sonicated and SE treated chitins was 2.5 mg/mL, an enzyme concentration of 0.1 U/mL and stirring speed of 200 rpm at 40 °C (Ramirez-Coutiño et al., 2010). Reaction medium was centrifuged for 10 min at 12,700g and 4 °C, collecting the supernatant and filtered through a 0.45 μ m membrane.

2.8. Determination of reducing sugars and GlcNAc by HPLC

The amount of reducing sugars was determined in the filtrates from the enzymatic reaction media, which were lyophilized and dissolved in mobile phase of acetonitrile/water (75:25 (v/v) prior to injection in an Agilent 1260 Infinity HPLC equipped with a Shodex Asahipak NH₂P-50 4E column (4.6 \times 250 mm). Column was eluted at 1.4 mL/min flow and a refractive index (Agilent 1260 Infinity) was used as detector. GlcNAc (Sigma, USA) was used as standard for both techniques. Yield of GlcNAc ($Y_{GlcNAc(chitin)}$) was

calculated by the ratio of GlcNAc produced from chitin substrate after enzymatic hydrolysis.

2.9. Determination of degree of polymerization (DP) of chitin oligosaccharides by MALDI-TOF spectrometry

Filtrates were ultrafiltered through a cut-off membrane of 5 kDa (Millipore, USA), the permeates were freeze-dried and the residue was dissolved in methanol/water 1:1. Then, 0.5 μ L was mixed on the target with 2 μ L of the matrix (25 g/L of 2,5-dihydroxybenzoic acid in acetonitrile, containing 0.1% (v/v) of trifluoroacetic acid). Samples were dried at room temperature under a stream of air. Mass spectra were recorded using a MALDI-TOF/TOF 4800 Plus Analyzer (Applied Biosystems) equipped with a YAG laser (Y3A15012) of 355 nm, analyses were performed using 6500 mv in reflection mode.

3. Results and discussion

3.1. Partial purification of chitinolytic enzymes

The specific activity of CE after salting out varied from 0.14 to 0.45 U/mg of protein for Hex, from 0.26 to 0.67 U/mg for Chit and from 2.05 U/mg to 3.14 U/mg for Prot. Concentrated CE was purified by SEC where fractions from 20 to 27 displayed the highest activities with peaks in fractions 21 and 22 of 0.19 U/mL and 0.72 U/mL (13.84 and 3.75 U/mg of protein) for Hex and Chit, respectively (see [Supplementary data 1](#) for Hex and Chit activities in SEC fractions). Noteworthy, the fractions of SEC with chitinolytic activities did not present Prot. The SDS-PAGE of fractions collected from SEC are shown in [Fig. 1a](#), where only two bands with 38 kDa and 50 kDa remained after the chromatography. The presence of both activities was corroborated with the zymograms for both Chit and Hex ([Fig. 1b and c](#)). In agreement with our findings, a previous work by Bing-Lang et al., (2003) show protein bands with chitinolytic activity of 35 and 50 kDa produced in submerged culture of *L. lecanii*, and another work by [Rocha-Pino et al. \(2011\)](#) found bands with exochitinase activity of 32 and 45 kDa.

3.2. Characterization of chitins treated with FPT deacetylation, sonication and SE

The measured I_{CR} and DA for initial native chitin were 88.13% and 98.14%, respectively, which are similar to that reported by [Pacheco et al. \(2011\)](#) in their chitin obtained from lactic acid fermentation (8 I_{CR} 6.4% and DA 94%) (see [Supplementary data 2](#) in the online version of this article for the I_{CR} and DA data of chitin). In the present study, the I_{CR} of chitin samples decreased after the SE for all treatments and remained constant after 2 min of exposure (see [Supplementary data 3](#) for a graphical representation of I_{CR} variations versus exposure time for different treatments). Similar behavior was observed in DA, with maximum decrease after the SE (8 min residence time) treatments of 4.52% (0.2 g/mL) (see [Supplementary data 4](#) in the online version of this article for the DA data of SE chitins). This is consistent with the chitin deacetylation studies using SE conducted by [Focher et al. \(1990\)](#) where the initial order of the chitin molecules was not irreversibly modified and could be recovered during the regeneration or heating steps. The highest decrease in I_{CR} (11.28%) was found at 0.1 g of chitin per mL of water, which presented 3.7% decrease of DA. In agreement with earlier report by [Focher et al. \(1990\)](#), the sample of chitosan presented higher decrease in I_{CR} values than those measured after both SE and sonicated chitins (see [Supplementary data 2](#) in the online version of this article for the I_{CR} and DA data of sonicated chitin), indeed, the highest and the lowest decrease in I_{CR}

were 19.73% and 2.63% for chitosan (DA 4.86) and sonicated chitin, respectively (see [Supplementary data 2 and 4](#)).

IR spectra for native chitin and those after treatments display the expected two strong absorption bands at 1652 and 1620 cm^{-1} assigned to carbonyl stretching, however, an additional shoulder is observed at 1633 cm^{-1} in the spectra of treated samples (see [Supplementary data 5](#) for examples of FT-IR spectra of native and treated chitins). In this regard, [Jang et al. \(2004\)](#) reported that the amide I band is split in the highly crystalline α -chitin spectrum while generally this region in the less crystalline β -chitin is resolved in a single peak owing to lowest dipole-dipole interactions. The native chitin band at 1650 cm^{-1} in our spectra decrease considerably and the shoulder at 1633 cm^{-1} was not observed after the SE treatments which might be in agreement with a reduction of amino-based hydrogen bonding. It can be observed a broad band in the C–O stretching (1021 cm^{-1}) after the SE treatment (see [Supplementary data 5](#)), which might also be ascribed to the reduction of hydrogen bonding. The IR spectrum of sonicated chitins was identical to native chitin (see [Supplementary data 5](#)). However, depolymerization was observed in low extension after sonication ([Fig. 2](#)) which might be ascribed to the vibrational motion of the molecular structure thus generating cavitation bubbles and production of energy ([Barreto-Cardoso et al. 2001](#)). On the contrary, reducing sugars were not detected at $t = 0$ for SE treated chitins, pointing out SE as a less chemically aggressive method than sonication. On the other hand, DA slightly decreased from 98.14% in native chitin to 92.70% and 93.37% after the SE and sonication process, respectively (see [Supplementary data 2 and 4](#)). The experimental results evidenced that the structural modifications owing to the SE aimed to facilitate the enzymatic hydrolysis without drastic changes in the overall degree of acetylation and without depolymerization.

3.3. Chitinases-mediated hydrolysis of sonicated, SE chitins and chitosans

The reducing sugars were monitored from 24 to 144 h for all substrates as well as the GlcNAc production by HPLC as the final product of exo and endo-acting enzyme. As observed in [Fig. 2](#), the sonicated chitin sample had its maximum production at 72 h with 0.12 mg/mL of reducing sugars and 0.25 mg/mL of GlcNAc (10.14% $Y_{GlcNAc/Chitin}$). The behavior until 72 h could be attributed to the depolymerization produced during sonication which provided substrate for Hex and the plausible explanation for the further decrease might be ascribed to transglycosylation activity, as reported elsewhere ([Chavan and Deshpande, 2013](#)). SE treated chitin/water ratio of 0.1 g/mL for 8 min presented its maximum at 144 h with reducing sugars and GlcNAc of 0.37 mg/mL and 0.59 mg/mL, respectively (23.6% $Y_{GlcNAc/Chitin}$). For SE treated chitin sample at 0.4 g/mL for 5 min, the production also reached the highest values at 144 h but relatively low reducing sugars (0.18 mg/mL) and GlcNAc (0.38 mg/mL, 15.1% $Y_{GlcNAc/Chitin}$). Our results are similar to those reported by [Fukamizu and Kramer \(1985\)](#) with 0.44 mg/mL of reducing sugars and maximum production at 7 h. These authors employed a mixture of chitinases purified from insect moulting fluid and reported that this mixture enhanced the production of oligosaccharides compared to Hex. The reducing sugar and GlcNAc production from enzymatic hydrolysis of chitosans was lower than those obtained from sonicated and SE chitins reaching maximum values after 96 and 120 h of reaction. Noteworthy, the hydrolysis by family 18 chitinases presented a substrate-assisted catalysis, thus the enzyme requires an acetylated unit. It has been shown that chitinases from *Serratia marcescens* can degrade chitosans with an acetylated fraction (F_A) as low as 0.13 ([Sorbotten et al., 2005](#)). In our study, the accessibility of chitosans as

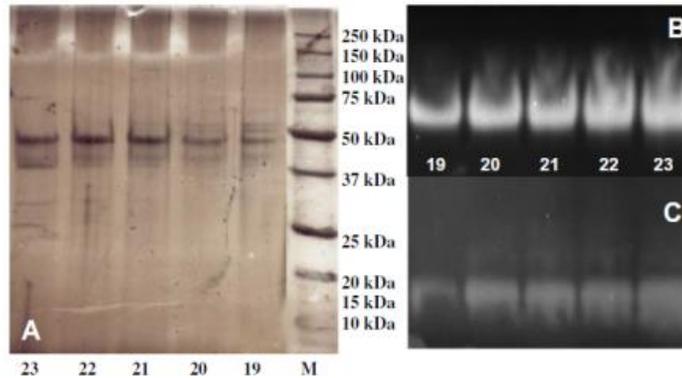


Fig. 1. SDS-PAGE of fractions obtained from SEC. (A) Zymograms of chitinolytic activity (fluorescent zones): Hex (B) and Chit (C).

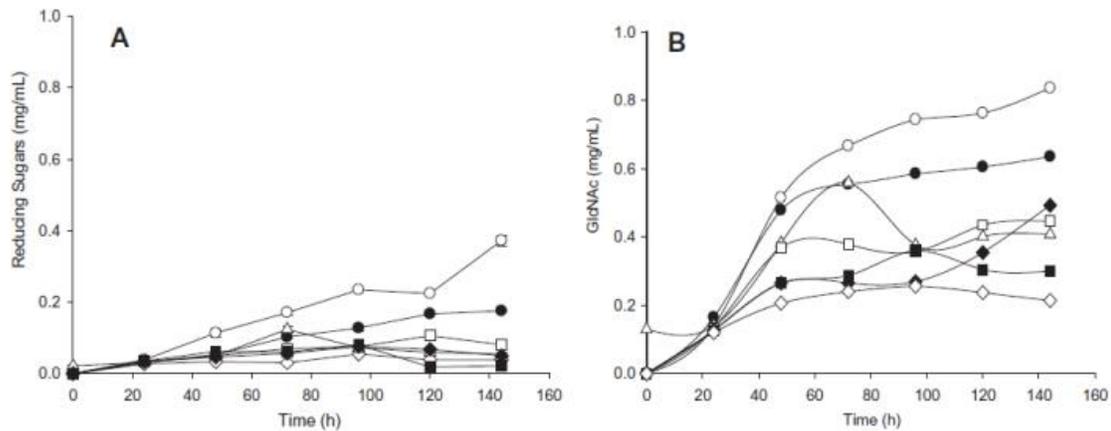


Fig. 2. Time course of enzymatic hydrolysis of chitins and chitosans by *L. lecanii* partially purified chitinases: (A) reducing sugars; (B) GlcNAc determined by HPLC. Substrates: native chitin purified from lactic acid fermentation (empty diamond), sonicated (triangle), SE 0.1 g/mL for 8 min at 180 °C (empty circle), SE 0.4 g/mL for 5 min at 180 °C (filled circle), chitosan DA 52 prepared by FPT (filled diamond), chitosan DA 23 prepared by FPT (empty square) and chitosan DA 4.86 prepared by FPT (filled square).

substrates improved the hydrolysis, reducing sugars and GlcNAc were progressively produced during 72 h of reaction with chitosans (DA of 4.86, 23 and 52) with higher amounts than that for chitin. However, after this time a steep decline in reducing sugars was observed for chitosan with low DA (4.86), this behavior might be due to the low availability of acetylated units (Fig. 2). Nevertheless, the highest amounts of reducing sugars (0.11 mg/mL) and GlcNAc (0.068 mg/mL, 2.72% $Y_{GlcNAc/Chitin}$) were determined with chitosan DA 23 (Fig. 2).

3.4. Determination of DP of chitin-oligomers by MALDI-TOF

The hydrolysis of SE and sonicated chitins gave oligosaccharides with DP of 2, 3, 4 and 5 and similar F_A in samples. However, the number of homologs (oligomers with same DP but different F_A) and intensities with SE were higher than that with sonicated substrates. The MALDI-TOF spectra of samples from the enzymatic hydrolysis of SE chitins corresponding to the highest concentration (144 h) and that for commercial sample of chito oligosaccharides are available for comparison in the [Supplementary data 6 and 7](#) in the online version of this article. The spectrometric studies pointed out the achievement of higher acetylated chitin

oligosaccharides (F_A 0.28) than commercial chitin oligosaccharides (F_A 0), which might be of interest in further biological activities.

4. Conclusions

The enzymatic hydrolysis of our biological chitin was remarkably enhanced by a pretreatment with SE which decreased the biopolymer crystallinity with low DA and the absence of depolymerization. Treatment with lowest ratio of chitin to water and longest residence times presented the highest reduction in DA and I_{CR} thus improving the enzymatic hydrolysis. The mixture of partially purified chitinases of *L. lecanii*, protease-free, proved successful for oligomerization of pretreated chitins to achieve chitin oligosaccharides with DP up to 5.

Acknowledgements

The authors thank CONACYT Mexico (Project Nos. 105628 & 165757) for research funding and scholarship (GVL). We thank Prof. Dr. Martin G. Peter (University of Postdam, Germany) for his invaluable comments on interpretation of MALDI-TOF spectra.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.003>.

References

- Ajavakom, A., Supesveston, S., Somboot, A., Sukuwattanasinit, M., 2012. Products from microwave and ultrasonic wave assisted acid hydrolysis of chitin. *Carbohydr. Polym.* 90, 73–77.
- Barreto-Cardoso, M., Signini, R., Campana-Filho, P., 2001. On the sonication of chitin: effects on its structure, morphology and influence on its deacetylation. *Polym. Bull.* 47, 183–190.
- Bidochka, M.J., Khachatourians, G.G., 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 64, 26–32.
- Liu, B.-L., Kao, P.-M., Tzeng, Y.-M., Feng, K.-C., 2003. Production of chitinases from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 410–415.
- Chavan, S.B., Deshpande, M.V., 2013. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnol. Prog.* <http://dx.doi.org/10.1021/btpr.1732>.
- Fenice, M., Barghini, P., Selbmann, L., Federici, F., 2012. Combined effects of agitation and aeration on the chitinolytic enzymes production by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. *Microb. Cell Fact.* 11, 1–6.
- Focher, B., Beltrame, P.L., Naggi, A., Torri, G., 1990. Alkaline deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. *Carbohydr. Polym.* 12, 405–418.
- Fukamizu, T., Kramer, K.J., 1985. Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinases system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.* 15, 1–7.
- Jang, M., Kong, B., Jeong, Y., Lee, C., Nah, J., 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin and γ -chitin separated from natural resources. *J. Polym. Sci.* 2004 (42), 3423–3432.
- Kuroiwa, T., Izuta, H., Nabetani, H., Nakajima, M., Sato, S., Mukataka, S., Ichikawa, S., 2009. Selective and stable production of physiologically active chitin oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor. *Process Biochem.* 44, 283–287.
- Li, J., Henriksson, G., Gellerstedt, G., 2007. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 98, 3061–3068.
- Marín-Cervantes, M., Matsumoto, Y., Ramírez-Coutiño, L., Rocha-Pino, Z., Viniestra, G., Shirai, K., 2008. Effect of moisture in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochem.* 43, 24–32.
- Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Gimeno, M., Bárzana, E., Trombotto, S., David, L., Shirai, K., 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules* 12, 3285–3290.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A., 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* 4, 12–18.
- Ramírez-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. *Bioresour. Technol.* 101, 9236–9240.
- Rocha-Pino, Z., Viguera, G., Shirai, K., 2011. Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34, 681–686.
- Sorbotten, A., Horn, S.J., Eijsink, V.G.H., Varum, K.M., 2005. Degradation of chitosans with chitinases B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS J.* 272, 538–549.
- Trudel, J., Asselin, A., 1989. Detection of chitinases activity after polyacrylamide gels electrophoresis. *Anal. Biochem.* 178, 362–366.

10 BIBLIOGRAFÍA.

1. Aalten D. M. F., Komander D., Synstad B., Gåseidnes S., Peter M. G., y Eijsink V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *PNAS*. 98:8979-8984.
2. Abd-Aziz S., Sin T., Alitheen N., Shahab N., Kamaruddin K. (2008) Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. 8:52-59.
3. Abdou E., Nagy K., Elsabee M., (2007). Extraction y characterization of chitin y chitosan from local sources. 99:1359-1367.
4. Adrangi S., Faramarzi M. (2013). From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances* 31:1786–1795
5. Ali F., Reinert L., Levêque J., Duclaux L., Muller F., Saeed S., Sakhawat S. (2014). Effect of sonication conditions: Solvent, time, temperature y reactor type on the preparation of micron sized vermiculite particles. *Ultrasonics Sonochemistry* 21: 1002–1009
6. Alvira P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., Negro M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review *Bioresource Technology*. 101:4851-4861.
7. Askary H, Benhamou N, Brodeur J. (1999). Ultrastructural y Cytochemical Characterization of Aphid Invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii* *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 1-13.
8. Bahrke S., Einarsson J. Gislason J., Haebel S., Letzel M., Peter-Katalinic J., Peter M. (2002). Sequence Analysis of Chitooligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Postsource Decay Mass Spectrometry *Biomacromolecules*. 3:696-704
9. Barghinia P., Moscatellia D, Vittoria Garzilloa A.M., Crognaleb S., Fenicea M. (2013). High production of cold-tolerant chitinases on shrimp wastes in bench-top bioreactor by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003:

- Bioprocess optimization y characterization of two main enzymes. *Enzyme y Microbial Technology* 53 : 331– 338
10. Barranco Florido E., Bustamante-Camilo P., Mayorga-Reyes L., González-Cervantes R., Martínez-Cruz P. y Azaola A. (2009). *Interciencia* vol. 34 No. 5
 11. Barreto C., Staats C., Schrank A., Vainstein M. (2004) Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* y Effect of N-Acetylglucosamine in Protein Secretion. *Current microbiology* .48 : 102-107
 12. Barreto-Cardoso, M.; Signini, R.; Campana-Filho, P. (2001). On the sonication of chitin: effects on its structure y morphology y influence on its deacetylation *Polymers Bulletin.*, 47, 183-190
 13. Beaney P., Lizardi-Mendoza J., Healy M. (2007). Modification of chitin properties for enzymatic deacetylation *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*. 80:145-150.
 14. Benhabiles M., Salah R., Lounici H., Drouiche M., Antibacterial activity of chitin, chitosan y its oligomers prepared from shrimp shell waste (2012) *Food Hydrocolloids*. 29:48-56.
 15. Bidochka, M.J., St.Leger, R.J., Stuart, A., y Gowanlock, K. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* y its relationship to insect y plant virulence, extracellular proteases y carbohydrases. *Microbiology*. 1999, 145: 955-963.
 16. Bing-Lan L., Pao-Min P., Yew-Min T. Kuo-Ching F. (2003). Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation *Enzyme y Microbial Technology*. 33:410-415.
 17. Binod P, Pusztahelyi T, Nagyc V, Sandhya C, Szakács G, Pócsi I, Pandey A. 2005. Production y purification of extracellular chitinase from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme y Microbial Technology*. 36: 880-887
 18. Binod P., Sandhya C., Suma P., Szakacs G., Pandey A. (2007). Fungal biosynthesis of endochitinase y chitobiase in solid state fermentation y their

- application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin Bioresource Technology. 98: 2742–2748.
19. Boone M., Olsthoorn M., Dakora F., Spaink H., Thomas-Oates J. (1999). Structural characterisation of lipo-chitin oligosaccharides isolated from *Bradyrhizobium aspalati*, microsymbionts of commercially important South African legumes. Carbohydrate Research 317: 155–163
 20. Calvosa F., Lagalante A. (2010). Supercritical fluid extraction of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from house dust with supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a). Talanta. 80:1116-1120.
 21. Carrasco U. (2011). Producción y purificación de β -N-acetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano. Tesis maestría en biotecnología.
 22. Cederkvist FH, Zamfir AD, Bahrke S, Eijsink VG, Sørlie M, Peter-Katalinić J, Peter MG. (2006). Identification of a high-affinity-binding oligosaccharide by (+) nanoelectrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry of a noncovalent enzyme-ligand complex. Angew Chem Int Ed Engl. 3:2429-2434.
 23. Cho K., Lee M., Park C. (1997). The effect of Freon vapour on fracture behavior of styrene-acrylonitrile copolymer-I. Craze initiation behavior. Polymer. 36: 1357-1361.
 24. Cho Y., Jang J., Rae-Park C., Ko S. (2000). Preparation y solubility in acid y water of partially deacetylated chitins Biomacromolecules. 1: 609-614.
 25. Cira L.A., Huerta S., Hall G. M., Shirai K. (2002) Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry. 37: 1359-1366.
 26. Coudron, T. A., Kroha, M. J., y Ignoffo, C. M. (1984). Comp. Biochem. Physiol. 79B, 339–348
 27. Dahiya N, Rupinder T, Singh-Hoondal G. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied Microbiology y Biotechnology. 71: 773-782.

28. Daimon T., Hamada K., Mita K., Okano K., Suzuki M., Kobayashi M., Shimada T. (2003). A Bombyx mori gene, BmChi-h, encodes a protein homologous to bacterial y baculovirus chitinases. *Insect Biochemistry y Molecular Biology* 33 : 749–759
29. De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego A., Lora, J.M., Benitez T., Pintor-Toro J.A., y Llobel A.. *European Journal Biochemistry*.1992, 206: 859-867.
30. Demir A., Aytar P., Gedikli S., Çabuk A., Arısoy M. (2011). Laccase Production with Submerged y Solid State Fermentation: Benefit y Cost Analysis. *J. Biol. & Chem.* 39 : 305–313
31. Duarte, M.L.; Ferreira, M.C.; Marva, M.R.; Rocha, J. *Int. J. Biol. Macromol.* 2002, 31, 1-8.
32. Duo-Chuan L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia.* 161: 345–360.
33. Einbu A., Varum K. (2007). Depolymerization y De-N-acetylation of Chitin Oligomers in Hydrochloric Acid. *Biomacromolecules*.8:309-314.
34. Einbu A., Varum K. (2008). Characterization of Chitin y Its Hydrolysis to GlcNAc y GlcN. *Biomacromolecules.* 9:1870-1875.
35. Fang Q. H, Zhong J. J. 2002. Effect of initial pH on production of ganoderic acid y polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry.* 37: 269-274.
36. Felse P, Panda T. 2000. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in sterred tank bioreactors-the influence of agitator speed. *Biochemical Engineering Journal.* 4: 115-120.
37. Fenghua Xu, Chengming Fan, Yueqiu He. (2007). Chitinases in *Oryza sativa* ssp. *japonica* y *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics y Genomics.* 34:138-150.
38. Fenice M., Selbmann L., Di Giambattista R., Petruccioli M., Federici F. (1996). *Chitin Enzymology* 2: 285-292.
39. Fenice M., Selbman L., Di Giambattista R., Federici F. *Research in Microbiology.* 1998.149:289-300.

40. Fenice M., Gooday G. (2006).. *Annals of Microbiology* 56:1-6
41. Fletcher D., Anderson R. (1990). A review of pressure-induced propagation models of the vapour explosion process. *Progress in nuclear energy*. 23: 137-179
42. Focher, B.; Beltrame, P.L.; Naggi, A.; Torri, G. *Carbohydr. Polym.* 1990, 12, 405-418.
43. Focher, D. *Carbohydr. Polym.* 1992.17,97-102
44. Fukamizu, T.; Kramer, K.J. *Insect Biochem.* 1985, 15, 1-7.
45. Fukamizo T., Ikeda Y., Ohkawa T., Goto S. (1992). ¹H-NMR study on the chitotrisaccharide binding to hen egg white lysozyme. 210:351-357.
46. Garisto-Donzelli B. G, Siebert K. J, Harman G. E. 2005. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic α y β -1-3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme y Microbial Technology*. 37: 82-92.
47. Ghanem K., Al-Garnis S., Al-Makisha M. (2010). Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*. 9: 5135-5146
48. Gao L., Liu X. (2010). Sporulation of Several Biocontrol Fungi as Affected by Carbon y Nitrogen Sources in a Two-Stage Cultivation System. *Journal of microbiology*. 48: 767-770.
49. Gilca A., Popa V, Crestini C. (2014) Obtaining lignin nanoparticles by sonication.
50. Giuliano B. y Harman G. (2001). *Applied y Environmental Microbiology*, p.5643-5647.
51. Gohel V., Chaudhary T., Vyas P., Chhatpar H.S. (2006). *Biochemical Engineering Journal* 28 :50–56.
52. Gómez Ramírez M1, Rojas Avelizapa LI, Rojas Avelizapa NG, Cruz Camarillo R.

- (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms y to evaluate chitinases. *J. Microbiol Methods*. 56:213-9.
53. Guzmán-Lagunes, López-Luna A., Gimeno M. Barzana E. (2012). Enzymatic synthesis of poli-L-lactide in supercritical R-134a. *Journal of supercritical fluids*. 72:186-190.
54. Hayes M, Carney B, Slater J, Brück W. (2008). Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin y chitosan--Part A: extraction methods. *Biotechnol J*. 3:871-7
55. Hebb A., Senoo K., Cooper A. (2003). Synthesis of porous cross-linked polymer monoliths using 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) as the porogen. *Composites Science y Technology* 63: 2379–2387.
56. Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A. *Polym. Bull*. 1991, 26, 87-94
57. Horn S., Eijsink V. (2004). A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 56:35–39
58. Howard M.B., Ekborg N.A., Weiner R.M., Hutcheson S.W. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 30: 627–635.
59. Ifuku S., Nogi M., Abe K., Yoshioka M., Morimoto M., Saimoto H., Yano H. (2009). Preparation of Chitin Nanofibers with a Uniform Width as α -Chitin from Crab Shells Biomacromolecules. 10:1584-1588.
60. Il'ina, A.V., Zueva, O.Y., Lopatin, S.A., y Varlamov, V.P. Enzymatic hydrolysis of α -chitin. *Applied Biochem. Microbiol*. 2004, 40(1):35-38.
61. Iwamoto S., Nakagaito A.N. Yano H. (2007). Nanofibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. *Appl. Phys A*. 89:461-466.
62. Jami A.K., Tabatabaei Y.M., Fathi M.N., Shahverdi A.R., Faramarzi M.A., Zarrini G., Behravan. 2008. Optimization of medium and cultivation for chitinases production by the newly isolated: *Aeromonas sp*. *Asian network for scientific information* 7:266-272.

63. Jang, M.; Kong, B.; Jeong, Y.; Lee, C.; Nah, J. Physicochemical Characterization of α -Chitin, β -Chitin and γ -Chitin Separated from Natural Resources. 2004, *Journal of Polymer Science* 42, 3423-3432
64. Jeon, YJ, y Kim, SK. 2000 Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system, *Process Biochemistry*. 35:623-632.
65. Kjartansson J., Zivanovic S., Kristbergsson K., Weiss J. (2006). Sonication-Assisted Extraction of Chitin from North Atlantic Shrimps (*Pandalus borealis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 5894-5902
66. Koga D., Yoshioka T., Arakane Y. 1998. HPLC Analysis of anomeric formation and cleavage pattern by chitinolytic enzyme. *Bioscience, Biotechnology y Biochemistry*. 62:1643-1646.
67. Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., Stepnowski P. (2010) Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin y Chitosan. *Marine Drugs* .8: 1567-1636
68. Kurita K, Tomita K, Tada T, Shigeru I, Nishimura SI, y Shimoda K. Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior y characteristic properties. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*1993, 31:485-491
69. Kurita K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* 2001, 26:1921-1971
70. Kunitz M. (1947) Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor *Journal of General Physiology*, 30: 291-310.
71. Lamarque, G.; Cretenet, M.; Viton, C.; Domard, A. 2005 New Route of Deacetylation of α - and β -Chitins by Means of Freeze-Pump Out-Thaw Cycles. *Biomacromolecules* 6, 1380-1388.
72. Li J., Henriksson G., Gellerstedt G. (2007). Lignin depolymerization/repolymerization y its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology*. 98: 3061–3068
73. Liu, BL., Kao, PM., Tzeng, YM., y Feng, KC. *Enzyme y Microbial Technology*. 2003, 33(4):410-415.

74. Lopatin, S.A., Ilyin, M., Pustobaev, V.N., Bezchetnikova, Z.A., Varlamov, V.P. y Davankov, V.A. Mass spectrometric analysis of N-acetylchitooligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis. *Anal. Biochem.* 1995, 227:285-288.
75. Lopes M., Santos-Gomes D., Bello-Koblitz M.G., Priminho-Pirovani C., De Mattos-Cascardo J.C., Góes-Neto A., Micheli F. (2008). Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* *Mycological research.* 112: 399-406
76. Mach R.L., Peterbauer C.K., Payer L.K., Jaksits S., Woo S., Zeilinger S., Kullnig C.M., Lorito M., Kubicek C.P.. 1999. Expression of Two Major Chitinase Genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) Is Triggered by Different Regulatory Signals. *Applied y environmental microbiology* 65: 1858–1863
77. Manhong S., XingZhong L. (2006). Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents *Mycopathologia* 161: 295–305
78. Marín-Cervantes M, Matsumoto Y, Ramírez-Coutiño L, Rocha-Pino Z, Viniegra G, Shirai K. (2008). Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases *Process Biochemistry.* 43: 24-32.
79. Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., y Shirai, K. 2004, Production of -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer *Process Biochemistry.* 39(6):665-671.
80. Mislovicoca D., Masarova J., Bedzalova K., Soltes L., Machova E. (2000) Sonication of chitin–glucan, preparation of water-soluble fractions and characterization by HPLC *Ultrasonics Sonochemistry.* 7:63-68.
81. Moniruzzaman M., (1995). Saccharification y alcohol fermentation of steam exploded rice straw. *Bioresource technology.* 55:111-117.

82. Mustapa A.N., Manan Z.A., Mohd Azizi C.Y., Nik Norulaini N.A., Mohd A.K. (2009). Effects of parameters on yield for sub-critical R134a extraction of palm oil. *Journal of Food Engineering* 95: 606–616
83. Muzarelli R., Rochetti R. (1985) Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 5:461-472.
84. Nakagawaa Y., Oyamaa Y., Kona N., Nikaidoa M., Tannoa K., Kogawab J., Inomatab S., Masuic A., Yamamurac A., Kawaguchic M., Matahirac Y., Totani K. (2011). Development of innovative technologies to decrease the environmental burdens associated with using chitin as a biomass resource: Mechanochemical grinding y enzymatic degradation. *Carbohydrate Polymers* 83 :1843–1849.
85. Nakagawa Y., Eijsink V., Totani K., Vaaje-Kolstad G. (2013). Conversion of α -Chitin Substrates with Varying Particle Size y Crystallinity Reveals Substrate Preferences of the Chitinases y Lytic Polysaccharide Monooxygenase of *Serratia marcescens*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 61: 11061–11066.
86. Narayana K., Vijayalakshmi M. (2009). Chitinase production by *Streptomyces* sp. Anu 6277. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40: 725-733
87. Ngo, D.N.; Lee, S.H.; Kim, M.M.; Kim, S.K. 2009. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells *Journal of Functional Foods*. 1, 188–198.
88. Ogawa M, Kitagawa M, Tanaka H, Ueda K, Watsuji T, Beppuc T, Kondo A, Kawachi R, Oku T, Nishio T. 2006. A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum*; gene cloning, overexpression, purification y characterization. *Enzyme y Microbial technology*. 38: 457-464.
89. Pacheco, N.; Garnica-Gonzalez, M.; Gimeno, M.; Bárzana, E.; Trombotto, S.; David, L.; Shirai, K. 2011. Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods *Biomacromolecules*. 12, 3285-3290.

90. Patil R, Ghormade V, Deshpande M. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme y Microbial Technology*. 26: 473-483.
91. Pegg, GF. Chitinase from *Verticillium albo-atrum*. *Methods in enzymology*. 161. Academic Press. N.Y. 1988, pp. 474-479.
92. Peñalva, M.A., y Arst, H.N.Jr. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi y yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2002, 66:426-446.
93. Peter, M. G. & Eberlin, M. N. (2010). Applications of mass spectrometry to analysis of structure y bioactivity of chitooligosaccharides. In Kim, S. K. (ed.), *Chitin, Chitosan, oligosaccharides y their derivatives*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 127-148.
94. Qiu, W.; Chen, H. 2012. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse *Bioresource.Technology* 118, 8-12.
95. Quijano-Govantes, G., Ramírez-Coutiño, L., Paniagua, N., Larralde-Corona, P., Shirai, K. (2004). Evaluation of pH of culture on the chitinolytic and proteolytic activities of *Verticillium fungicola* using shrimp waste silage *Advances in Chitin Science*, 8:222- 225.
96. Qin, C.Q., Du, Y.M., y Xiao, L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight y structure of chitosan. *Polym.Degrad.Stabil.* 2002, 76:211-218.
97. Ramirez- Coutiño L., Marín-Cervantes M., Huerta S., Revah S., Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases *Process Biochemistry* 41:1106-1110.
98. 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.
99. Rocha-Pino Z., Viguera, G.; Shirai, K. 2011. Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii* *Bioprocess y Biosystems Engineering* 34, 681-686.

100. Rubin, B.R.; Talent, J.M.; Kongtawelert, P.; Pertusi, R.M.; Forman, M.D.; Gracy, R.W. 2001. Oral polymeric N-acetyl-D-glucosamine and osteoarthritis Journal of American Osteopathic Association. 101, 339-344.
101. Ruiz E., Cara C., Manzanares P., Ballesteros M., Castro E. (2008) Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. Enzyme y Microbial Technology 42: 160–166
102. Rumengan I., Suryanto E., Modaso R., Wullur S., Tallei T. (2014). Structural Characteristics of Chitin y Chitosan Isolated from the Biomass of Cultivated Rotifer, *Brachionus rotundiformis*. International Journal of Fisheries y Aquatic Sciences 3(1): 12-18.
103. Salaberria M., Fernandes S., Herrera R., Labidi J. (2014). Processing of α -chitin nanofibers by dynamic high pressurehomogenization: Characterization y antifungal activityagainst *A. niger*. Carbohydrate Polymers.
104. Sashiwaa H., Fujishimaa S., Yamanoa N., Kawasakia N., Nakayamaa A., Murakia E., Sukwattanasinittb M., Pichyangkurac R., Aibaa S. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. (2003). Degradation study of N-acetylchitooligosaccharide y the effect of mixing of crude enzymes. Carbohydrate Polymers. 51: 391–395
105. Slámová K, Bojarová P, Petrásková B, Křen V. 2010. β -N-acetylhexosaminidase: What's in a name...?. Biotechnology Advances. 28: 682-693.
106. Souza D, Grossi-de-Sa M, Silva L, Franco O, Gomes-Junior J, Oliveira G, Rocha T, Malgalhã C, Marra B, Grosi-de-Sa M, Romano E, Martins de Sá C, Kombrink E, Jiménez A, Abreu L. 2008. Identification of a novel β -N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea). Protein Expression y Purification. 58: 61-69.
107. Sastoque C.L., Mercado R.M., Martinez S.M.M., Quevedo H.B., Pedroza R.A.M. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica. 2007. 6: 137-146.

108. Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*. 22: 36-42
109. Shirai K. (2006). Fungal chitinases. Guevara-González RG, Torres-Pacheco I (editores). *Advances in Agricultural y Food Biotechnology*. Kerala: Research Signpost. 289-304.
110. Sorbotten, A.; Horn, S. J.; Eijsink, V.G.H.; Varum, K.M. *FEBS J*. 2005, 272, 538-549.
111. St. Leger R., Joshi L., Bidochka M., Rizzo N.W., Roberts D.W..1996. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Aplied And Environmental Microbiology* 62: 907–912
112. St. Leger R.J., Joshi L., Roberts D. (1998). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity *Applied y environmental microbiology*. 64: 709-713.
113. Sun S., Wen J., Ma M., Sun R. (2014). Enhanced enzymatic digestibility of bamboo by a combined system of multiple steam explosion y alkaline treatments. *Applied Energy* 136: 519–526
114. Suzuki K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaiudo N., Watanabe T. (2002). Chitinases A, B y C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *E. coli*: Enzymatic propertis ans synergism on chitin degradation. *Biosci. Biotech Biochem*. 66:1075-1083.
115. St. Leger, R., Joshi, L., y Roberts, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes y hydrophobin by *Metarrhizium anisopliae*. *Applied Environmental Microbiology*.1998, 64(2):709-713.

116. Taghizadeh S.M., Davari G. (2006). Preparation, characterization, y swelling behavior of N-acetylated y deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymers* 64:9–15.
117. Taylor G, Jabaji-hare S, Charest P. M, Wajahatullah K. 2002. Purification y characterization of an extracellular exochitinase, β -N-62 acetylhexosaminidase, from the fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans*. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 311-319.
118. Tikhonov V., López-Llorca L., Salinas J., Hanss-Borje J. 2002. *Fungal Genetics y Biology*. 35:6778.
119. Tommeras , K., Vårum, K.M., Christensen, B.E., y Smidsrød, O. Preparation y characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohyd. Research*. 2001, 333:137-144.
120. Tronsmo A., Hjeljord L., Klemsdal S. S., Varum K. M., Nordtveit H. R., & Harman G. E. (1996). *Chitin Enzymology*, 2:235-244.
121. Varum, K. M., M. W. Anthonsen, H. Grasdalen, y O. Smidsrød. 1991a. Determination of degree of N-acetylation y the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high field NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 211: 17–23
122. Vasnev V.A., Tarasov A.E., Markova G.D., Vinogradova S.V. Garkusha O.G. 2006. Synthesis and properties of acylated chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 64:184-189.
123. Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A. (2002). Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203) *Curr Genetics*.;42:114-22.
124. Wang S., Chena S., Wang C. (2008). Purification y characterization of chitinases y chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydrate Research* 343:1171–1179
125. Wang K., Jiang J., Xu F., Sun R. (2009). Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza*

- cryptobotrya): Part1. Characteristics of degraded cellulose. *Polymer Degradation y Stability* 94 :1379–1388
126. Zhang Y., Xue C., Li Z., Zhang Y., Fu X. (2006). Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration y its properties. *Carbohydrate Polymers* 65:229–234.
127. Zhen L., Laroche A., Huang H. (2005). Isolation y characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*. *Canadian Journal of microbiology*. 51:1045-1055.

11 ANEXOS

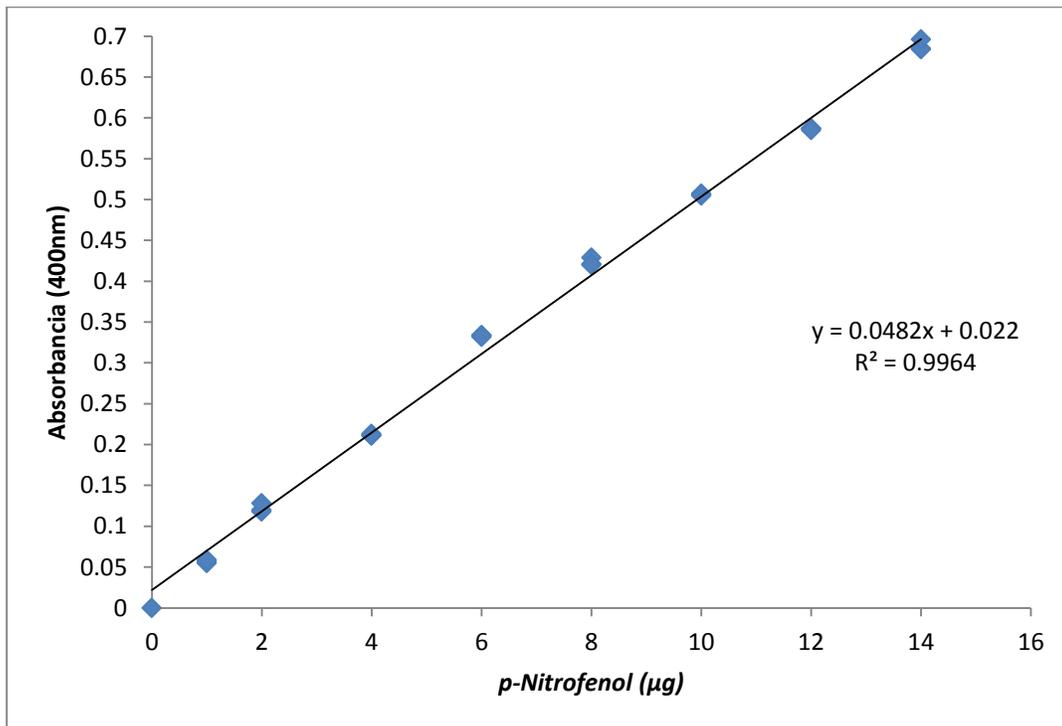
ANEXO 1. CURVA DE *p* NITROFENOL PARA DETERMINACIÓN DE NHASA

Figura 36. Curva patrón de *p*-nitrofenol para la determinación de Nhasas (Tronsmo y Harman, 1993).

ANEXO 2. METODOLOGÍA PARA LOWRY PETERSON Y CURVA PATRÓN DE SEROALVUMINA

Reactivo A

- A) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio: Se disolvieron 25g de carbonato de sodio, 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada.
- B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): 25g de SDS fueron disueltos en 250 ml de agua destilada.
- C) Solución de hidróxido de sodio: Se disolvieron 8g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

Se mezclan las soluciones A, B y C aforándose con agua destilada a 1L.

Reactivo B

Se diluyeron 1:1 el reactivo fenol Folin-Ciocalteu con agua destilada, este debe prepararse en el momento del análisis y conservarse fuera del alcance de la luz.

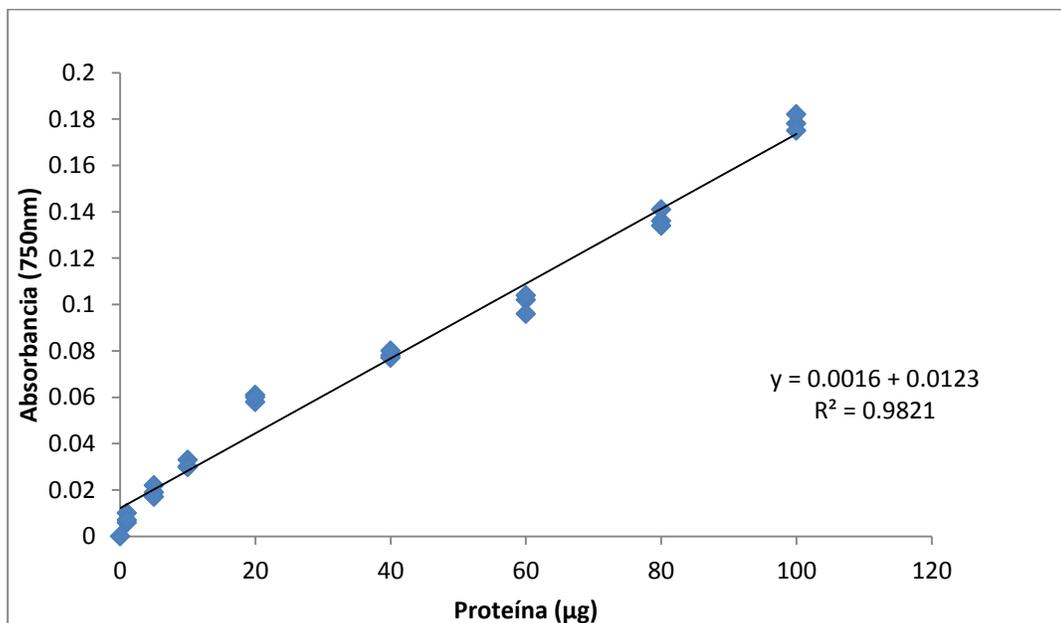


Figura 37. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry-Peterson (Peterson, 1977)

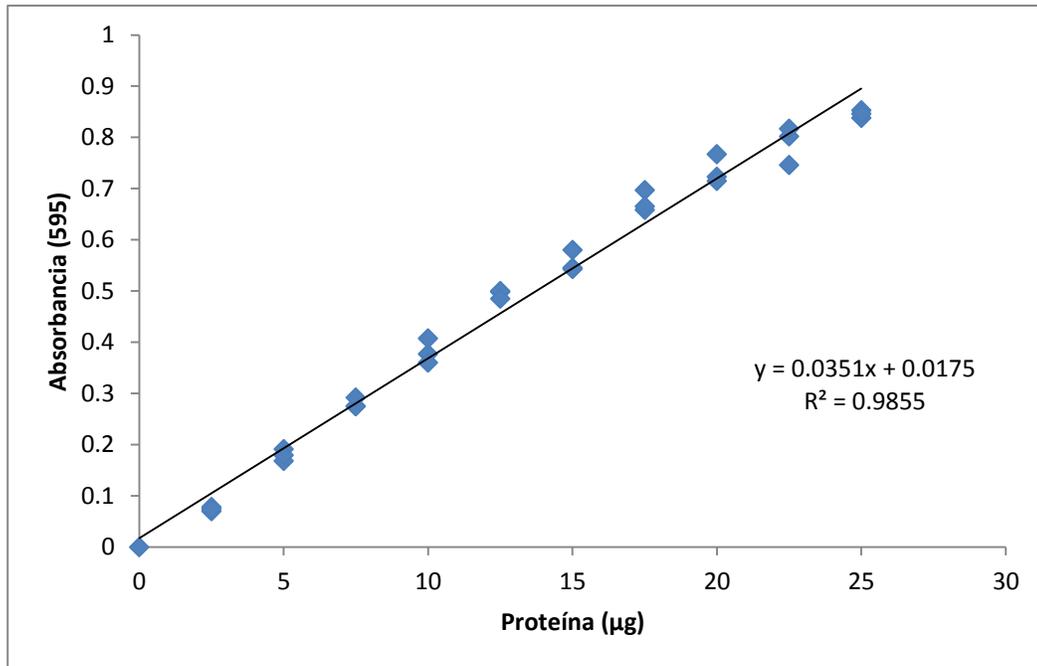
ANEXO 3. CURVA PATRÓN PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR BRADFORD

Figura 38. Curva Patrón para la determinación de proteína por Bradford microensayo (Bradford, 1976).

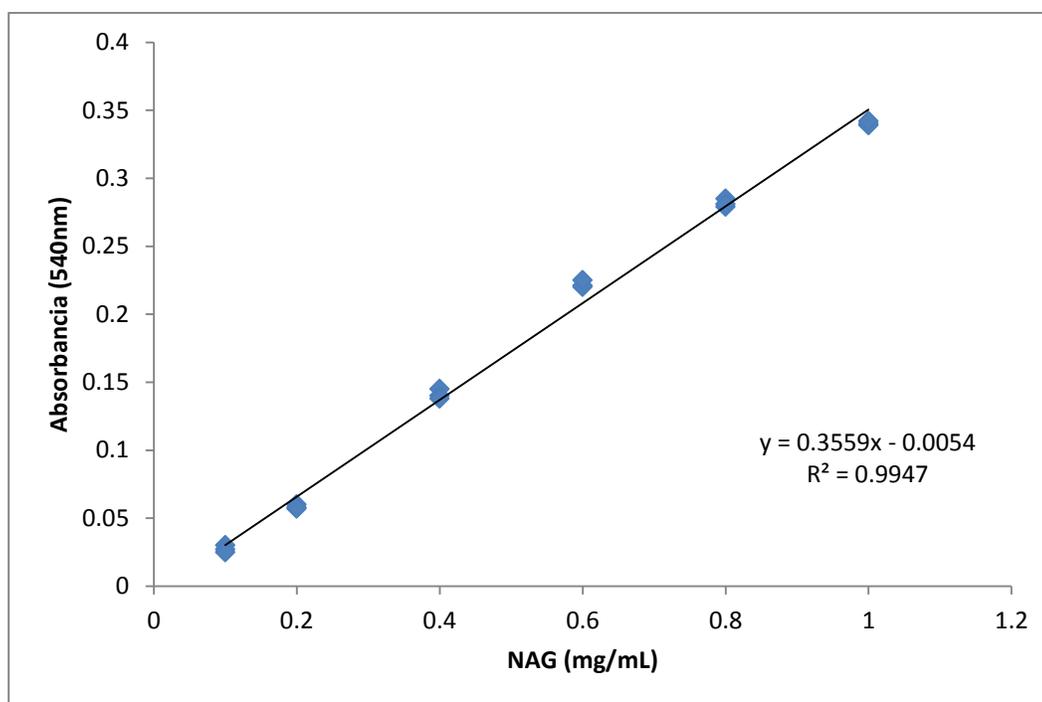
ANEXO 4. CURVA PATRÓN DE GlcNAc PARA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Figura 39. Curva patrón para la determinación de azúcares reductores (Miller, 1959).

**ANEXO 5. BASE DE DATOS PARA IDENTIFICACIÓN POR MALDI-TOF DE COS OBTENIDOS
ENZIMÁTICAMENTE**

Incrementos:					
Na:	22.9898	GlcN:	161.0688	H ₂ O	18.01056471
Ac:	42.0106	GlcNAc:	203.0794		
K:	39.0983	K-Na:	16.1085		

Oligomer	M	M+Na	plus 1 Ac	plus 2 Ac	plus 3 Ac	plus 4 Ac	plus 5 Ac	plus 6 Ac	plus 7 Ac	plus 8 Ac	plus 9 Ac	plus 10 Ac
GlcN	179.08	202.0698	244.0804									
GlcN2	340.15	363.1398	405.1504	447.161								
GlcN3	501.22	524.2098	566.2204	608.231	650.2416							
GlcN4	662.28	685.2698	727.2804	769.291	811.3016	853.3122						
GlcN5	823.35	846.3398	888.3504	930.361	972.3716	1014.3822	1056.3928					
GlcN6	984.42	1007.4098	1049.4204	1091.431	1133.4416	1175.4522	1217.4628	1259.4734				
GlcN7	1145.49	1168.4798	1210.4904	1252.501	1294.5116	1336.5222	1378.5328	1420.5434	1462.554			
GlcN8	1306.56	1329.5498	1371.5604	1413.571	1455.5816	1497.5922	1539.6028	1581.6134	1623.624	1665.6346		
GlcN9	1467.64	1490.6298	1532.6404	1574.651	1616.6616	1658.6722	1700.6828	1742.6934	1784.704	1826.7146	1868.7252	
GlcN10	1628.69	1651.6798	1693.6904	1735.701	1777.7116	1819.7222	1861.7328	1903.7434	1945.754	1987.7646	2029.7752	2071.7858

ANEXO 6. BASE DE DATOS PARA IDENTIFICACIÓN POR MALDI-TOF DE COS OBTENIDOS QUIMICAMENTE POR ACETOLISIS

Incrementos:					
Na:	22.9898	GlcN:	161.0688	H ₂ O	18.01056471
Ac:	42.0106	GlcNAc:	219.0794	AcO	58.0106
K:	39.0983	K-Na:	16.1085		

Oligomer	M	M+Na	plus 1 Ac	plus 2 Ac	plus 3 Ac	plus 4 Ac	plus 5 Ac	plus 6 Ac	plus 7 Ac	plus 8 Ac	plus 9 Ac	plus 10 Ac
GlcN	179.08	202.0698	260.0804									
GlcN2	340.15	363.1398	421.1504	479.161								
GlcN3	501.22	524.2098	582.2204	640.231	698.2416							
GlcN4	662.28	685.2698	743.2804	801.291	859.3016	917.3122						
GlcN5	823.35	846.3398	904.3504	962.361	1020.3716	1078.3822	1136.3928					
GlcN6	984.42	1007.4098	1065.4204	1123.431	1181.4416	1239.4522	1297.4628	1355.4734				
GlcN7	1145.49	1168.4798	1226.4904	1284.501	1342.5116	1400.5222	1458.5328	1516.5434	1574.554			
GlcN8	1306.56	1329.5498	1387.5604	1445.571	1503.5816	1561.5922	1619.6028	1677.6134	1735.624	1793.6346		
GlcN9	1467.64	1490.6298	1548.6404	1606.651	1664.6616	1722.6722	1780.6828	1838.6934	1896.704	1954.7146	2012.7252	
GlcN10	1628.69	1651.6798	1709.6904	1767.701	1825.7116	1883.7222	1941.7328	1999.7434	2057.754	2115.7646	2173.7752	2231.7858

ANEXO 7. ESPECTROS DE H-RMN DE MUESTRAS DE CP Y QUITINAS PRETRATADAS

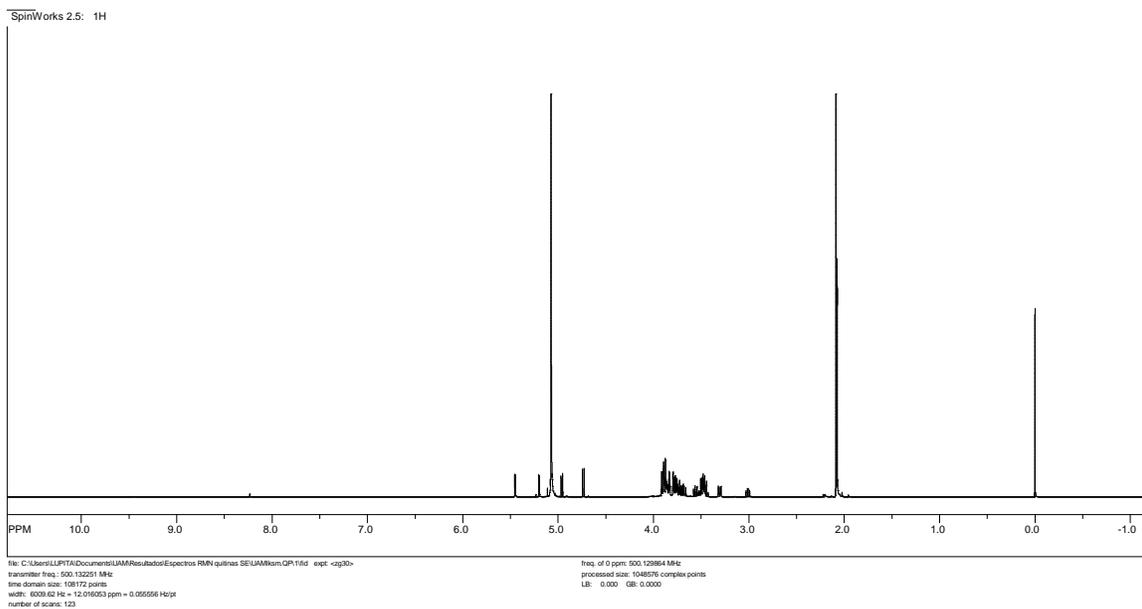


Figura 40. Espectro H-RMN de CP

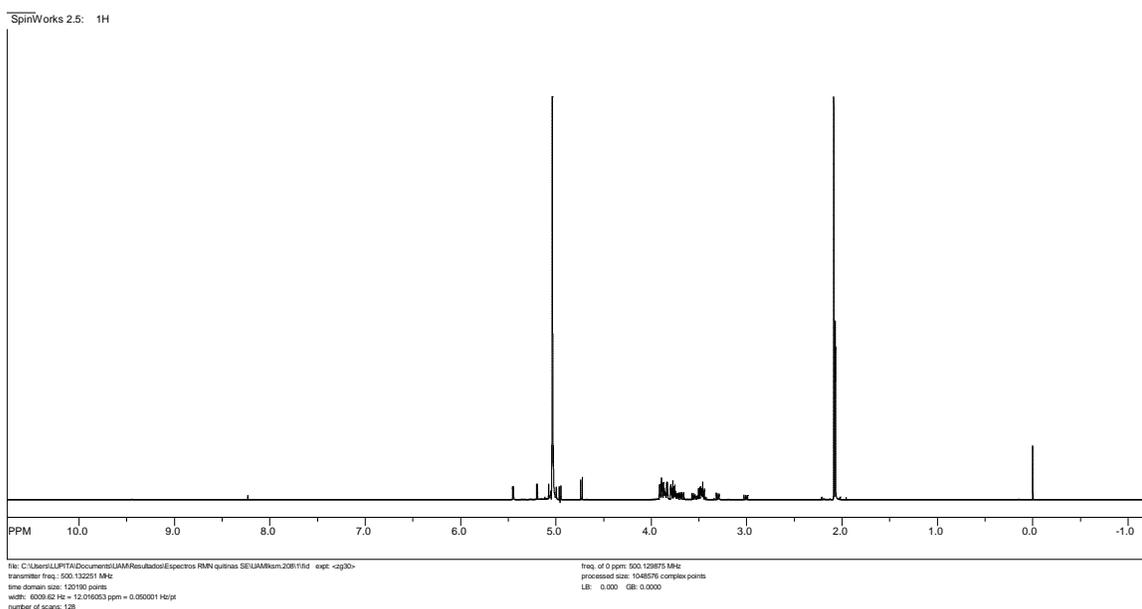


Figura 41. Espectro H-RMN de quitina SE 0.1 g/mL 8min

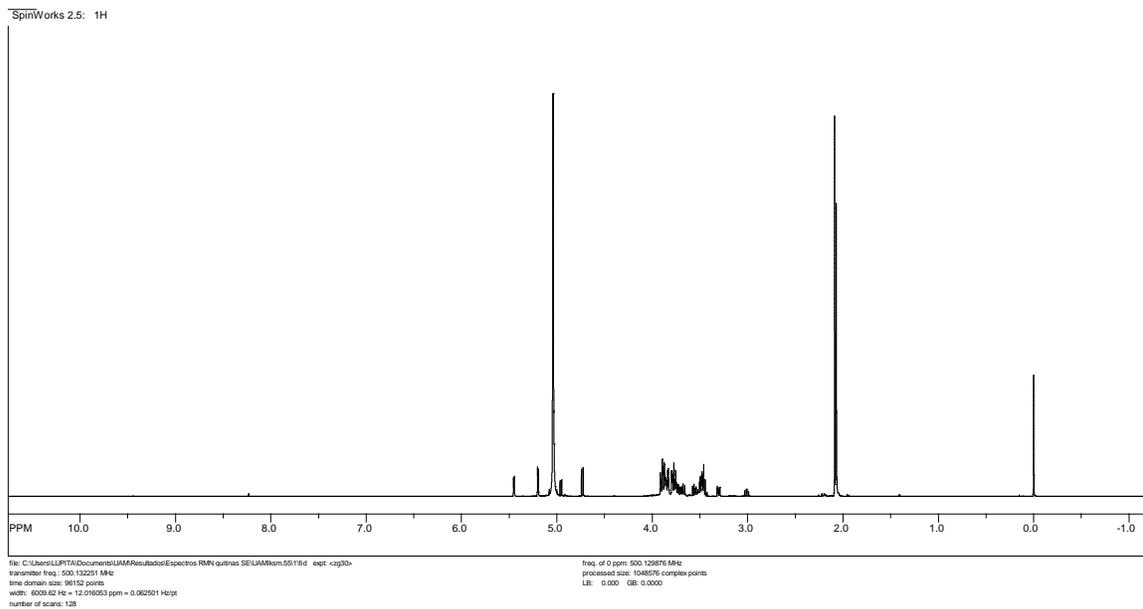


Figura 42. Espectro H-RMN de quitina SE 0.4 g/mL 5min

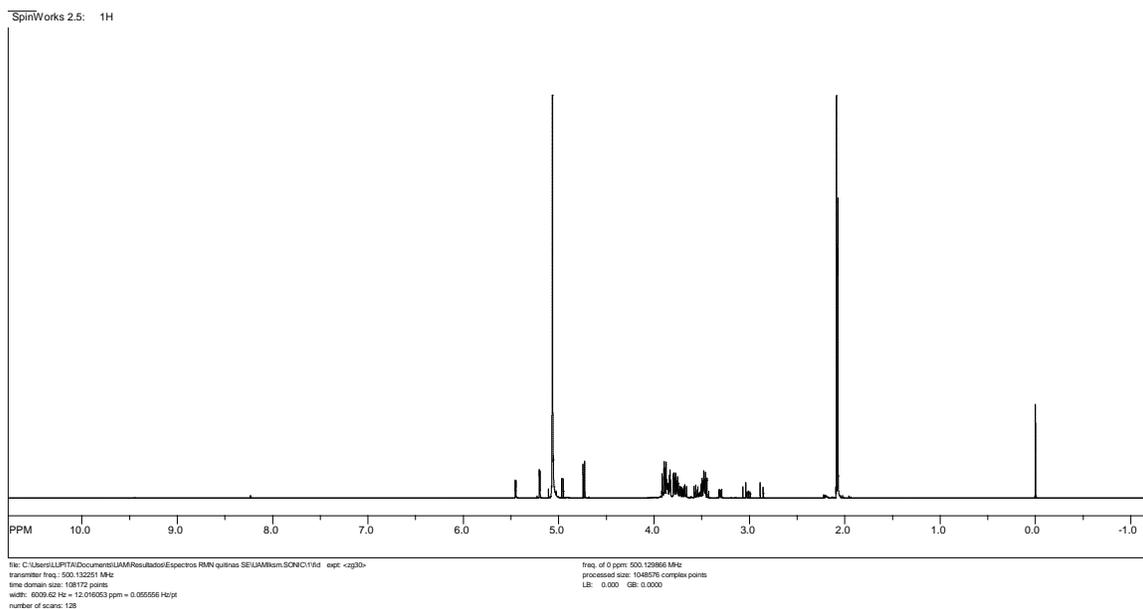
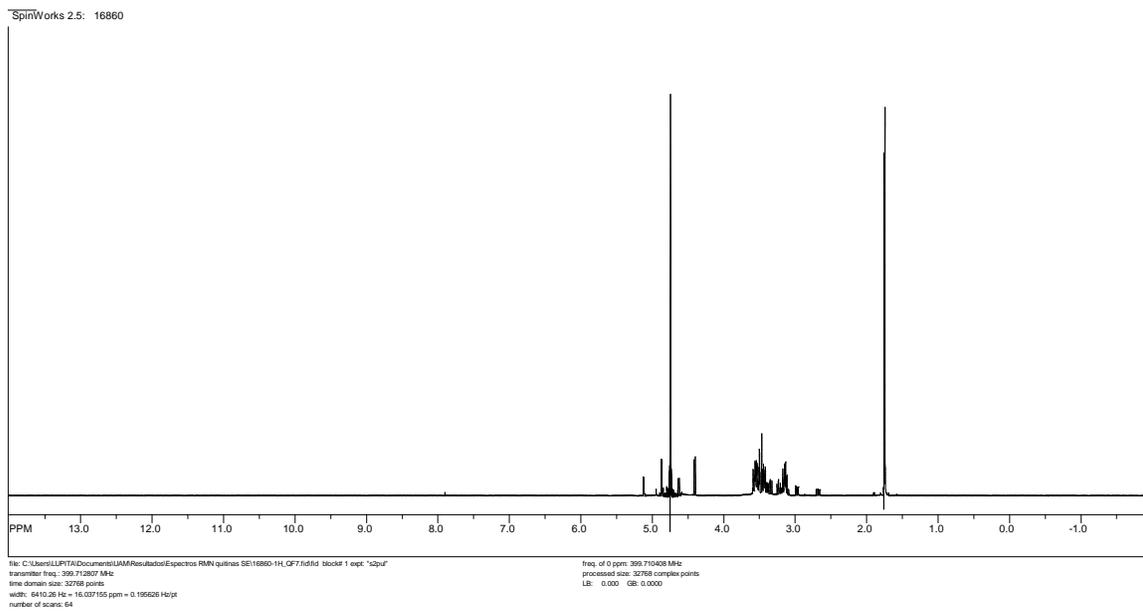
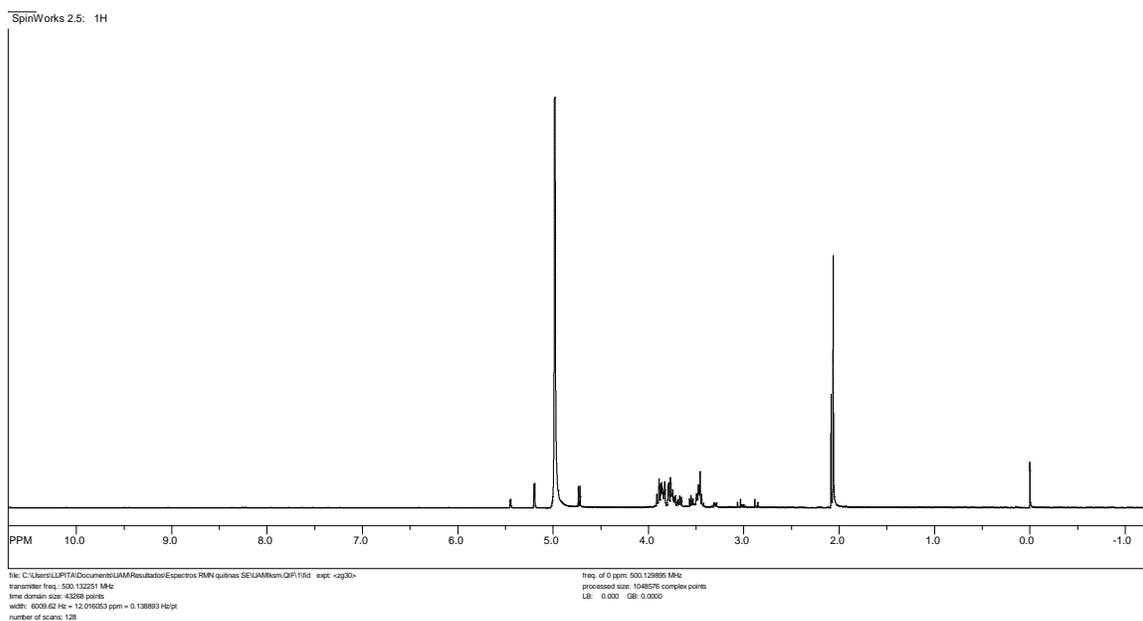


Figura 43. Espectro H-RMN de quitina ultrasonificada

**Figura 44. Espectro H-RMN de CF7****Figura 45. Espectro H-RMN de CFN**