

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

Estudio del efecto de la adición de inductores  
sobre la producción de quitina desacetilasas de  
hongos fitopatógenos.

**T E S I S**

**para obtener el grado de**

**Maestra en Biotecnología**

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

**I.B.I. Diana Carolina De Santiago Uribe**

**Directora de Tesis:**

**Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto**

5 de septiembre 2011

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACYT No. 105628.

Iztapalapa, D.F. a 5 de septiembre de 2011.

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

Estudio del efecto de la adición de inductores sobre la producción de quitina  
desacetilasas de hongos fitopatógenos.

que presentó

I.B.I. Diana Carolina De Santiago Uribe

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

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

Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Departamento de Biotecnología

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Vocal: Dra. Neith Pacheco López

Vocal: Dr. Alberto López Luna

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Keiko Shirai por darme la oportunidad de desarrollarme y trabajar en equipo, por aceptarme para realizar esta maestría bajo su dirección, por los conocimientos transmitidos, la guía y el apoyo.

A los Doctores Patricia Larralde, Sergio Huerta y Alberto López por sus comentarios, consejos y sugerencias durante el desarrollo del trabajo experimental y para la escritura de ésta tesis.

Al Dr. Sepúlveda y al Dr. Atilano que muy amablemente me ayudaron con el procesamiento de micrografías y muestras.

A la Dra. Neith Pacheco por su disponibilidad y apoyo, por sus consejos y comentarios siempre honestos, por todos los conocimientos transmitidos, por las noches que me dio un “aventón” y por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros Betsaida, Carmen, Fabiola, Lupita, Zaizy, Ariana, Facundo, Andrés, Alfonso, Jonathan porque gracias a ustedes el trabajo en el laboratorio fue muy agradable, por sus comentarios, consejos y conocimientos transmitidos, agradezco de manera especial a Ulises por todas esas veces que dejo de hacer algo para ayudarme o explicarme algo.

A mis padres Leticia y Ezequiel agradezco enormemente estar siempre a mi lado, su apoyo, confianza y amor. Porque con su gran ejemplo de trabajo y honestidad me hacen sentir orgullosa y me ayudan a ser una mejor persona. Por impulsarme siempre, los amo.

A mi hermanita Paty por todo lo compartido, por confiar en mí y por el gran cariño que nos tenemos. Te quiero mucho.

A Angie, Ta, Neto, Barbará, Marlen, Isaura e Irais por los momentos tan agradables que hemos compartido y por darme su amistad aún estando tan lejos, los quiero mucho.

A Aide Espitia por escucharme, aconsejarme, ser siempre honesta, por las palabras de aliento y el apoyo incondicional, porque aunque estamos lejos siempre has estado cerca. Por tu valiosa amistad, te quiero.

A Eduardo por ser un hombre tan especial y admirable, por tu constante apoyo, tu confianza en mí, por la decisión de construir juntos, por compartir tu vida conmigo, por darme tu amor y ser mi complemento. Te amo.

## RESUMEN

En este trabajo se seleccionaron hongos fitopatógenos que presentaran actividad quitina desacetilasa (CDA) en cultivo en medio líquido. Una vez elegida la cepa, *Colletotrichum gloeosporioides*, se procedió a determinar las actividades CDA en cultivo en medio sólido evaluando el efecto de la relación C/N del medio sobre la producción de CDAs del hongo, obteniéndose los mejores resultados con C/N 13.8.

Posteriormente, se estudió el efecto de la adición de quitosano (36% acetilado), glucosamina, N-acetil glucosamina, ácido giberélico, ácido indol acético y ácido abscísico al medio de cultivo, así como la presencia de hoja de limón en el sistema de cultivo y se obtuvo que todas presentaron un efecto inductor de actividad CDA en al menos un tiempo de la cinética, las cinéticas de actividad CDA en conjunto con lo reportado en la literatura proporcionaron la posibilidad de reducir el tiempo de cultivo a 72h, a este tiempo los mejores inductores fueron las fitohormonas ácido giberélico y ácido abscísico a concentraciones de 2.3 y 23 mg/L. En zimogramas se observaron dos bandas de proteínas con actividad CDA en el extracto crudo enzimático obtenido de cultivos inducidos con ácido giberélico y ácido abscísico.

Se obtuvieron micrografías de microscopía electrónica de barrido de las heridas de la hoja de limón invadidas por el hongo, así como de secciones de crecimiento del hongo sobre agrolita y hoja de limón, en donde se observó que el hongo fue capaz de invadir la hoja sin heridas en condiciones de alta humedad ( $79.9 \pm 3.37\%$ ) y se observaron estructuras especializadas de infección a 72h de cultivo.

## ABSTRACT

In the present study phytopathogenic fungi cultured in liquid medium were selected based on their chitin deacetylase (CDA) activities. *Colletotrichum gloeosporioides* was selected and employed for further work in solid state culture. The effect of C/N ratio of the media on the production of CDAs of the fungus was evaluated. The highest activities were determined with C/N ratio of 13.8.

Subsequently, the effect of the addition of chitosan (36% Degree of acetylation), glucosamine, N-acetyl glucosamine, gibberelic acid, indol acetic acid and abscisic acid to the culture media, as well as the presence of lemon leaf in the culture system. It was found that all compounds including lemon leaf presented CDA activity-inducing effect. The kinetics of CDA activity along with those reported in the literature provided the possibility to reduce the time of culture to 72h. The best inducers were the phytohormones gibberelic acid and abscisic acid at concentrations of 2.3 and 23 mg/L at this time. Two bands with CDA activity in the crude extract enzymatic obtained from induced cultures with gibberelic acid and abscisic acid were observed in zymograms.

Scanning electron micrographs of the wounds of lemon leaf invaded by the fungus, as well as sections of fungal growth on agrolite and lemon leaf were carried out. Fungi were able to grow into the leaf without injured in high humidity conditions ( $79.9 \pm 3.37\%$ ) and specialized infection structures were observed at 72h of culture.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolo	Definición
ABA	Ácido Abscísico
AIM	Materia insoluble alcalina
C	Celulosa microcristalina
C/N	Relación Carbono-Nitrógeno del medio
CDA	Por sus siglas en inglés quitina desacetilasa
DNS	Ácido 3, 5-dinitrosalicílico
EGC	Por sus siglas en inglés etilen glicol quitina
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
Glc	Glucosamina
H-RMN	Por sus siglas en inglés resonancia magnética nuclear de protón
IAA	Ácido Indol Acético
JA	Ácido Jasmónico
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
L	Laminarina
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona
NAcGlc	N-Acetil Glucosamina

P	Pectina
PDA	Agar papa dextrosa
PL	Extracto de semillas de <i>Lycopersicum esculentum</i>
Q	Quitina de camarón
Q36%DA	Quitosano 36% desacetilado
SEM	Por sus siglas en inglés microscopía electrónica de barrido
SSI	Sustrato sólido inicial
X	Xilano



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Quitina .....	1
1.2. Quitosano .....	2
1.3. Quitina desacetilasa (CDA).....	5
1.4. Fitopatogénesis .....	9
1.5. Respuesta de la planta al daño mecánico.....	11
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Hongos productores de quitina desacetilasas.....	14
2.2. Inductores de la actividad quitina desacetilasa .....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. OBJETIVOS .....	23
4.1. Objetivo General:.....	23
4.2. Objetivos Particulares: .....	23
5. HIPÓTESIS.....	24
6. METODOLOGÍA .....	24
6.1. Preparación de inóculos .....	24
6.2. Suspensión de esporas .....	24
6.3. Selección de hongos productores de quitina desacetilasa .....	24
6.4. Determinación de actividad quitina desacetilasa.....	24
6.5. Detección de ácido liberado al medio .....	25
6.6. Determinación de proteína.....	25
6.6.1. Microensayo de Bradford .....	26
6.6.2. Lowry-Peterson .....	26
6.7. Determinación de azúcares reductores.....	26
6.8. Determinación de Biomasa .....	26
6.9. Cultivo en medio sólido.....	27
6.10. Establecimiento de la relación C/N.....	27
6.11. Efecto de inductores de quitina desacetilasas .....	28

6.12.	Procesamiento de muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	29
6.13.	Obtención del extracto crudo enzimático.....	29
6.14.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	30
6.15.	Zimogramas de actividad quitina desacetilasa .....	30
6.16.	Extracción de quitosano de biomasa fúngica en cultivos en medio sólido .....	30
6.17.	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con sistema de Refractancia total atenuada (ATR-FTIR) .....	31
6.18.	Resonancia magnética nuclear <sup>1</sup> H y <sup>27</sup> Al (RMN).....	31
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
7.1.	Selección del hongo productor de quitina desacetilasas .....	32
7.2.	Efecto de la relación C/N en el crecimiento y producción enzimática.....	43
7.3.	Efecto de inductores .....	48
7.4.	Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> en hoja de limón ( <i>Citrus limon</i> ) .....	56
7.5.	Microscopía Óptica y Electrónica .....	57
7.6.	Efecto de la concentración de inductores.....	61
7.6.1.	Actividad CDA de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con condiciones de inducción seleccionadas.....	66
7.7.	SDS-PAGE y Zimogramas de Actividad CDA .....	68
7.8.	Quitosano de biomasa fúngica.....	73
8.	CONCLUSIONES .....	85
9.	PERSPECTIVAS .....	86
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	87
	ANEXO I. CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	96
	ANEXO II. PREPARACIÓN DE REACTIVOS. ....	101
	ANEXO III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	102
	ANEXO IV. ESPECTROS.....	109
	TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESO.....	110

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Reacción catalizada por quitina desacetilasa (Tsigos y col., 2000).....	5
<b>Figura 2.</b>	Estructura de la quitina desacetilasa del hongo fitopatogéno <i>C. lindemuthianum</i> (Base de datos Carbohydrate Active Enzymes) .....	6
<b>Figura 3.</b>	Acción catalítica de la enzima quitina desacetilasa (Martinou y col., 2001).....	7
<b>Figura 4.</b>	Estructuras de infección y producción de enzimas degradadoras de pared celular vegetal (Mendgen y col., 1996).....	10
<b>Figura 5.</b>	Sistema experimental utilizado: caja Petri con una base de agrolita y hoja de limón con heridas por presión. ....	29
<b>Figura 6.</b>	Cinéticas de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas <i>Aspergillus</i> en cultivo líquido con el medio de ácido glutámico.....	32
<b>Figura 7.</b>	Producción de ácido acético por las cepas <i>Aspergillus</i> durante la cinética, como una medición de acidificación del medio en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ...	33
<b>Figura 8.</b>	Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de las cepas <i>Aspergillus</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	33
<b>Figura 9.</b>	Cinética de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas <i>Colletotrichum</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	34
<b>Figura 10.</b>	Producción de ácido acético por las cepas <i>Colletotrichum</i> como una medición indirecta de actividad CDA en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	35
<b>Figura 11.</b>	Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de las cepas <i>Colletotrichum</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.....	35
<b>Figura 12.</b>	Cinética de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas <i>Rhizopus</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	36
<b>Figura 13.</b>	Producción de ácido acético por las cepas <i>Rhizopus</i> como una medición indirecta de actividad CDA en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	37
<b>Figura 14.</b>	Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de las cepas <i>Rhizopus</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	37
<b>Figura 15.</b>	Cinética de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas <i>Mucor</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	38
<b>Figura 16.</b>	Producción de ácido acético por la cepa <i>Mucor</i> como una medición indirecta de actividad CDA en cultivo líquido con medio de ácido glutámico. ....	39
<b>Figura 17.</b>	Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de la cepa <i>Mucor</i> en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.....	39
<b>Figura 18.</b>	Dispersión de todos los datos de cinética de actividad CDA (U/g SSI) en cultivo líquido con medio ácido glutámico de cada cepa (♦), los histogramas representan la media de cada cinética (■) y la línea horizontal representa la media total considerando 120 determinaciones (---).....	42
<b>Figura 19.</b>	Cinéticas de actividad específica de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.....	44

<b>Figura 20.</b> Cinética de producción de proteína en extracto crudo enzimático de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.	
	45
<b>Figura 21.</b> Consumo de glucosa de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.	45
<b>Figura 22.</b> Biomasa de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.	46
<b>Figura 23.</b> Dispersión de actividad específica CDA de <i>C. gloeosporioides</i> considerando todos los datos de cinética en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes C/N (●), los histogramas representan la media de cada cinética (■).	47
<b>Figura 24.</b> Cinética de actividades quitina desacetilasa específicas de <i>C. gloeosporioides</i> a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio de ácido glutámico en presencia de inductores.	48
<b>Figura 25.</b> Cinética de actividades quitina desacetilasa específicas a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio de ácido glutámico en presencia de inductores.	49
<b>Figura 26.</b> Cinéticas de producción de proteína en extractos enzimáticos de cultivo sólido de <i>C. gloeosporioides</i> a C/N 13.8 con medio ácido glutámico en presencia de inductores.	51
<b>Figura 27.</b> Cinéticas de producción de proteína en extractos enzimáticos de cultivo sólido de <i>C. gloeosporioides</i> a C/N 13.8 con medio ácido glutámico en presencia de inductores.	51
<b>Figura 28.</b> Consumo de sustrato de <i>C. gloeosporioides</i> a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio ácido glutámico en presencia de inductores.	53
<b>Figura 29.</b> Biomasa fúngica de <i>C. gloeosporioides</i> producida a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio ácido glutámico en presencia de inductores.	53
<b>Figura 30.</b> Dispersión de actividad específica CDA de <i>C. gloeosporioides</i> considerando todos los datos de cinética en cultivo sólido con medio ácido glutámico en presencia y ausencia de inductores (●), los histogramas representan la media de cada cinética (■).	54
<b>Figura 31.</b> <i>C. gloeosporioides</i> creciendo en agrolita-hoja a 72 h de cultivo sólido con medio ácido glutámico a C/N 13.8.	56
<b>Figura 32.</b> Desarrollo de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en heridas de hoja de limón a 72h de cultivo sólido con medio ácido glutámico, tinción con azul de metileno y observado a 100X: (A) Apresorio, hifas y esporas y (B) Esporas e hifas.	57
<b>Figura 33.</b> Micrografías electrónicas de barrido de hoja de limón a 72h de cultivo en contacto con agrolita inoculada con <i>C. gloeosporioides</i> en medio ácido glutámico: (A) Herida por presión y (B) Limbo sin herida.	58
<b>Figura 34.</b> Micrografías electrónicas de barrido de hoja de limón a 72h de incubación en contacto con agrolita inoculada con <i>C. gloeosporioides</i> en medio ácido glutámico: (C) Crecimiento de hifas en herida y (D) Apresorio con biopolímero.	58
<b>Figura 35.</b> Micrografías electrónicas de barrido de hoja de limón a 72h de incubación en contacto con agrolita inoculada con <i>C. gloeosporioides</i> en medio ácido glutámico: (E) Huella de agrolita sobre hoja y (F) Hifas enlace agrolita-hoja.	60
<b>Figura 36.</b> Micrografías electrónicas de barrido de agrolita con crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> a 72h de incubación en contacto con hoja de limón: (G) Hongo creciendo en agrolita y (H) Hifas, esporas y apresorio sobre agrolita.	60

<b>Figura 37.</b> Actividad específica CDA de <i>C. gloeosporioides</i> a 72h de cultivo sólido con medio ácido glutámico con diferentes concentraciones de GA <sub>3</sub> , ABA e IAA.....	62
<b>Figura 38.</b> Actividad específica CDA de <i>C. gloeosporioides</i> a 72h de cultivo sólido con medio ácido glutámico con diferentes concentraciones de Glc y Q36%DA.....	62
<b>Figura 39.</b> Actividad Específica CDA de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de ABA y GA <sub>3</sub> . .....	67
<b>Figura 40.</b> SDS-PAGE de extractos enzimáticos de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de GA <sub>3</sub> .....	68
<b>Figura 41.</b> Zimograma de actividad CDA de extractos enzimáticos de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de GA <sub>3</sub> .....	69
<b>Figura 42.</b> SDS-PAGE de extractos enzimáticos de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 2.3 y 23 mg/L de ABA.....	70
<b>Figura 43.</b> Zimograma de actividad CDA de extractos enzimáticos de <i>C. gloeosporioides</i> en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 2.3 y 23 mg/L de ABA.....	71
<b>Figura 44.</b> Espectros de absorción de: (a) agrolita, (b) quitosano precipitado, (c) materia obtenida de cultivo sólido con medio ácido glutámico y (d) materia obtenida de cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de ABA. ....	74
<b>Figura 45.</b> Espectros de absorción (ATR-FTIR) de quitina comercial Sigma, quitosano comercial de alto peso molecular Fluka y quitosanos obtenidos en cultivo sólido control y cultivo sólido inducido con 23 mg/L de ABA.....	75
<b>Figura 46.</b> (A) Espectro de H-RMN de materia obtenida de cultivo control y (B) Espectro del núcleo <sup>27</sup> Al de materia obtenida de cultivo control. ....	77
<b>Figura 47.</b> Espectros de absorción (ATR-FTIR): (a) gel de aluminio de agrolita, (b) gel de hidróxido de aluminio precipitado a pH 9*, (c) gel de hidróxido de aluminio precipitado a pH 7*, (d) gel de hidróxido de aluminio precipitado a pH 5*, (e) hidroxihidrogel°. (*Du y col., 2009; °Meher y col., 2005).....	79
<b>Figura 48.</b> Espectros de absorción ATR-FTIR (a) y (b) compuestos obtenidos de cultivo control a TA y TB, respectivamente; (c) y (d) compuestos obtenidos de cultivos inducidos a TA y TB, respectivamente; (e) quitosano Fluka.....	80
<b>Figura 49.</b> Espectros de absorción de quitosano comercial y quitosanos obtenidos en cultivos líquidos control e inducido.....	82
<b>Figura 50.</b> Espectro de H-RMN de: (a) y (b) quitosanos de cultivos líquidos control e inducido. ....	83

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Hongos reportados como productores de quitina desacetilasas. ....	16
<b>Tabla 2.</b>	Inductores de actividad quitina desacetilasa reportados en hongos. ....	19
<b>Tabla 3.</b>	Medios de cultivo para obtener actividad quitina desacetilasa de hongos. ....	21
<b>Tabla 4.</b>	Medios de cultivo para diferentes C/N basados en el medio de ácido glutámico reportado por Tsigos y Bouriotis (1995). ....	27
<b>Tabla 5.</b>	Posibles inductores y concentraciones probadas. ....	28
<b>Tabla 6.</b>	Comparación de U/g SSI en condiciones control e inducidas a 72h de cultivo sólido. 50	
<b>Tabla 7.</b>	Comparativa de U/g SSI producidas por <i>C. gloeosporioides</i> sin inductores y a diferentes concentraciones de GA <sub>3</sub> y ABA. ....	63
<b>Tabla 8.</b>	Comparación actividad CDA específica. ....	65
<b>Tabla 9.</b>	Composición de agrolita (Agrolita de México S.A. de C.V.) ....	76
<b>Tabla 10.</b>	Rendimientos de quitosano de cultivo líquido. ....	81

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Quitina

La quitina es un polisacárido cristalino compuesto de unidades de  $\beta$ -1,4 N-acetil-D-glucosamina, es un componente característico del exoesqueleto de invertebrados y de la pared celular de los grupos taxonómicos Zygo-, Asco-, Basidio- y Deuteromicetos (Vetter, 2007), después de la celulosa, la quitina es uno de los biopolímeros renovables más abundantes y de fácil obtención.

La quitina se produce industrialmente a partir del exoesqueleto de camarón y cangrejo, mediante un proceso químico que emplea ácidos y bases fuertes, sin embargo también puede ser obtenida a partir del mismo material mediante procesos biológicos o semibiológicos. La quitina comercial tiene un grado de acetilación del 90% y un peso molecular de 300 a 1000 kDa, tiene alto grado de cristalinidad y capacidad antimicrobiana baja debido a su bajo grado de acetilación (Shahidi y Abuzaytoun, 2005; Rinaudo, 2006).

La segunda fuente de obtención de la quitina es la pared celular de algunos hongos, se obtiene mediante extracción química, sin embargo las diferencias en la composición de la pared celular de hongos y las variaciones en los procesos de extracción, hacen imposible la comparación de especies como fuente potencial de quitina/quitosano (Tan y col, 1996).

La quitina y el quitosano tienen propiedades de importancia, por lo que estos materiales deben ser caracterizados para identificar su área de aplicación, tales como, grado de pureza, grado de acetilación, peso molecular, cristalinidad y capacidad antimicrobiana (Prashant y col, 2007).

Debido a la presencia y abundancia de los grupos hidroxilo y amino en la molécula de quitina, esta tiende a la formación de puentes de hidrógeno intra e inter moleculares que favorecen la formación de agregados lineales de alta cristalinidad

(Prashanth y col., 2007). Obtener un alto grado de desacetilación enzimática resulta complicado debido a la insolubilidad y cristalinidad de la quitina, una estructura amorfa y abierta es deseable para el acceso de la enzima a una área mayor, esto puede lograrse modificando la quitina a formas más solubles (Ramírez-Coutiño y col., 2006). La cristalinidad no representa un problema para la desacetilación química con hidróxido de sodio, puesto que la molécula es muy pequeña y penetra en la estructura sólida de la quitina (Beaney y col., 2007).

La desacetilación de la quitina da como resultado el quitosano, ésta puede ser química mediante un proceso termo alcalino, bioquímica mediante el uso de enzimas o una combinación de ambos métodos (Shahidi y Abuzaytoun, 2005).

## **1.2. Quitosano**

El quitosano es un polisacárido lineal de  $\beta$ -1,4-glucosamina, se encuentra en la naturaleza como un componente importante de la pared celular en distintos momentos durante el ciclo de vida de algunas especies de hongos, se obtiene por N-desacetilación de quitina. Es un material mucho más tratable debido a que es soluble en medios acuosos ácidos a diferencia de la quitina (Rinaudo, 2006).

El quitosano tiene una estructura química definida, puede ser química y enzimáticamente modificado, es física y biológicamente funcional, es biodegradable y biocompatible y puede ser transformado en varios productos, incluidos copos, polvos finos, perlas, membranas, esponjas, algodón, fibras y geles, estas características hacen del quitosano un polímero ventajoso para numerosas aplicaciones (Chatterjee y col., 2005). Al igual que la quitina a este biopolímero se le determinan características como grado de acetilación o desacetilación, peso molecular, cristalinidad y actividad antimicrobiana.

Se han descrito dos metodologías para obtención del quitosano: hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática no ha sido muy estudiada sin embargo, se ha probado que las características de grado de desacetilación tamaño de la



cadena, conformación estructural y conformación de grupos acetilos es diferente según el método de obtención (Shahidi y Abuzaytoun, 2005).

Davis y Bartnicki-García en 1984 proponen que en el hongo *M. rouxii*, el quitosano es sintetizado por dos reacciones consecutivas, la transferencia del grupo glicosil por la quitina sintetasa para formar cadenas de quitina y la desacetilación de las cadenas nacientes de quitina por la quitina desacetilasa.

La producción de quitina y quitosano a partir de hongos ha adquirido mayor atención en los últimos años debido a las ventajas potenciales con respecto a los desechos de crustáceos, que es la fuente más utilizada (Wu y col., 2004). Los residuos de crustáceos están limitados a temporadas y a la localización de industrias pesqueras, mientras que el micelio de los hongos se puede obtener por fermentación en cualquier localización. El micelio de los hongos tiene bajos niveles de materiales inorgánicos comparados con los crustáceos y por lo tanto no requiere de tratamientos de desmineralización durante el proceso (White y col., 1979). La obtención de quitosano de hongos es ventajosa debido a que se obtiene quitosano libre de proteínas alergénicas, el grado de acetilación y peso molecular pueden ser controlados variando las condiciones de fermentación (Nwe y Stevens, 2002). Se han realizado estudios para la obtención de quitosano de hongos, en los cuales las variables han sido el hongo, medio de cultivo y condiciones de cultivo (Tan y col. 1996; Pochanavanich y Suntornsuk, 2002; Hu y col. 2004; Chatterjee y col. 2005; Di Mario y col. 2008; Tajdini y col. 2010). Pochanavanich y Suntornsuk en 2002, trabajaron con especies representativas de hongos filamentosos y levaduras, investigaron la capacidad de producción de quitosano por parte de estos hongos en medio complejo. Obtuvieron entre 10 y 140 mg de quitosano por gramo de biomasa seca, con un grado de desacetilación del 84 al 90% y con peso molecular de 27 a 190 kDa. *Rhizopus oryzae* fue el mayor productor de quitosano, concluyendo que se puede obtener un polímero con características comerciales a partir de micelio de hongos.

Hu y colaboradores en 2004 hicieron una selección de hongos productores de quitosano a partir de 33 cepas de las cuatro clases de hongos, encontraron que todas las cepas eran capaces de producir quitosano pero en diferentes cantidades desde 8 a 646 mg/L, los mejores productores de quitosano fueron: *Absidia glauca*, *Aspergillus nidulans*, *Mucor hiemalis*, *Mucor rouxii* y *Penicillium digitatum*.

En 2005 Chatterjee y colaboradores, obtuvieron quitosano a partir de biomasa de *M. rouxii* cultivado en tres medios de cultivo: melaza sal, levadura peptona glucosa y caldo papa dextrosa, los medios se ajustaron a pH 5 y se incubaron a 30°C a diferentes tiempos. Los quitosanos obtenidos tenían grado de desacetilación superior a 80%, específicamente el obtenido de caldo papa dextrosa fue de 89.7%, sin embargo concluyen que el mejor medio es el que contiene melaza, esto debido a que en conjunto las características obtenidas son mejores que las de los otros quitosano aparte de que el medio es económico.

Wang y colaboradores en 2008 obtuvieron quitosano de *A. coerulea*, *M. rouxii* y *R. oryzae* los tres con un grado de desacetilación mayor a 80% y una pureza de 85%, los pesos moleculares fueron de 6.6, 560, 190 kDa respectivamente.

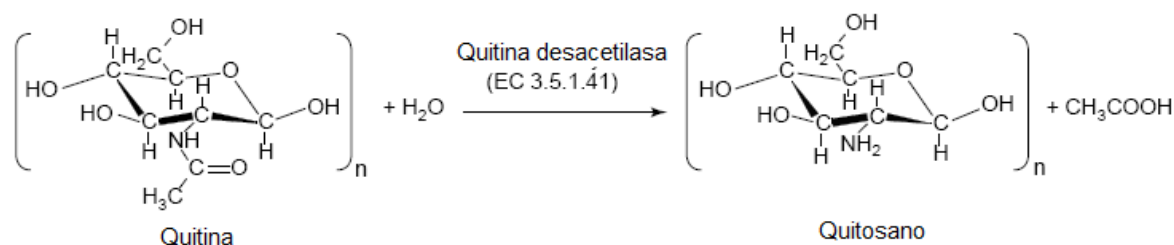
Chatterjee y colaboradores en 2008 cultivaron a *Rhizopus oryzae* en medio con suero de leche, pH 5.4, 30°C por 72 horas y probaron el efecto de la adición de hormonas vegetales, obteniendo 1.1 g de quitosano por litro de medio adicionado con hormona, esto es 50% más que lo obtenido en el medio control.

En 2010 Tayel y colaboradores obtuvieron quitosanos de *M. rouxii* con grados de desacetilación de 83-95%, pesos moleculares entre 21 y 190 KDa; la actividad bactericida fue probada y se concluyó que pueden ser utilizados a pH 4 y 37°C para un efectivo control de bacterias patógenas.

### 1.3. Quitina desacetilasa (CDA)

La quitina desacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de quitina a quitosano por desacetilación de  $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina, recientemente ha aumentado el interés en ella debido a que es posible su aplicación para obtención de oligómeros de quitosano de diferentes tamaños, que han tenido una considerable atención en la industria farmacéutica y el campo biomédico, debido a sus características favorables, tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, acción antimicrobiana y la no toxicidad en animales (Nicolella y col., 2000).

En la Figura 1 se muestra que en presencia de agua la enzima quitina desacetilasa rompe el enlace *N*-acetamido de la quitina dando como productos quitosano y ácido acético.



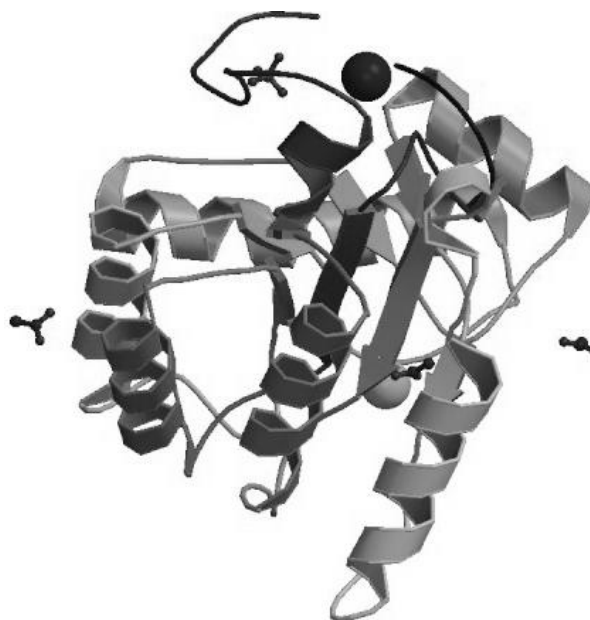
**Figura 1.** Reacción catalizada por quitina desacetilasa (Tsigos y col., 2000).

Araki e Ito en 1975 purificaron una CDA del medio de cultivo de *M. rouxii* mostrando un pH óptimo de 5.5 y removió aproximadamente el 30% de los grupos acetilo de glicol quitina mostrando una  $K_m$  de 0.87 g/L para este sustrato.

A diferencia de la actividad CDA de *Mucor rouxii*, la actividad CDA de *C. lindemuthianum* es de 6 a 25 veces mayor en el líquido de cultivo que en el micelio. Sin embargo, al igual que la enzima de las especies de *Mucor*, la actividad es mayor con sustratos solubles (oligómeros de quitina, glicol quitina) que con quitina coloidal regenerados y reprecipitados (Siegrist y Kauss, 1990).

En 2006 Blair y colaboradores estudiaron la estructura y mecanismo de acción de la enzima quitina desacetilasa del hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum*,

mencionan que esta enzima posee un sitio de fijación del sustrato altamente conservado, con alteraciones muy sutiles que influyen en la especificidad y afinidad con el sustrato. En la Figura 2 se muestra la estructura 3D de la enzima CDA de *C. lindemuthianum*, en donde se observa que tiene interacciones con iones acetato, cloro, fosfato y zinc.



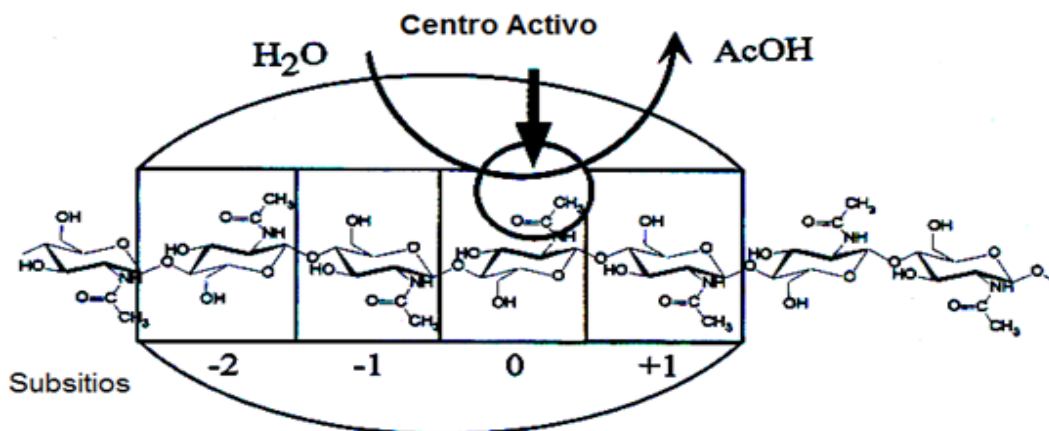
**Figura 2.** Estructura de la quitina desacetilasa del hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* (Base de datos Carbohydrate Active Enzymes)

Los autores probaron como sustrato el dímero, trímero y tetrámero de la quitina obteniendo para este último un  $K_m=0.125$ , posteriormente utilizaron el tetrámero halogenado con Bromo, Cloro y Flúor, mostrando en los tres casos un  $K_m$  muy similar, lo que sugiere que no hay impedimento estérico.

Se sabe que los iones metálicos actúan como activadores o inhibidores de la actividad enzimática. Los iones metálicos, tales como  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$  o EDTA pueden actuar como activadores o inhibidores de CDA en función de su concentración. El  $Zn^{2+}$  (1mM) promovió ligeramente la actividad de CDA en *C. lindemuthianum*, sin embargo un aumento en la concentración (10mM) inhibió la actividad de la enzima (Ghormade y col., 2010).

El modo de acción ha sido reportado específicamente para la quitina desacetilasa de *M. rouxii* sobre quitooligosacáridos con grado de polimerización uno a siete; uno de los puntos que concluyen es el hecho de que la enzima actúa muy difícilmente sobre sustratos de quitina insolubles, y esta aumenta considerablemente sobre quitooligómeros ya que estos son solubles en soluciones acuosas y por tanto más accesibles. Por otra parte mencionan que la enzima no desacetila eficientemente oligómeros con grados de polimerización menores a cuatro, los tetra y pentaoligómeros son totalmente desacetilados mientras que en el caso de los hexa y heptaoligómeros el extremo reductor permanece intacto. La enzima en un inicio remueve el grupo acetil del extremo no reductor y posteriormente sigue la hidrólisis secuencial de los grupos acetamido, posteriormente se disocia y forma un complejo con un nuevo quitinoligómero (Tsigos y col., 1999). Este modo de acción resulta muy similar al de la CDA de *C. lindemuthianum* publicado por Tsigos y Bouriotis en 1995.

Para un mejor entendimiento del mecanismo de acción se ha propuesto que la enzima tiene 4 subsitios (-2, -1, 0, 1) y únicamente el subsitio -2 reconoce fuertemente al grupo N-Acetilglucosamina, como ya se mencionó la enzima difícilmente actúa sobre oligómeros con grado de polimerización menor a cuatro, debido a que no hay reconocimiento (Tokuyasu y col., 2000), los subsitios catalíticos se observan en la Figura 3.



**Figura 3.** Acción catalítica de la enzima quitina desacetilasa (Martinou y col., 2001).

La quitina desacetilasa es una enzima que ha sido purificada y caracterizada de algunos hongos como: *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans* y *Colletotrichum lindemuthianum*; en estos microorganismos se ha encontrado que puede tener un peso molecular de entre 24 y 150 KDa, presentan un pH óptimo de 4.5 a 11.5 según el microorganismo, de manera general para las que fueron halladas en el periplasma el pH óptimo es ácido entre 4 y 5, mientras que para las que fueron obtenidas a partir de un medio de cultivo el pH óptimo es básico de 7 a 11.5. Sin embargo en todos los casos se encontró que la temperatura óptima es de 50°C (Tsigos y col., 2000).

Las quitina desacetilasas son producidas por los hongos, ya sea en el espacio periplásmico o extracelularmente según la función (Ghormade y col, 2010) y se relaciona a dos posibles roles biológicos:

- Interviene en la formación de pared celular
- Se relaciona con interacciones planta-fitopatógeno.

La enzima quitina desacetilasa de bacterias marinas también ha sido estudiada, se ha encontrado que algunas bacterias marinas ampliamente distribuidas en el océano son tal vez las responsables de reciclar el nitrógeno de materiales quitinosos sedimentados, esto ha sido adjudicado a la familia *Vibrionaceae*, todas las cepas estudiadas crecieron en presencia de N-Acetilglucosamina y la mayoría crecieron en concha de cangrejo, todas crecieron en  $\beta$ -quitina y sólo una mayoría creció en  $\alpha$ -quitina esto debido a la mejor accesibilidad en la beta estructura (Zhao y col., 2010).

#### **1.4. Fitopatogénesis**

Durante la patogénesis una de las estrategias del hongo es desarrollar estructuras de infección especializadas llamadas apresorios para entrar al hospedero y ganar acceso a las fuentes de nutrientes dentro de las células de la planta. Las especies de *Colletotrichum* cambian de crecimiento inicialmente biotrófico a necrotrófico, las especies biotróficas obligadas tienen la capacidad de formar la hifa más especializada, el haustorio, penetra la pared celular pero no la membrana plasmática.

Las hidrofobinas del hongo probablemente actúan como un sensor de la hidrofobicidad de la superficie de las hojas y contribuyen al reconocimiento de la superficie (Deising y col., 2000; Mendgen y Hahn, 2002).

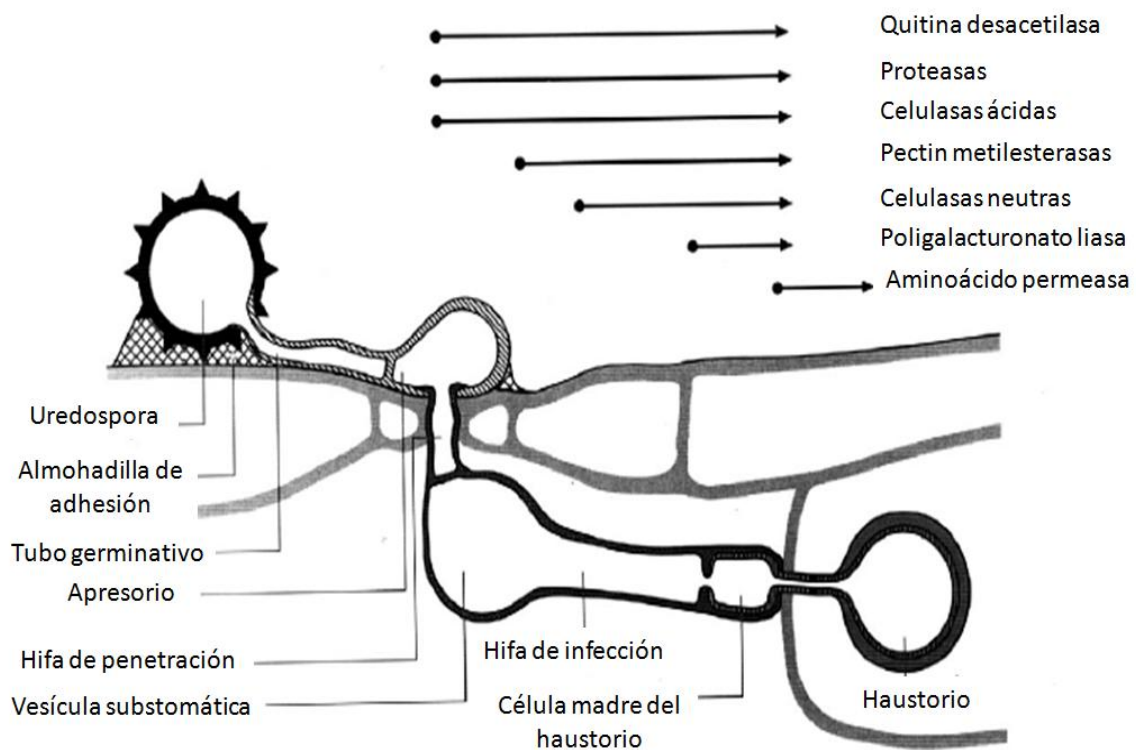
La quitina se encuentra generalmente en la superficie de las paredes celulares de los túbulos germinales y apresorios de hongos fitopatógenos. Algunas quitinasas y glucanasas se expresan en el tejido de la planta y son secretadas a la pared celular o a la vacuola. Hay estudios que concluyen que estas enzimas hidrolizan las paredes celulares de las hifas fúngicas penetrantes y son las capas periféricas de la pared celular de los hongos los objetivos iniciales de las hidrolasas antimicrobianas sintetizadas por la planta en respuesta al ataque del patógeno (Deising y Siegrist, 1995; El Gueddari y col., 2002).

El quitosano es un sustrato pobre para las quitinasas, la quitina de la superficie expuesta de las paredes celulares de algunos hongos, es desacetilada a quitosano durante la penetración y el crecimiento invasivo dentro del tejido del huésped, esta conversión de quitina en quitosano durante el crecimiento intercelular protege las hifas del hongo patógeno de ser hidrolizadas por las quitinasas extracelulares de la planta.

Se ha determinado que el quitosano no es directamente sintetizado en la pared celular de los hongos, la enzima quitina desacetilasa interviene desacetilando las cadenas nacientes de quitina para la obtención de quitosano y por otra parte se ha reportado que hay cambios en la relación quitina/quitosano en la pared celular

dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentre el hongo (Banks y col., 2005).

Durante la patogénesis el hongo patógeno produce varias enzimas para la hidrólisis del tejido vegetal, entre éstas se encuentran las poligalacturonasas, pectin liasas, enzimas celulolíticas (Fernando y col., 2001). En la Figura 4 se muestra en que estructura se producen enzimas degradadoras de pared celular, durante la patogénesis por *Uromyces viciae-fabae*.



**Figura 4.** Estructuras de infección y producción de enzimas degradadoras de pared celular vegetal (Mendgen y col., 1996).

Un sistema de ataque y defensa similar es el de un hongo entomopatógeno a insectos, en el cual, las quitina desacetilasas tienen un rol dual en la modificación de la quitina de la cutícula del insecto así como en la modificación de sus propias paredes celulares como defensa de las quitinasas del insecto, sin embargo en este caso la melanina incorporada en la exo y endocutícula del insecto obstaculiza la



acción quitinasa reduciendo la actividad a un 58%, mientras que la actividad quitina desacetilasa no se inhibe (Nahar y col., 2004).

### **1.5. Respuesta de la planta al daño mecánico**

Los polímeros de la pared celular de las plantas tienen una función dual, como barrera a la penetración del patógeno y como sustrato para las enzimas extracelulares secretadas por bacterias y hongos fitopatógenos. El rol de estas enzimas degradadoras de pared celular incluye algunos aspectos como la penetración, maceración de tejido, adquisición de nutrientes, expresión de síntomas e inducción de la defensa de la planta (Akimitsu y col., 2004).

Cuando las plantas son atacadas por patógenos una serie de medidas de protección son activadas, consisten en defensas químicas y físicas (Gómez-Gómez, 2004).

Una defensa física profundamente estudiada es la síntesis de callosa (polímero formado por  $\beta$ -glucanos, cuyas deposiciones locales en planta están asociadas a heridas, infección por patógenos y a estrés fisiológico)(Voigt y col., 2006), durante la infección fúngica la callosa es depositada en la pared celular debajo del sitio de penetración formando las llamadas papilas que bloquean la entrada del patógeno, éstas se forman entre la membrana plasmática y la pared celular y pueden ser formadas antes de la penetración de la pared celular (Asselbergh y Höfte, 2007).

Para diferentes plantas se ha reportado una diversidad de respuestas al daño mecánico, en tomate se generan especies reactivas de oxígeno resultando en peróxido que actúa como un mensajero secundario para la activación de los genes de defensa, en hojas de frijol lima hay depolarización del potencial de membrana, emisión de mezclas volátiles así como una afluencia de calcio intracelular en el sitio de daño. Se ha determinado que volátiles de seis carbonos o volátiles de hoja verde como son llamados son liberados de las hojas de las plantas inmediatamente después de la herida (Arimura y col., 2005).

La planta también tiene la capacidad de sintetizar una variedad de alcaloides y terpenoides (Wittstock y Gershenzon, 2002). Se han determinado los volátiles emitidos por diferentes partes de la planta de limón y se propone un rol de defensa para el limoneno y aldehídos de terpenos (*i.e.* geranial), emitidos por hojas jóvenes (Flamini y col., 2007).

La respuesta a daño mecánico ya sea local o sistémica, implica la generación, traslado, percepción y transducción de señales de la herida para activar la expresión de genes inducidos por la herida.

Aunque el papel central para el ácido jasmónico (JA) en las respuestas de la planta a las heridas está bien establecido, otros compuestos como oligosacáridos y otras fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y etileno, así como factores físicos como la presión hidráulica o los pulsos eléctricos, también se han propuesto para desempeñar un papel en la señalización de la herida.

El ABA está relacionado con la desecación de la hoja herida y es sabido que un paso en la biosíntesis de ABA es activado por daño mecánico. Por otra parte se ha concluido que el daño mecánico al tejido de la hoja causa un incremento en ABA que activa la biosíntesis de JA que resulta en la activación de expresión de genes inducibles por herida (Dammann y col., 1997) sin embargo Birkenmeier y Ryan en 1998 proponen que ABA puede ser acumulado sólo por desecación y que no es un componente de la ruta de transducción de los genes inducibles por herida.

El JA es sintetizado por la ruta de octadecanoide del precursor ácido  $\alpha$ -linolénico, la aplicación de éste en plantas de tomate induce la expresión del mismo grupo de genes que el JA por sí mismo.

La auxinas como el ácido indol acético (IAA) tiene un efecto negativo en la inducción de genes por herida (León y col., 2001).

Se ha reportado para pétalos de cítricos infectados con *Colletotrichum acutatum*, una acumulación de etileno, IAA y cis-JA, mientras que no hubo diferencia significativa en

el contenido de ABA y trans-JA, lo cual significa que fitohormonas como IAA y cis-JA están relacionadas a la infección y desarrollo de síntomas (Lahey y col., 2004).

Asselbergh y Höfte en 2007 plantean que la deficiencia de ABA en planta incrementa la resistencia a determinados patógenos.

Collins y colaboradores en 2001 proponen que hexenoles de las plantas inducen la formación de apresorios, esto sugiere que químicos secretados por la planta en condiciones basales tienen la capacidad de inducir la infección y probablemente las actividades enzimáticas relacionadas con este proceso.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Hongos productores de quitina desacetilasas.

El hongo *Mucor rouxii* ha sido ampliamente estudiado y se ha reportado como productor de quitosano con diferentes características de peso molecular, grado de desacetilación, cristalinidad y solubilidad en diferentes medios de cultivo, debido a que la síntesis de quitosano en hongos está estrechamente relacionada con la actividad CDA (Davis y Bartniki-García, 1984; Banks y col., 2005), este hecho nos permite pensar que CDAs de *M. rouxii* pueden ser inducidas por algún componente del medio de cultivo (Tabla 1). Existen estudios de producción de quitina desacetilasas por parte de este zygomyceto. (Araki e Ito, 1975; Tsigos y col., 1999; Chatterjee y col., 2005). La enzima purificada de este hongo es activa en varios sustratos quitinosos, requiere un mínimo de quitotetraosa para su catálisis y es inhibida por ácidos carboxílicos especialmente ácido acético (Kafetzopoulos y col. 1993).

*Colletotrichum lindemuthianum* ha sido estudiado como productor de quitina desacetilasas (Tsigos y Bouriotis, 1995; Tokuyasu y col. 1997; Tsigos y col., 1999). Algunos estudios han revelado que su enzima quitina desacetilasa no es inhibida por ácido acético y que requiere un mínimo de quitobiasa para su catálisis (Tsigos y col., 2000). De manera general se ha observado que es un buen productor de quitina desacetilasas, en diferentes medios de cultivo (Tabla 1).

*Colletotrichum gloeosporioides* es el hongo responsable de la antracnosis en frutos como: papaya, mango, aguacate y plátano (Tabla 1). Recientemente Pacheco (2010) informó sobre la producción de quitina desacetilasas de *C. gloeosporioides*, la cual no fue inhibida por ácido acético.

Algunas especies del género *Colletotrichum* son responsables de la caída de hojas del árbol del caucho, durante el proceso de patogénesis conidios pueden ser encontrados en todos los órganos del árbol, en lesiones jóvenes se forman acérvulos

y el crecimiento se mantiene en lesiones viejas en condiciones de alta humedad; se han investigado factores epidemiológicos como tamaño de inóculo, concentración de esporas y efecto de la duración de la humedad sobre la hoja (Guyot y col., 2005).

El género *Rhizopus* se ha investigado ampliamente como productor de quitosano y quitina desacetilasas y la presencia tanto del polisacárido como de la enzima han sido inducidas por algunos compuestos. Se ha estudiado la producción la CDA de *R. stolonifer* con adición de quitosano, carboximetil quitosano, polietilenimina, poligalacturonato o D-glucosamina, los tres primeros intensificaron bandas de 33, 40 y 110 kDa, mientras que los dos últimos no tuvieron efecto. La enzima CDA de *R. nigricans* ha sido purificada y caracterizada, mostrando que su secuencia de amino ácidos tiene una alta identidad con otros zygomycetos como *Phycomyces blakesleeanus*, *Gongronella butleri*, *Rhizopus oryzae* y *Mucor rouxii*. La producción de quitosano por el hongo *R. oryzae* ha sido estudiada en presencia de hormonas vegetales como inductores y proponen que el aumento de quitosano en el hongo implica un aumento en la actividad quitina desacetilasa (Tabla 1).

Se ha reportado que *Aspergillus nidulans* presenta actividad quitina desacetilasa en condiciones basales y con adición de celulosa microcristalina (C), laminarina (L), pectina (P), extracto de semillas de *Lycopersicum esculentum* (PL), quitina de camarón (Q) y xilano (X), sin embargo C, L, P, Q y X presentan una actividad de 0.48 mU/mg, lo cual es menor a lo obtenido en condiciones basales (1.44 mU/mg) y en presencia de PL la actividad aumenta respecto a las otras condiciones (5.76 mU/mg), su enzima fue purificada y caracterizada y se determinó que no se inhibe con ácido acético (Tabla 1).

**Tabla 1.** Hongos reportados como productores de quitina desacetilasas.

Microorganismo	Condiciones de cultivo	Principal hallazgo	Referencias
<i>Aspergillus nidulans</i>	Medio con glucosa, tartrato de amonio, extracto de levadura y elementos traza.	Purificaron una CDA termoestable (30-100°C) y proponen que esta enzima participa en la degradación de la pared celular del hongo.	Alfonso y col., 1995. Tsigos y col., 2000.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Fue cultivado en medio líquido con ácido glutámico por 72h a 25°C.	Recientemente fue reportado como productor de quitina desacetilasas. La enzima semi-purificada fue probada sobre quitosano reacetilado.	Pacheco, 2010.
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Fue cultivado por 72h a 25°C en medio con glucosa y ácido glutámico. De igual forma a se ha empleado medio con extracto de malta, extracto de levadura y glucosa por 432h.	Purificaron una CDA de 150 kDa. Con glicol quitina como sustrato su temperatura y pH óptimos son 60°C y 11.5-12. Purificaron CDA de aprox. 33 kDa. Con glicol quitina como sustrato su temperatura y pH óptimos son 60°C y 11.5-12.	Tsigos y Bouriotis, 1995. Tokuyasu y col., 1997.
<i>Mucor rouxii</i>	El hongo fue crecido en cultivo líquido con ácido glutámico y glucosa durante 96h a 30°C.	Purifican una CDA intracelular de 75 kDa. Con glicol quitina como sustrato su temperatura y pH óptimos son 50°C y 4.5.	Kafetzopoulou s y col. 1993. Tsigos y col., 1999.
<i>Rhizopus nigricans</i>	El hongo creció en Medio Nutritivo Líquido por 18 h.	Purificaron una CDA intracelular de 100 kDa.	Jeraj y col., 2006.
<i>Rhizopus oryzae</i>	El hongo fue cultivado en medio suero de leche con extracto de levadura a 30°C por 72h.	La actividad CDA intra y extracelular aumentó 26% en presencia de ácido giberélico.	Chatterjee y col., 2008.
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Medio caldo papa dextrosa. A 25°C y 160rpm por 72h.	La adición de quitosano al medio de cultivo, indujo la presencia de CDAs extracelulares de diferentes pesos moleculares.	El Ghaouth y col., 1992.

## 2.2. Inductores de la actividad quitina desacetilasa

El fitopatógeno *C. gloeosporioides* ataca en primera instancia ramas y peciolos, posteriormente la lluvia puede llevarlo al fruto, donde en condiciones de humedad cercana a 100%, forma apresorios y penetra la cáscara, lo cual permite pensar que en la cáscara encuentra la fuente de carbono necesaria para crecer y penetrar. Se tiene conocimiento de que *C. lindemuthianum* y *C. gloeosporioides*, son fitopatógenos específicamente causantes de antracnosis en plantas y frutos. Existen estudios sobre el ataque del patógeno al huésped, en el cual este último excreta quitina desacetilasas que cambian la composición de sus paredes celulares, *i.e.* quitina a quitosano, como mecanismo de defensa. Se ha observado que *C. lindemuthianum* incrementa la secreción de enzimas degradadoras de polisacáridos ( $\alpha$ -galactosidasas) en presencia de aislados de diferentes partes de la planta del frijol común (English y col., 1971) (Tabla 2).

El quitosano empleado como antimicrobiano tiene como primer efecto la reducción del decaimiento de los frutos y como efecto secundario induce severos cambios morfológicos en *R. stolonifer*. Se ha reportado que el quitosano estimula el nivel de quitina desacetilasa en *R. stolonifer*, esto puede conducir a un cambio en la proporción quitina-quitosano en las paredes celulares de los hongos, no mencionan las características del quitosano (El Ghaouth y col., 1992), sin embargo tomando en consideración las propiedades del quitosano, proponemos que sea de bajo peso molecular, con grado de desacetilación entre 40 y 75% para que sea soluble pero no tenga efecto antimicrobiano y en pH básico para evitar que las cadenas se protonen (Tabla 2).

Como ya se mencionó, el quitosano estimula la actividad quitina desacetilasa, el grado de acetilación del quitosano usualmente va de 15 a 30%, el resto del polímero son unidades de glucosamina sin acetilar. Resulta de interés probar el efecto de N-acetilglucosamina y glucosamina sobre la actividad quitina desacetilasa, para determinar que parte del polímero tiene la capacidad de incrementar la actividad CDA.

La producción de quitosano por *R. oryzae* en medio suero de leche desproteínizado con la adición de hormonas vegetales ha sido investigado. Se encontró que la presencia de hormonas tales como ácido giberélico, ácido indol-3 acético, ácido indol-3 butírico y kinetina, aumentan el contenido de quitosano del micelio en un porcentaje relativamente pequeño (1.7-14.3%) con respecto al control. La mayor inducción fue observada con ácido giberélico, con un aumento de hasta un 50% de quitosano. La concentración inductora por ácido giberélico fue de 0.1 mg/L mientras que concentraciones mayores tuvieron un efecto inhibitorio de crecimiento y contenido de quitosano en micelio referencia. Se encontró que las hormonas ácido indol-3 acético, ácido indol-3 butírico y kinetina en concentraciones entre 2 y 3 mg/L mejoran la actividad quitina desacetilasa de *R. oryzae* de 1.067 hasta 1.267 veces y puede ser una de las razones de aumento de producción de quitosano (Chatterjee y col. 2008) (Tabla 2).

En un estudio de desacetilación de N-acetilquitooligómeros se explica que el modo de acción de las quitina desacetilasas de *M. rouxii* sobre los N-acetilquitooligosacáridos con grado de polimerización mayor a dos, donde se remueve inicialmente el grupo acetil del extremo no reductor y posteriormente comienza la catálisis de la hidrólisis de los grupos acetamido. En este estudio se obtuvo que con penta-N-acetilquitopentaosa como sustrato, incrementó la tasa de desacetilación en comparación con otros N-acetilquitooligómeros, debido a que la geometría enzima-sustrato favorece la desacetilación, mientras que con (NAcGlc)<sub>6</sub> el extremo no reducido queda intacto (Tsigos y col., 1999).

En una investigación realizada por Kafetzopoulos y colaboradores en 1993, sobre la bioconversión de quitina en quitosano por una enzima quitina desacetilasa de *M. rouxii*, se obtuvo que con el hexaoligómero de la quitina se removió 2.5 veces más ácido acético y hubo mayor actividad relativa, con respecto al pentaoligómero de la quitina (Tabla 2).



Se ha estudiado la producción de quitosano por *M. rouxii* en un medio de melaza y sales con adición de hormonas vegetales tales como ácido indol acético, ácido indol butírico, ácido giberélico y kinetina. Se observó que la presencia de hormonas aumentó el crecimiento del hongo así como la cantidad de quitosano. El ácido giberélico incrementó en 43.78% la producción de quitosano a una concentración óptima de 3 mg/L, mientras que el ácido indol acético aumentó la producción de quitosano en un 36% a una concentración óptima de 1 mg/L. El ácido indol acético a una concentración de 10 mg/L tiene un efecto tóxico sobre el hongo, disminuyendo los parámetros de control (Chatterjee y col. 2009) (Tabla 2).

Se ha reportado que la adición de ácido abscísico en heridas inoculadas con *Colletotrichum acutatum* en chile pimiento (*Capsicum annuum*) incrementa la antracnosis aumentando el tamaño de la herida así como la incidencia de la enfermedad en frutos sueltos (Hwang y col. 2008).

**Tabla 2.** Inductores de actividad quitina desacetilasa reportados en hongos.

Inductor	Principales hallazgos	Referencias
Hojas o cascaras de plantas hospederas	En agar vaina de frijol el patógeno <i>C. lindemuthianum</i> retiene su virulencia mientras que la pierde en agar papa dextrosa. Las paredes celulares como fuente de carbono incrementan la secreción de diversas enzimas degradadoras de polisacáridos de la pared celular vegetal.	English y col. 1971.
Quitosano	La adición de quitosano (3 mg/ml) al medio de cultivo de <i>R. stolonifer</i> , produce un incremento de quitina desacetilasas. Los autores atribuyen este incremento al carácter policatiónico del quitosano, debido a que con polianiones y moléculas neutras no hubo un efecto inductor.	El Ghaouth y col., 1992.
(NAcGlc) <sub>5</sub>	Con (GlcNAc) <sub>5</sub> y (GlcNAc) <sub>6</sub> se obtiene el mismo número de desacetilaciones, sin embargo, con (GlcNAc) <sub>5</sub> se tiene la certeza de que el extremo no reducido es desacetilado. Con (GlcNAc) <sub>6</sub> el extremo reducido no se desacetila. La enzima es inactiva con N-acetilglucosamina.	Martinou y col., 1995. Tsigos y col., 1999.

<p>Ácido Giberélico (GA<sub>3</sub>) y Ácido Indol Acético (IAA)</p>	<p>Se ha reportado que algunas hormonas de plantas incrementan la actividad CDA, especialmente el GA<sub>3</sub> que la incrementa hasta en un 26%. Estos estudios demostraron que las hormonas no tienen ninguna influencia en el grado de desacetilación de quitosano, pero aumentan la calidad del quitosano mediante el aumento de peso molecular medio y la disminución de polidispersidad. En este reporte relacionan el aumento de quitosano en biomasa fúngica con el aumento en la actividad CDA.</p>	<p>Chatterjee y col., 2008. Chatterjee y col., 2009.</p>
<p>Ácido Abscísico (ABA)</p>	<p>La adición de ABA exógeno derivó en un rápido incremento del tamaño de lesión 4 días después del tratamiento con 10mM de ABA. Por otra parte la patogenicidad de diferentes aislados de <i>Colletotrichum acutatum</i> se incrementa notoriamente al ser inoculado conjuntamente con 2mM de ABA.</p>	<p>Hwang y col., 2008.</p>

Para la obtención de quitosano a partir de hongos se han probado diversos medios que de igual forma podrían ser de utilidad para la producción de quitina desacetilasa, ya que la presencia de quitosano en la pared celular está relacionada con la presencia de estas enzimas, por lo que únicamente consideramos los medios mostrados en la Tabla 3, debido principalmente a su amplia aplicación y su bajo costo. El medio con ácido glutámico es particularmente interesante, debido a que ya fue utilizado para la purificación de la enzima quitina desacetilasa y a que es un medio definido a diferencia de los otros propuestos.

**Tabla 3.** Medios de cultivo para obtener actividad quitina desacetilasa de hongos.

Medio de cultivo	Condiciones de cultivo y principales hallazgos	Referencias
Caldo Extracto de Malta	Fue empleado para el crecimiento de hongos por aproximadamente 72h para la posterior detección de actividad CDA en geles de poliacrilamida donde se pudo observar actividad en condiciones nativas y desnaturalizantes.	Trudel y Asselin, 1990.
Medio Ácido Glutámico	Medio utilizado para crecer a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> para posterior purificación y caracterización de enzima CDA.	Tsigos y Bouriotis, 1995.
Caldo Papa Dextrosa	Ha sido utilizado para probar el efecto de la adición de quitosano y otros poliones sobre la producción de quitina desacetilasas. De igual forma se ha empleado para la obtención de quitosano a partir de <i>Mucor rouxii</i> , en este caso no todos los quitosanos obtenidos fueron muy cristalinos, sin embargo todos tenían un grado de acetilación mayor a 80% y un peso molecular entre 25 y 56 KDa.	El Ghaouth y col., 1992.  Chatterjee y col., 2005.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La quitina y el quitosano comparten algunas propiedades que los hacen polímeros de gran utilidad para diversas aplicaciones, sin embargo el quitosano a diferencia de la quitina, presenta solubilidad en soluciones ácidas, lo cual facilita su aplicación.

El quitosano ha despertado notable interés debido a su actividad biológica, como antimicrobiano y antitumoral (Wu y col., 2005). Recientemente se ha introducido en el mercado de los suplementos nutricionales, como ayuda para la pérdida de peso y para reducir el colesterol. Por otra parte tiene un efecto hidratante que es comparable al de una solución acuosa al 20% de propilenglicol o una solución de ácido hialurónico, de igual forma protege la piel de las infecciones microbianas. Debido a su carácter catiónico y a la presencia de los grupos reactivos funcionales también se ha utilizado en el desarrollo de tecnologías de liberación controlada (Tsigos y col., 2000).

El quitosano y sus oligómeros recientemente han tenido una importante atención en la industria farmacéutica y el campo biomédico, debido a sus características favorables, tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, acción antimicrobiana y la no toxicidad para los animales (Nicolella y col., 2000). Es por ello que tiene aplicaciones en áreas tales como biomedicina, ingredientes alimentarios, cosméticos, productos farmacéuticos así como en biotecnología ambiental para la remoción de iones metálicos tóxicos y colorantes de aguas residuales (Shahidi y Abuzaytoun, 2005).

El uso de enzimas en los procesos tiene ventajas sobre los procesos químicos convencionales ya que, estos tienen un mejor control, son menos degradativos, son ambientalmente más seguros y es posible regular el amplio rango de productos heterogéneos que se obtienen (Kafetzopoulos y col., 1993).

Estudios sobre la producción de quitina desacetilasas son de interés ya que contribuyen al conocimiento de esta enzima para su posible aplicación en la

obtención de quitosano y sus derivados, logrando así procesos más eficientes y amigables con el ambiente.

Las investigaciones de las quitina desacetilasas de hongos fitopatógenos han sido realizadas en medio líquido y en su mayoría se han limitado a la purificación de la enzima (Martinou y col., 1995; Tsigos y Bouriotis, 1995; Tokuyasu y col., 1997, Tsigos y col., 1999, Cai y col., 2006; Jeraj y col., 2006), por lo que hacen falta estudios sobre la producción de quitina desacetilasa en medio sólido.

Debido a lo anterior se propone un estudio de la producción de quitina desacetilasas de hongos fitopatógenos en cultivo en medio sólido utilizando inductores de actividad quitina desacetilasa.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General:**

Evaluar la producción de quitina desacetilasas de hongo fitopatógeno en cultivo en medio sólido en presencia de inductores.

### **4.2. Objetivos Particulares:**

→ Seleccionar un hongo productor de quitina desacetilasa.

→ Establecer la relación C/N para crecimiento y producción de las quitina desacetilasas.

→ Evaluar la adición de inductores al medio para la producción enzimática.

→ Determinar la formación de estructuras especializadas de invasión en cultivo en medio sólido con inductor.

→ Establecer protocolo de extracción de quitosano de la biomasa fúngica y caracterizar los compuestos obtenidos.

## 5. HIPÓTESIS

Al menos uno de los hongos estudiados presenta actividad quitina desacetilasa constitutiva. La actividad CDA aumentará bajo la presencia de al menos un inductor.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Preparación de inóculos

Los inóculos se prepararon por propagación en agar papa dextrosa (PDA) con producción de esporas a 25 °C por 10 días. Los géneros estudiados fueron: *Mucor*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, que fueron aislados de plantas y frutos.

### 6.2. Suspensión de esporas

La suspensión de esporas se preparó a partir de cultivos esporulados de siete días en PDA, por agitación con agua estéril y 0.1% (p/v) de Tween 80.

Se determinó la cantidad de esporas en la suspensión obtenida, mediante conteo directo en una cámara de Neubauer y se empleó la dilución adecuada para una concentración de  $10^7$  esporas/mL.

### 6.3. Selección de hongos productores de quitina desacetilasa

Se realizaron cinéticas con duración de 5 días en tubos de vidrio con 4.5mL de medio ácido glutámico el cual se muestra en la Tabla 4 como el medio con C/N de 13.8 (Tsigos y Bouriotis, 1995), muestreando cada 24h y determinando la actividad quitina desacetilasa por el método colorimétrico de Kauss y Bauch (1988).

### 6.4. Determinación de actividad quitina desacetilasa

Se utilizó una modificación del método propuesto por Kauss y Bauch (1988), en el cual se combinó 50 $\mu$ L del extracto crudo enzimático con 100 $\mu$ L de solución amortiguadora de tetraborato 50mM pH 8.5 y 100 $\mu$ L de etilén glicol quitina (EGC), se incubaron a 37°C durante 30 min, para detener la reacción se agregaron 250 $\mu$ L de KHSO<sub>4</sub> 5% (p/v), 250 $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> 5% (p/v), se dejó reposar 15 min después de los cuales se agregaron 250 $\mu$ L de N<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sub>3</sub>, pasados 5 min se adicionaron 250 $\mu$ L de 3-

metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) 0.5% (p/v). Los tubos se pusieron a ebullición por 3 min y se enfriaron con agua helada, enseguida se agregó 250 $\mu$ L de FeCl<sub>3</sub> 0.5% (p/v). Se determinó la absorbancia a 650nm en espectrofotómetro (Jenway 6305, UK). Por cada determinación se hicieron testigos a los cuales se les detuvo la reacción inmediatamente antes de ser incubados, la absorbancia empleada para los cálculos es la absorbancia de la muestra menos la absorbancia del testigo de la misma. Una unidad de enzima se considera como la que libera 1 $\mu$ mol de acetato del etilen glicol quitina (EGC) por minuto (Nahar y col., 2004). Se realizó una curva patrón utilizando glucosamina como estándar (Anexo I).

#### **6.5. Detección de ácido liberado al medio**

Se colocaron 100 $\mu$ L de extracto crudo enzimático en un pozo de microplaca se adicionan 100 $\mu$ L de solución de quitina coloidal 2% (p/v) y se incubaron por 30min a 37 °C, posteriormente se colocaron 30 $\mu$ L de solución de resazurina 0.01% (p/v) y se determinó la absorbancia a 690nm (Palomino y col., 2002). Para determinar la concentración de ácido se realizó una curva de calibración con ácido acético (Anexo 1).

#### **6.6. Determinación de proteína**

Se utilizaron dos métodos de determinación de proteína, método de Bradford (Bradford y col., 1976) y Método de Lowry-Peterson (Lowry-Peterson, 1977), el primero fue empleado en la selección del hongo productor de quitina desacetilasas (cultivo líquido) y el segundo del establecimiento de relación C/N en adelante (cultivo sólido), esto debido a que el método de Bradford tendría mayor interferencia debida al pH básico del medio y en cultivo sólido debido probablemente a la cantidad de proteína producida.

### **6.6.1. Microensayo de Bradford**

Se determinó por un método basado en la técnica de microensayo de Bradford. Se utilizaron microplacas con pozos de capacidad 300 $\mu$ L, agregando 160 $\mu$ L de extracto crudo enzimático, 40 $\mu$ L de reactivo de Bradford en cada pozo, se procedió a leer absorbancia a 595nm en el lector ELISA. Se utilizó una curva patrón para determinar la concentración de proteína utilizando seroalbúmina bovina como estándar (Anexo I).

### **6.6.2. Lowry-Peterson**

Se determinó por la técnica colorimétrica de Lowry-Peterson. Se agregó 1mL de extracto crudo enzimático en cada tubo, posteriormente se adicionó 0.5mL de reactivo A (Anexo II), se incubó durante 10 min a 25°C, después se agregó 1mL de reactivo B (Anexo II) se agita en un vórtex y se incuban 30 min a 25°C. Posteriormente se determinó absorbancia a 750nm es un espectrofotómetro. Se realizó una curva de calibración con seroalbúmina bovina como estándar (Anexo I).

### **6.7. Determinación de azúcares reductores**

Se determinó por la técnica colorimétrica de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se agregó 0.5mL de extracto crudo enzimático en cada tubo, después se agregaron 0.5mL de reactivo DNS, se pusieron a ebullición por 5 minutos, se adicionaron 4mL de agua destilada y se leyó en un espectrofotómetro a 575nm. Se realizó una curva patrón utilizando glucosa como estándar (Anexo I).

### **6.8. Determinación de Biomasa**

Se colocaron las cajas de petri con 4g de agrolita en horno a 100°C hasta peso constante, estos pesos se registraron, por cada tiempo de la cinética se tomaron dos cajas y se metieron a horno a 100°C hasta peso constante, estos pesos fueron registrados y la biomasa se determinó como la diferencia de pesos.



### 6.9. Cultivo en medio sólido

El cultivo en medio sólido fue realizado en sistema tipo koji el cual consistió en colocar 4g de agrolita en caja Petri y añadir 11mL de medio ácido glutámico inoculados con  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *Colletotrichum gloeosporioides*.

### 6.10. Establecimiento de la relación C/N

Se probaron cinco relaciones C/N, modificando únicamente la fuente de carbono, como se muestra en la Tabla 4, los niveles probados fueron los siguientes: 6.5, 13.8, 20, 30 y 40.

**Tabla 4.** Medios de cultivo para diferentes C/N basados en el medio de ácido glutámico reportado por Tsigos y Bouriotis (1995).

C/N	Glucosa (g/L)	Ácido Glutámico (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (g/L)	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (mg/L)	FeSO <sub>4</sub> • 9H <sub>2</sub> O (mg/L)	MnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (mg/L)	CuSO <sub>4</sub> (mg/L)	Tiamina (mg/L)	Ácido Nicotínico (mg/L)
6.5	7.95	6.6	1	0.5	1.8	1	0.3	0.4	1	1
13.8	15	6.6	1	0.5	1.8	1	0.3	0.4	1	1
20	24.67	6.6	1	0.5	1.8	1	0.3	0.4	1	1
30	40.37	6.6	1	0.5	1.8	1	0.3	0.4	1	1
40	56.07	6.6	1	0.5	1.8	1	0.3	0.4	1	1

### 6.11. Efecto de inductores de quitina desacetilasas

Se probaron los siguientes inductores de actividad quitina desacetilasa: hoja de limón (*Citrus limon var Eureka*), N-acetil-D-glucosamina (NAcGlc), glucosamina (Glc), quitosano 36% acetilado (Q36%DA), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ácido abscísico (ABA) y ácido indol acético (IAA), las concentraciones empleadas se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Posibles inductores y concentraciones probadas.

INDUCTOR	CONCENTRACIÓN
NAcGlc	0.36 g/L
Glc	0.768 g/L
Q36%DA	1 g/L
GA <sub>3</sub>	0.23 mg/L
ABA	0.23 mg/L
IAA	0.23 mg/L

La hoja de limón con heridas por presión, se colocó por el haz sobre la agrolita como se muestra en la Figura 5 y después del tiempo de incubación, se procesaron algunas secciones para microscopía electrónica de barrido.



**Figura 5.** Sistema experimental utilizado: caja Petri con una base de agrolita y hoja de limón con heridas por presión.

#### **6.12. Procesamiento de muestras para microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Las muestras fueron fijadas con solución de 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 secaron a punto crítico, se cubrieron con oro y se observaron en microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Tokyo) (Zulfiqar y col., 1996).

#### **6.13. Obtención del extracto crudo enzimático**

La agrolita con hongo fue molida en un mortero con pistilo, con solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.1M pH 6.5 en una relación 1:1 y se pasó por filtro de 0.45 $\mu$ m, y el líquido filtrado fue considerado como el extracto crudo enzimático.

#### **6.14. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Se prepararon geles de poliacrilamida (50 X 140 X0.75 mm) 12% (p/v) según Laemli (1970). La muestra fue preparada de la siguiente forma: en un tubo eppendorf se agregaron 15 $\mu$ L de extracto crudo enzimático y 15 $\mu$ L de amortiguador Tris/HCl 125mM a pH 6.8 con 5% (p/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol, la mezcla se puso a ebullición por 4 minutos y se cargaron 20 $\mu$ g de proteína por pozo.

#### **6.15. Zimogramas de actividad quitina desacetilasa**

Se prepararon geles de poliacrilamida (50 X 140 X0.75 mm) 12% (P/V) con 0.01% (p/v) glicol quitina. La muestra fue preparada de la siguiente forma: en un tubo eppendorf se agregaron 15 $\mu$ L de extracto crudo enzimático y 15 $\mu$ L de amortiguador Tris/HCl 125mM a pH 6.8 con 5% (p/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol y se cargaron 20 $\mu$ g de proteína por pozo. Después de electroforesis los geles se incubaron a 37°C por 24 horas con agitación continua en buffer 50mM Hepes-KOH pH 7 con 1% (v/v) de Triton X-100. Para revelar el gel se colocó por 3 minutos en solución 0.5 M Tris-HCl pH 9 con 0.01% (p/v) de blanco de calcoflúor, se realizaron lavados con agua desionizada hasta que disminuyó la intensidad de tinción y se observaron bandas (Trudel y Asselin, 1990).

#### **6.16. Extracción de quitosano de biomasa fúngica en cultivos en medio sólido**

Se molió la biomasa creciendo en agrolita y se hicieron lavados con agua destilada hasta neutralidad del filtrado, se liofilizó y almacenó a 4°C. La biomasa se mezcló con 40 partes de NaOH 1 N por una parte de biomasa, se homogenizó y se colocó en una autoclave a 121°C por 15 minutos, se centrifugó a 9500rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se homogenizó con agua destilada, se re-centrifugó a 9500rpm por 20 min para obtener la materia insoluble alcalina (AIM) y esta se almacenó a -70°C. En matraz con refrigerante se mezcló AIM y HCl 1 N a 95°C por 3 h en una relación 1:40 respecto al estimado de biomasa. Se centrifugo a 10,000 rpm por 45 minutos. Se transfirió sobrenadante a tubo nuevo y se ajustó pH a 12 con NaOH 8 M. Se centrifugó de nuevo y se decantó sobrenadante, se liofilizó el

pellet. Para purificar el quitosano, el liofilizado se disolvió en 150mL de solución de ácido acético 0.25 M durante 12 horas, se pasó la solución por un filtro de 0.45 $\mu$ m, el material extraído precipitó del filtrado ajustando el pH a 10 aproximadamente con hidróxido de amonio (Hu y col., 2004).

Se probó una segunda metodología de extracción en la cual la biomasa se mezcló con 40 partes de NaOH 1 N por una parte de biomasa, se homogenizó y se dejó por 16h a 40°C con agitación, se centrifugó a 9500rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se homogenizó con agua destilada, se re-centrifugó a 9500rpm por 20 min para obtener la materia insoluble alcalina (AIM) y esta se mezcló con 200mL de solución de ácido acético 0.35M por gramo de biomasa, se dejó 16h a 40°C con agitación (Nwe y col., 2002). Se centrifugó a 10,000 rpm por 45 minutos. Se transfirió sobrenadante a tubo nuevo y se ajustó pH a 12 con NaOH 8 M. Se centrifugó de nuevo y se decantó sobrenadante, se liofilizó el pellet. Para purificar el quitosano, el liofilizado se disolvió en 150mL de solución de HCl 0.25M, la solución se filtró a 0.45 $\mu$ m, el material extraído precipitó del filtrado ajustando el pH a 10 aproximadamente con hidróxido de amonio.

#### **6.17. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con sistema de Refractancia total atenuada (ATR-FTIR)**

Las muestras obtenidas de extracciones se colocaron en la platina con aditamento para polvos de un espectrofotómetro (Spectrum 100), se aplicó presión con el brazo mecánico y se obtuvieron los espectros en un intervalo de 600-4000 $\text{cm}^{-1}$ , para identificar la naturaleza de los enlaces (Nwe y col., 2008).

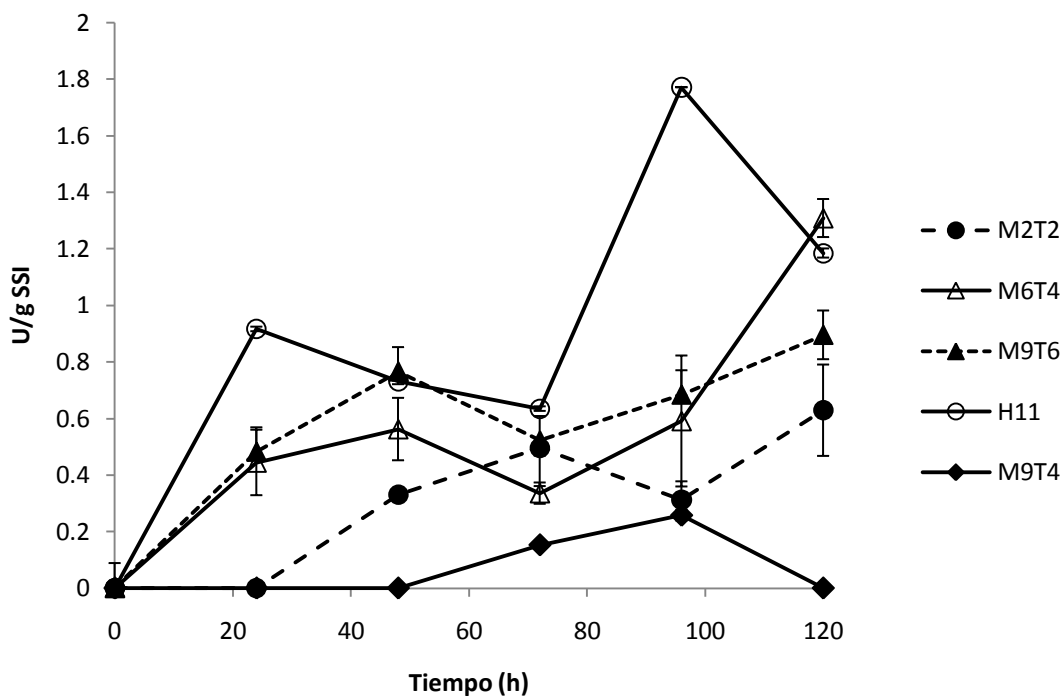
#### **6.18. Resonancia magnética nuclear $^1\text{H}$ y $^{27}\text{Al}$ (RMN)**

Se pesaron 7-10mg de muestra y se agregaron con 700 $\mu$ L de D<sub>2</sub>O y 20 $\mu$ L de HCl en un frasco con tapa, la mezcla se dejó con agitación magnética durante 12 h y se procesó en un espectrómetro Bruker AC 200 a 200MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{27}\text{Al}$  a 298 °K (Hirai y col., 1991).

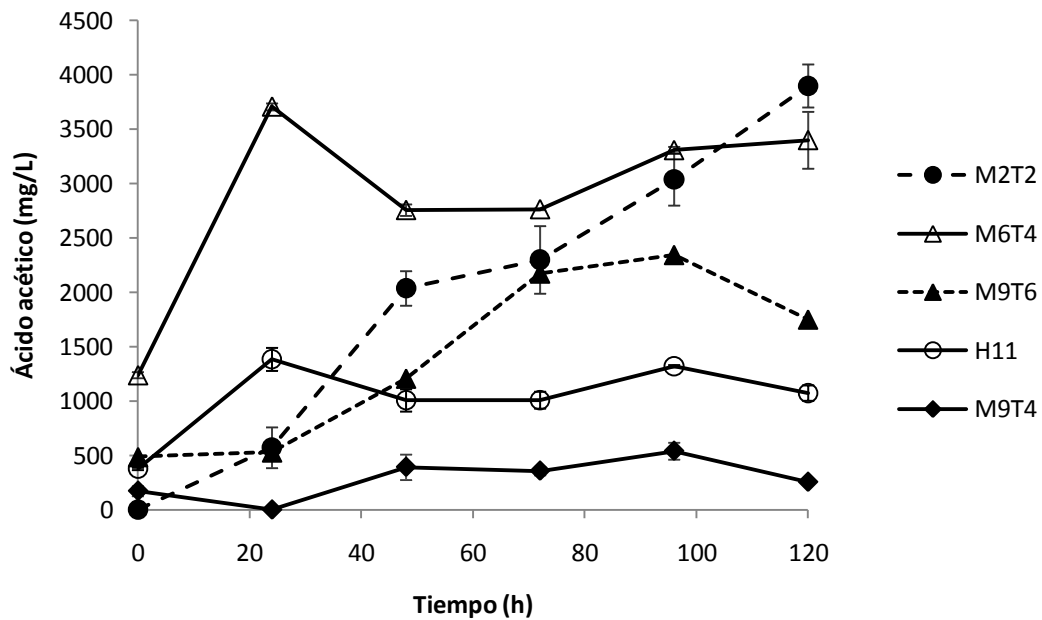
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Selección del hongo productor de quitina desacetilasas

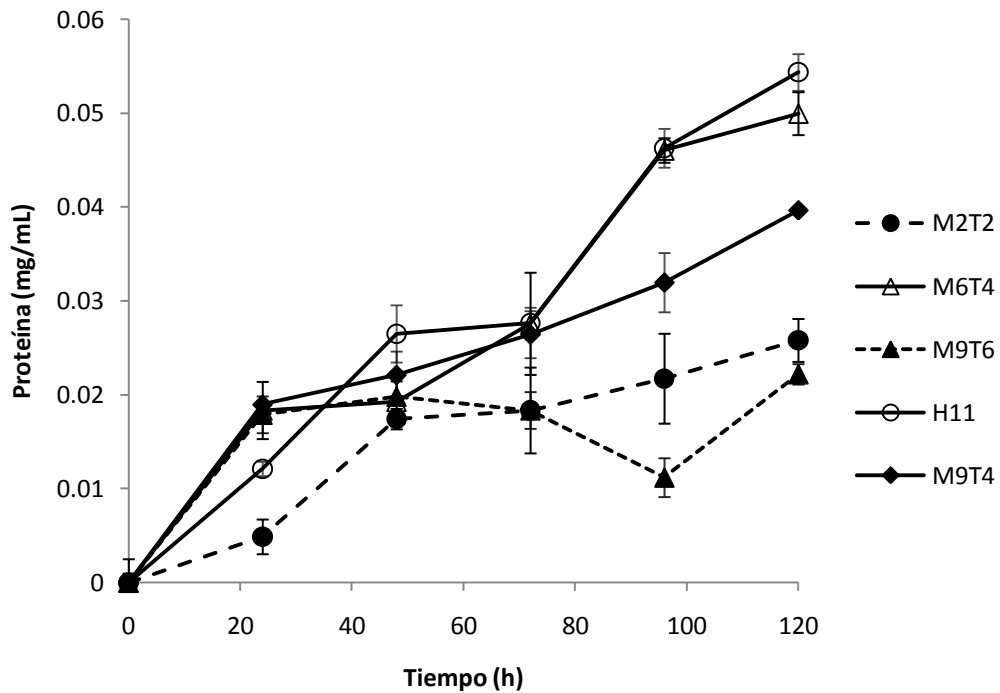
Los cinco aislamientos de *Aspergillus*, dos aislamientos de *Colletotrichum*, dos aislamientos de *Rhizopus* y un aislamiento de *Mucor* fueron analizados en cuanto a su actividad CDA. En las Figuras 6, 7 y 8 se muestran las actividades enzimáticas expresadas como unidades de actividad quitina desacetilasa por gramo de sustrato sólido inicial (U/ g SSI), así como el ácido acético y la proteína producidos por las cepas *Aspergillus*.



**Figura 6.** Cinéticas de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas *Aspergillus* en cultivo líquido con el medio de ácido glutámico.



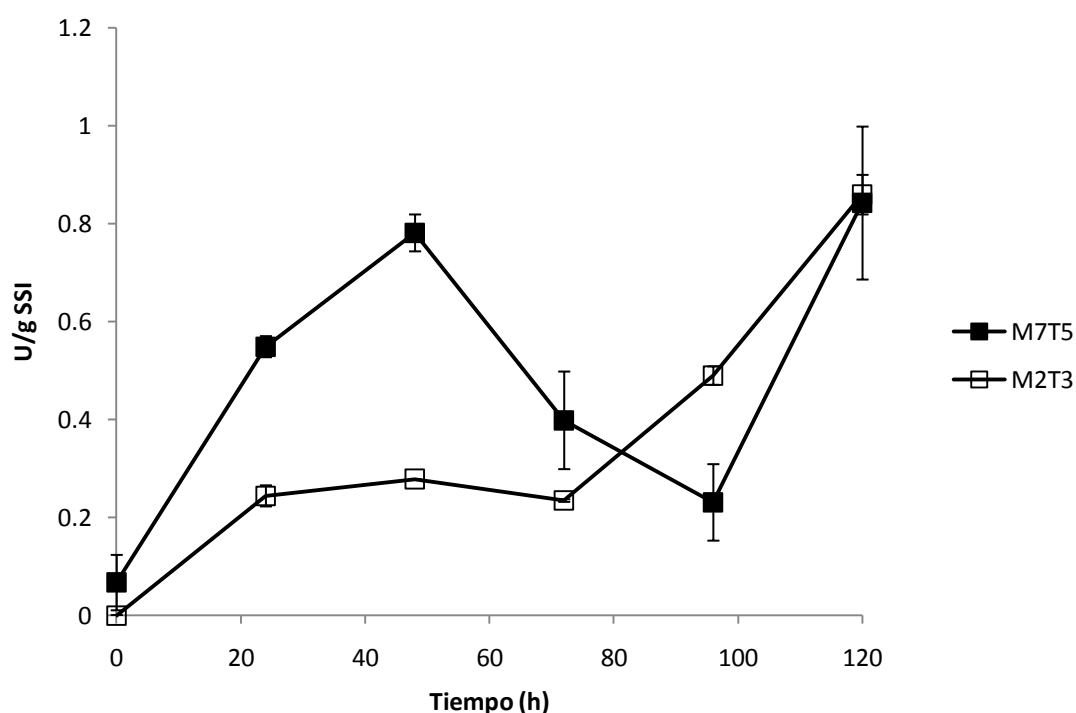
**Figura 7.** Producción de ácido acético por las cepas *Aspergillus* durante la cinética, como una medición de acidificación del medio en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.



**Figura 8.** Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de las cepas *Aspergillus* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.

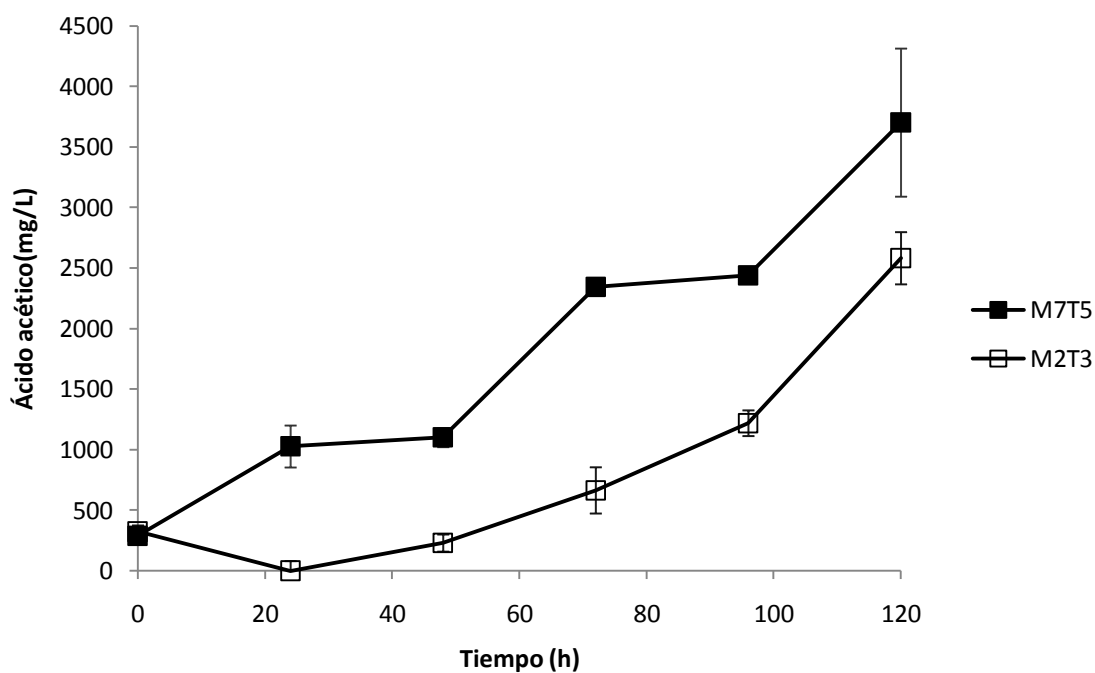
En la Figura 6 se observa que todas las cepas *Aspergillus* presentaron actividad quitina desacetilasa de igual forma todas las cepas *Aspergillus* liberan ácido como se muestra en la Figura 7. Las cepas M2T2 y M9T4 mantienen una actividad por debajo de 0.6 U/g SSI durante toda la cinética, las cepas M6T4 y M9T6 presentan dos picos de actividad a las 24 y 120h, mientras que la cepa H11 muestra un comportamiento destacado, con actividad superior a las 0.8 U/g SSI a las 24 y 96h. Prácticamente todas las cepas presentan un aumento de proteína a excepción de M9T6 que se mantuvo alrededor de los 0.02 mg/mL durante la cinética.

En las Figuras 9, 10 y 11 se presentan las actividades enzimáticas CDA como U/ g SSI, ácido acético y proteína producidos por las cepas *Colletotrichum*.

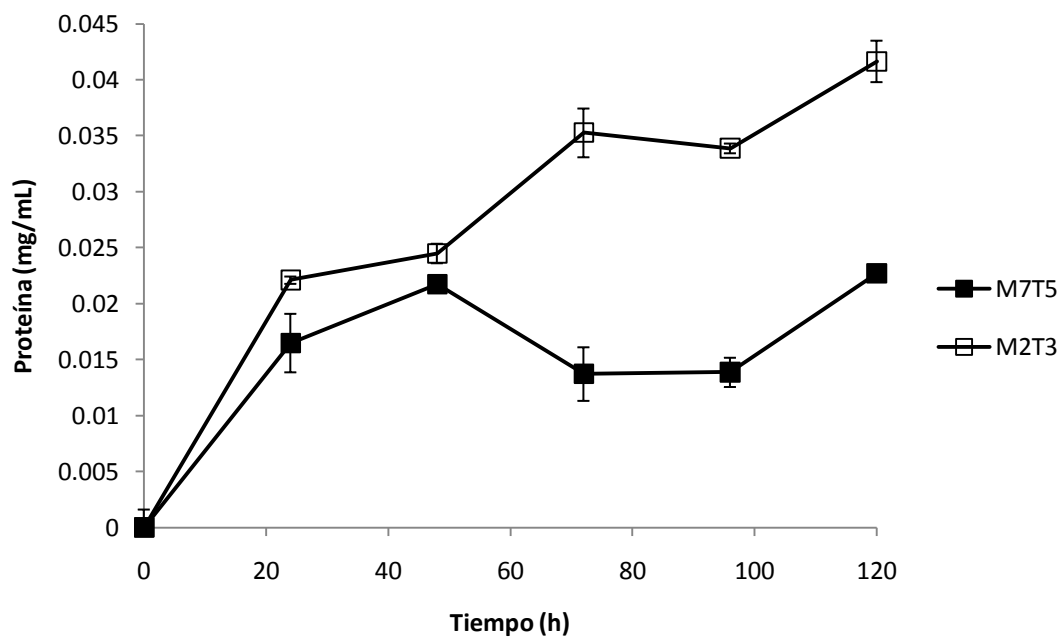


**Figura 9.** Cinética de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas *Colletotrichum* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.





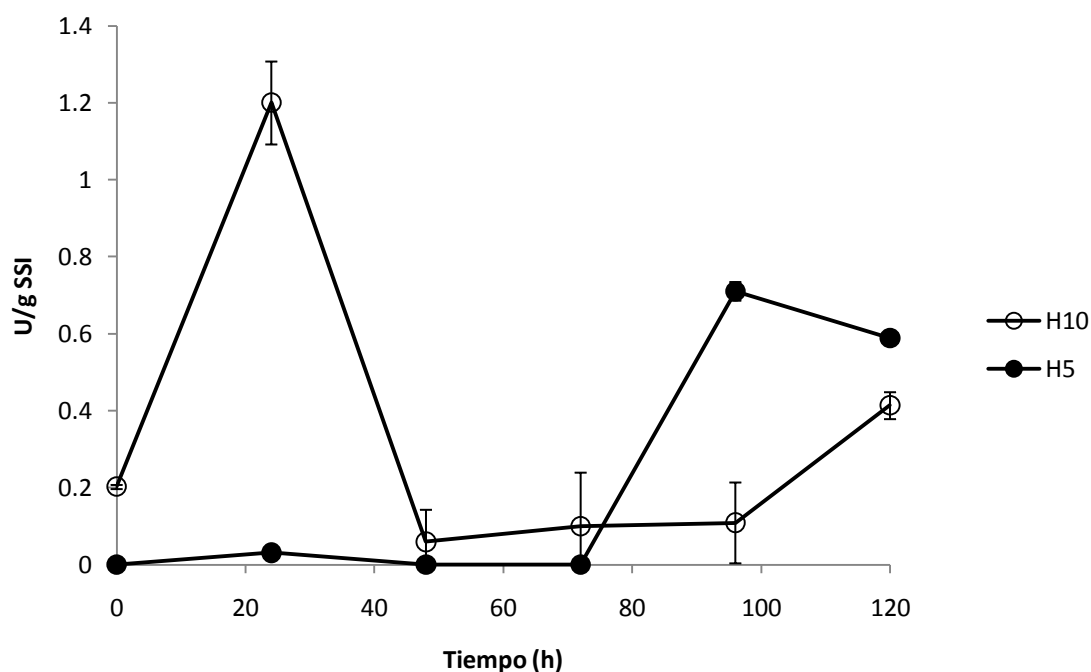
**Figura 10.** Producción de ácido acético por las cepas *Colletotrichum* como una medición indirecta de actividad CDA en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.



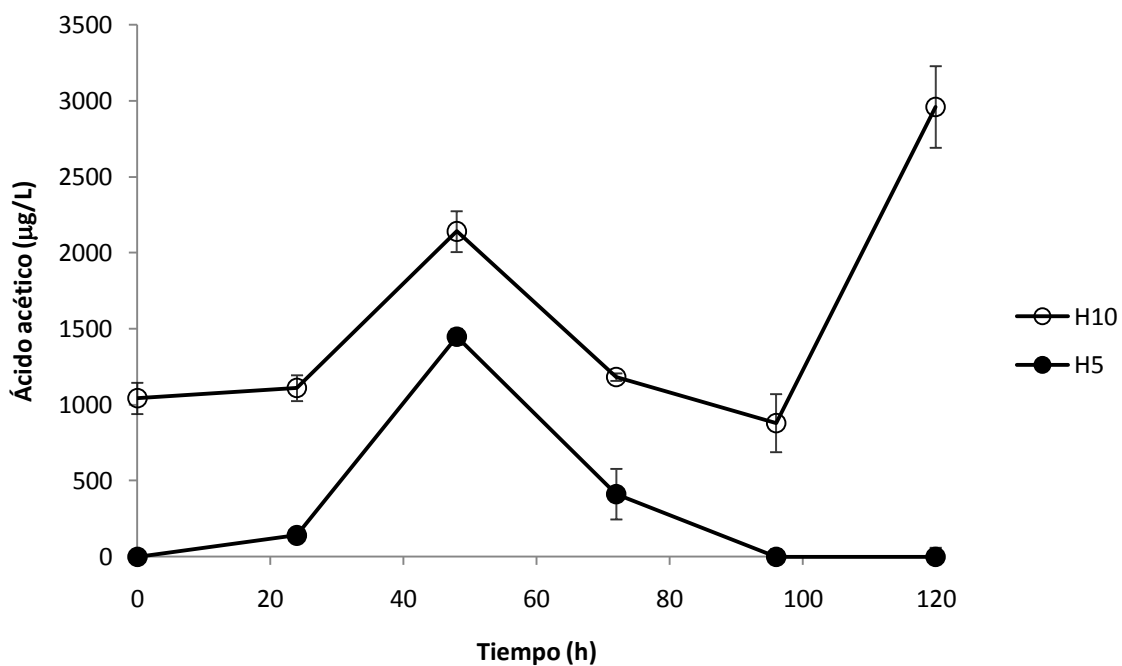
**Figura 11.** Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de las cepas *Colletotrichum* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.

En la Figura 9 se observa que M7T5 presenta mayor actividad CDA y esta es superior a 0.3 U/g SSI a las 24, 48, 72 y 120h, lo que podría representar una ventaja respecto a las cepas que presentan un único pico de actividad durante la cinética, este comportamiento de actividad CDA es debido al mantenimiento de la producción de proteína (Figura 11).

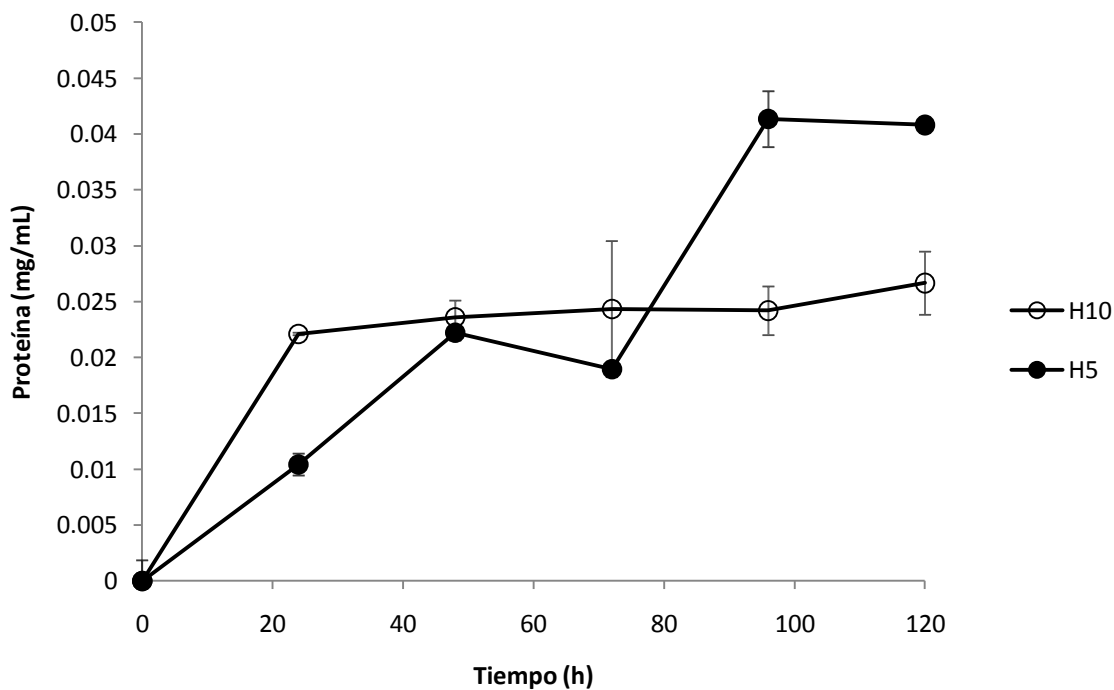
En las Figuras 12, 13 y 14 se observa el comportamiento de actividad enzimática en U por gramo de SSI, ácido acético y proteína de las cepas *Rhizopus*.



**Figura 12.** Cinética de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas *Rhizopus* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.



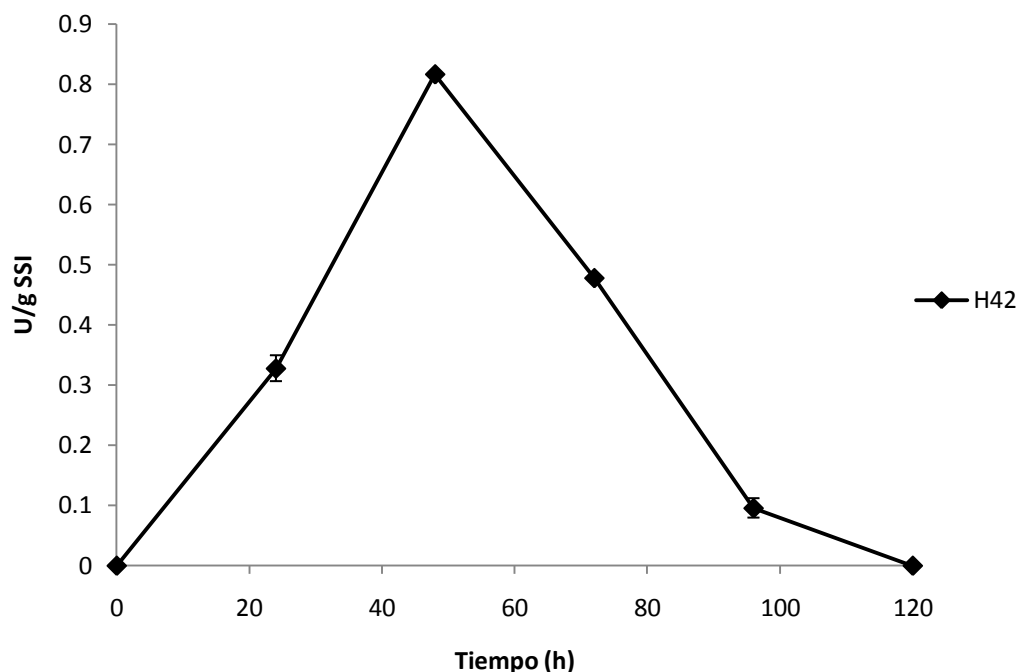
**Figura 13.** Producción de ácido acético por las cepas *Rhizopus* como una medición indirecta de actividad CDA en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.



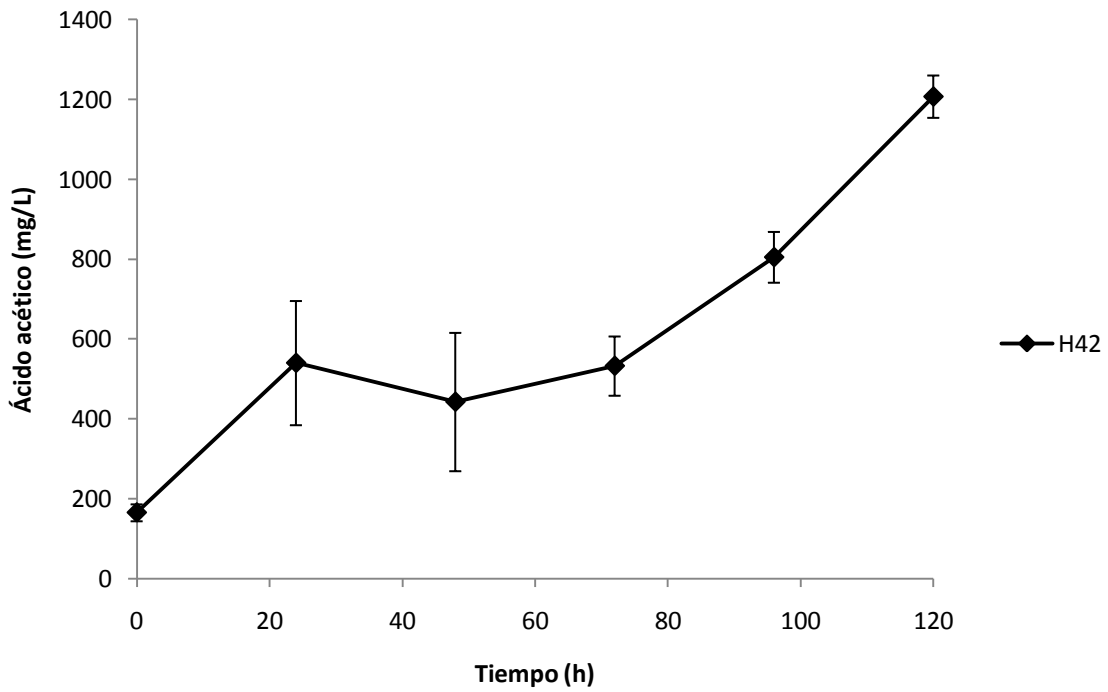
**Figura 14.** Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de las cepas *Rhizopus* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.

Las cepas de *Rhizopus* presentaron producción de ácido, mostrando un aumento a las 48h, por lo que se esperaba que cualquiera presentara actividad quitina desacetilasa, como se observa en la Figura 12, *Rhizopus H10* tiene la mayor actividad CDA a las 24h, posteriormente no hay actividad detectable. *Rhizopus H10* mantiene proteína constante, mientras que *Rhizopus H5* tiene un aumento constante.

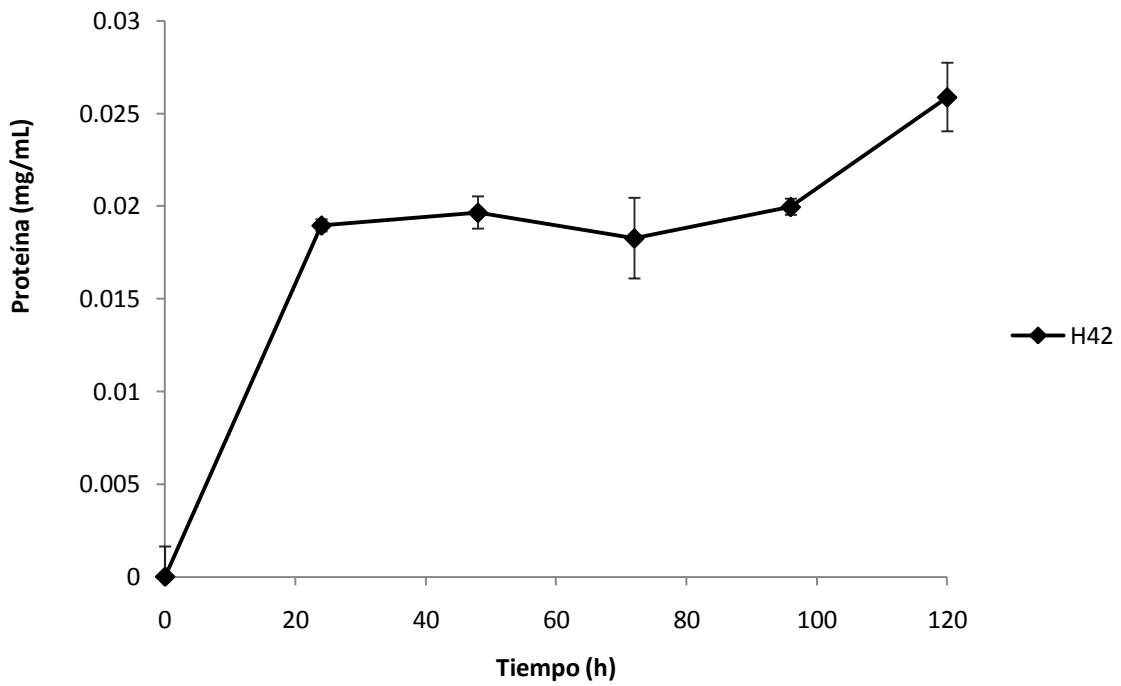
En las Figuras 15, 16 y 17 se presentan el comportamiento de actividad enzimática quitina desacetilasa por gramo de SSI, producción de ácido y proteína de la cepa *Mucor*.



**Figura 15.** Cinética de actividades enzimáticas CDA (U/g SSI) de las cepas *Mucor* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.



**Figura 16.** Producción de ácido acético por la cepa *Mucor* como una medición indirecta de actividad CDA en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.



**Figura 17.** Cinética de producción de proteína en el extracto crudo enzimático de la cepa *Mucor* en cultivo líquido con medio de ácido glutámico.

*Mucor H42* presenta un único pico de actividad a las 48 h, la actividad enzimática por gramo de SSI es mayor a 0.3 U/g SSI a las 24, 48 y 72h, su actividad no es significativamente diferente a la de *Aspergillus M9T6* sin embargo esta última cepa mantiene su actividad por arriba de la media (0.4 U/mg) durante toda la cinética a diferencia de *Mucor H42*. Esta cepa muestra un aumento constante en la producción de ácido (Figura 16), mientras que la proteína aumenta hasta 0.02 mg/mL en la primeras 24h y posteriormente se mantiene constante (Figura 17).

De manera general las actividades CDA de los hongos son muy variables a lo largo de la cinética y entre las cepas, esto puede ser debido a que las velocidades de crecimiento son diferentes y la producción de esta enzima puede estar relacionada a determinada fase de crecimiento, como reportan para *Saccharomyces cerevisiae*, cuyos genes para CDAs se expresan en distintos tiempos durante la esporulación (Christodoulidou y col., 1996).

En general los hongos produjeron entre 0.02 y 0.04mg/mL de proteína, las cepas *Aspergillus M6T4* y *H11* produjeron hasta 0.05mg/mL de proteína, lo cual es el doble de lo obtenido por las cepas *Rhizopus* y *Mucor*, esta diferencia puede deberse a la diferencia de géneros así como a las proteasas producidas por cada cepa y según lo observado la acidificación del medio no guarda ninguna relación con la producción de proteína soluble.

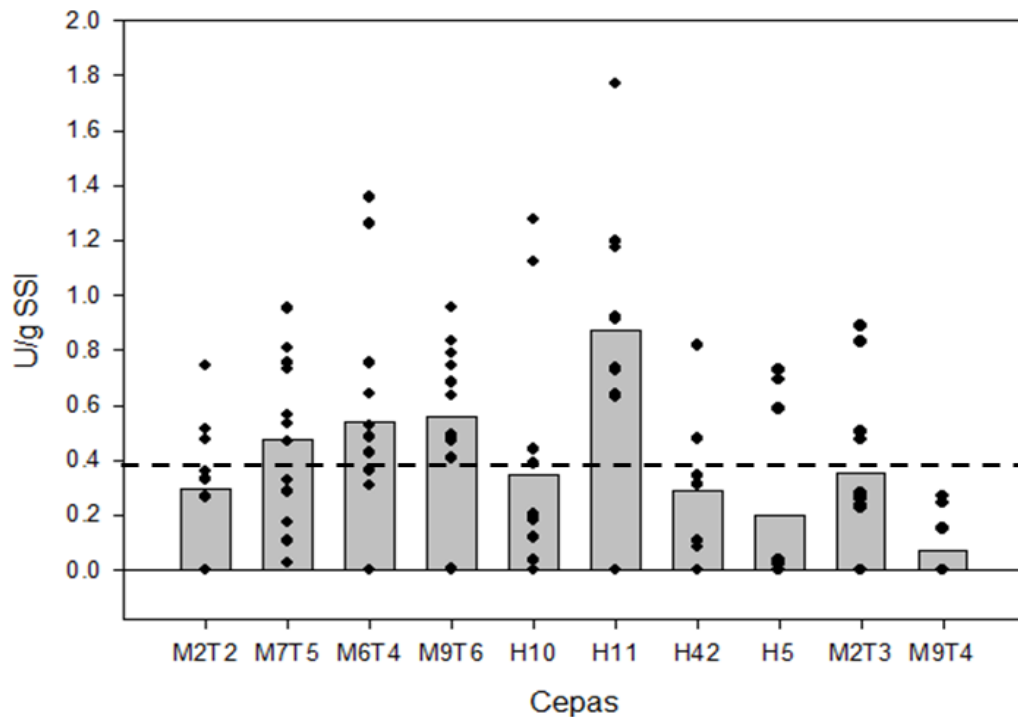
La determinación de ácido acético con resazurina perseguía determinar indirectamente la actividad quitina desacetilasa, por cuantificación de ácido acético liberado, sin embargo esta determinación es inespecífica y sólo permite determinar acidificación del medio, debido a que la resazurina es reducida a resofurina en presencia de ácido, debido a que en algunos estudios se ha determinado que hongos creciendo en cultivo líquido producen ácido fórmico, oxálico, málico, malónico, tartárico (Plassard y Fransson, 2009), probablemente se determine la presencia de cualquier tipo de ácido que liberen estos hongos.

Se ha propuesto que los ácidos orgánicos producidos por los hongos tienen muchos roles en los procesos de descomposición de la madera, la degradación de la lignocelulosa, en los procesos de patogénesis a la planta, así como en la adquisición de nutrientes.

Los más importantes productores de ácidos orgánicos son las cepas de *Aspergillus*, usadas comercialmente para la producción de ácido cítrico, esto es congruente con lo mostrado en la Figuras 7 y 10 donde se observa que las cepas *Aspergillus* y *Colletotrichum* producen mayores cantidades de ácido respecto a las cepas de *Rhizopus* y *Mucor*.

Las determinaciones de actividad CDA de cada tiempo se realizaron por duplicado y se realizó análisis de varianza (ANOVA) con el programa SPSS Statistics 17.0, se procesaron los datos de todos los hongos a todos los tiempos (Anexo III).

Se seleccionaron los hongos *Aspergillus M9T6*, *Aspergillus M6T4*, *Aspergillus H11* y *Colletotrichum M7T5*, cuyas medias de actividad CDA por gramo de SSI fueron superiores a la media de actividad enzimática total por g de SSI (0.4 U/g SSI), representada por línea horizontal en la Figura 18.



**Figura 18.** Dispersión de todos los datos de cinética de actividad CDA (U/g SSI) en cultivo líquido con medio ácido glutámico de cada cepa (♦), los histogramas representan la media de cada cinética (■) y la línea horizontal representa la media total considerando 120 determinaciones (---).

La cepa *Aspergillus H11* a las 96 h tiene una actividad volumétrica de  $0.05 \pm 0.00$  U/mL lo cual es 5.5 veces mayor que la actividad obtenida en el primer paso de purificación de una CDA de *Aspergillus nidulans* en un medio de autólisis a 25 días de cultivo (0.0092 U/mL). La media de la actividad volumétrica presentada por *Colletotrichum M7T5* a 72h de cultivo (0.011U/mL) es 56 veces inferior a la reportada en el primer paso de purificación de la enzima quitina desacetilasa de *Colletotrichum lindemuthianum* (0.622 U/ml) (Tsigos y Bouriotis, 1995).

Las cepas *Rhizopus H10* y *Mucor H42* presentan un único pico a las 24h (1.19 U/g SSI) y 48h (0.817 U/g SSI) respectivamente, mientras que *Colletotrichum M7T5* mantiene una actividad superior a 0.4 U/g SSI durante la cinética excepto a las 96h, por lo cual se considera mejor productor de esta actividad enzimática. Estos resultados pueden deberse a que las enzimas quitina desacetilasas de este género y



especie de hongos no se inhiben con la presencia de ácido acético (Tsigos y col., 2000; Pacheco, 2010).

De los aislamientos seleccionados, se continuó el estudio con *Colletotrichum M7T5*, debido a las siguientes consideraciones:

-Al tratarse del género *Colletotrichum* probablemente la enzima no se inhibe con ácido acético de acuerdo a los reportes de la literatura (Tsigos y col., 2000).

-Algunos de los productos metabólicos de la invasión de *Aspergillus* son tóxicos tanto para el ser humano como para otros animales (Blumenthal, 2004).

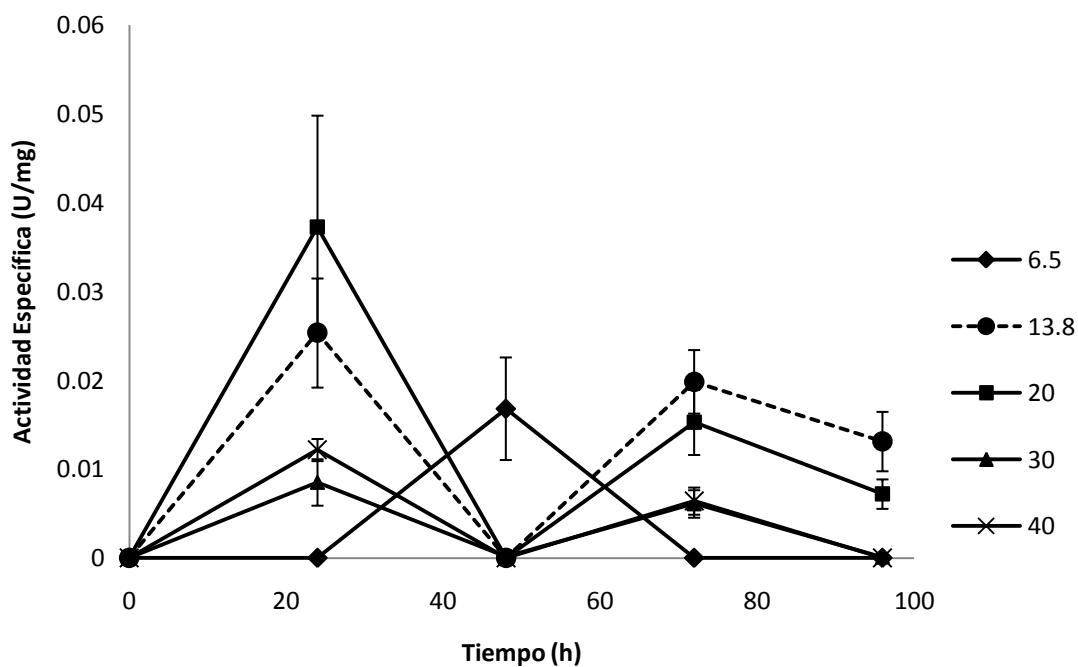
-Las quitina desacetilasas de *Colletotrichum gloeosporioides* no han sido estudiadas a diferencia de las del género *Aspergillus nidulans* (Alfonso y col., 1995).

-En este trabajo no hay diferencia significativa entre la actividad CDA producida por las cepas *Aspergillus* y la cepa *Colletotrichum gloeosporioides*.

## **7.2. Efecto de la relación C/N en el crecimiento y producción enzimática**

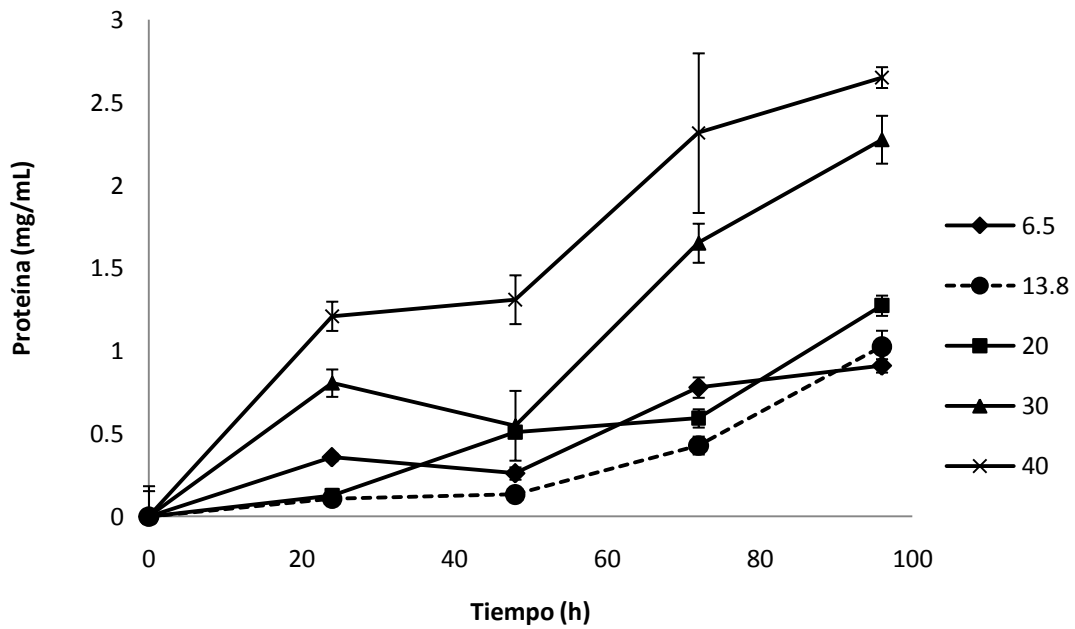
La relación C/N del medio empleado fue de 13.8, durante las cinéticas control, se observó que el crecimiento era lento, esto podía deberse a que el sistema es sólido y probablemente los nutrientes no se encuentran tan disponibles, y debido a que no se tenía la seguridad de que la actividad CDA estuviera directamente relacionada con el crecimiento de biomasa del hongo, se procedió a evaluar la actividad con diferentes relaciones C/N.

De manera general al modificar la relación C/N, lo que se varía es la cantidad de nitrógeno, debido a que en algunos estudios se observa que tiene mayor efecto que el carbono (Gao y col., 2007), sin embargo, en este estudio considerando que la unidad experimental tiene sólo 11mL de medio lo que se buscaba era una mayor disponibilidad de carbono por lo que se modificó la cantidad de glucosa.

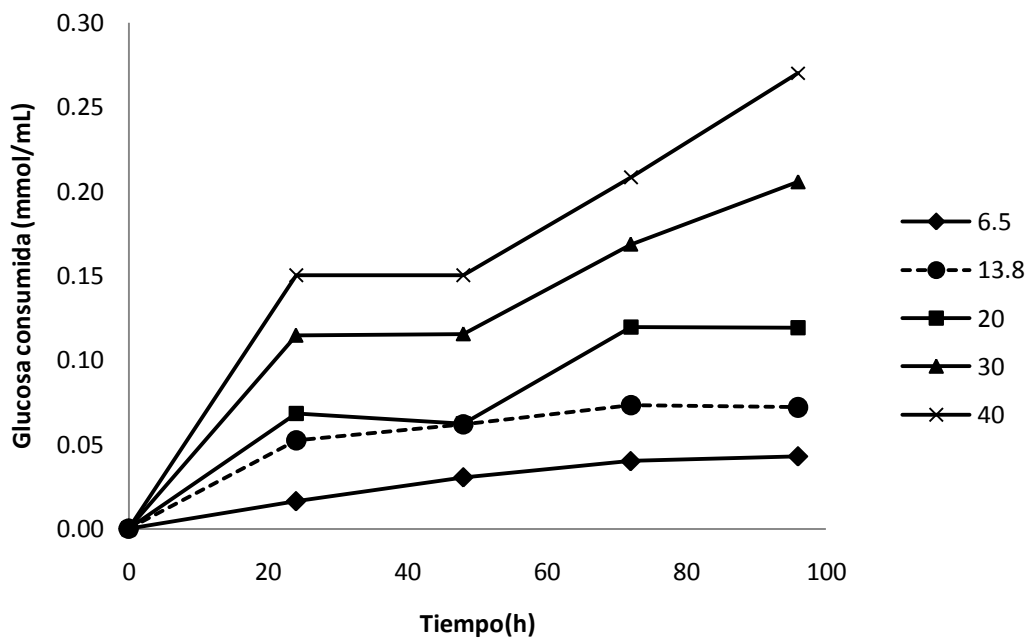


**Figura 19.** Cinéticas de actividad específica de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.

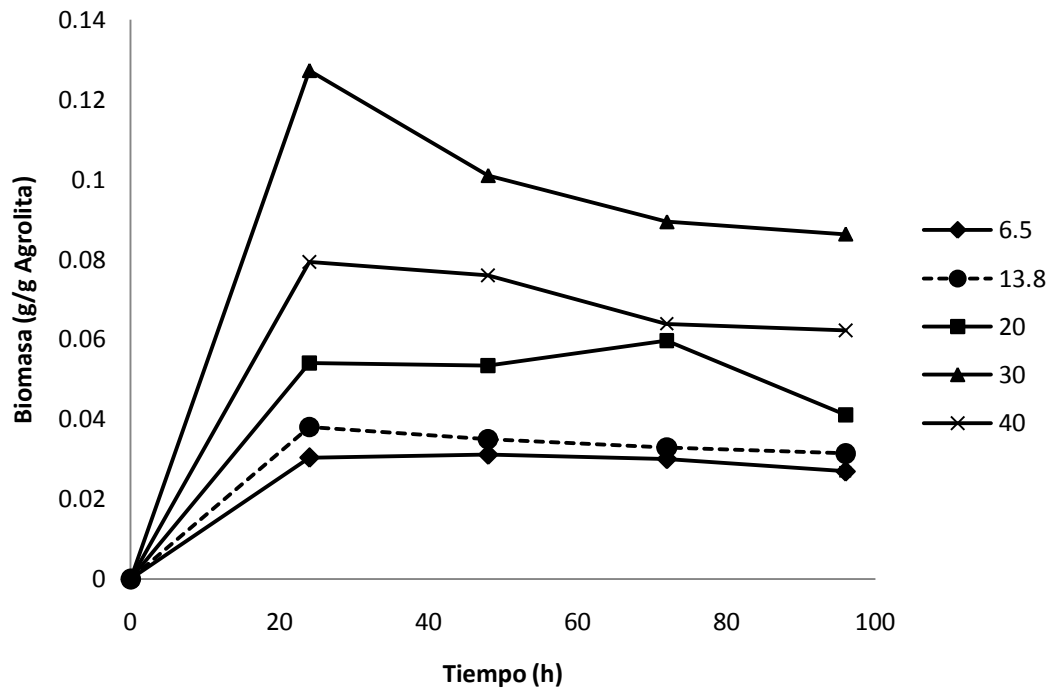
Como se observa en la Figura 19, las CDAs tienen un comportamiento muy característico con picos a las 24 y 72h, más pronunciados según disminuye la relación C/N, excepto para C/N 6.5 para la cual sólo se detecta actividad a las 48h. El consumo de glucosa y la producción de proteína incrementan según aumenta la relación C/N (Figuras 20 y 21).



**Figura 20.** Cinética de producción de proteína en extracto crudo enzimático de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.



**Figura 21.** Consumo de glucosa de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.



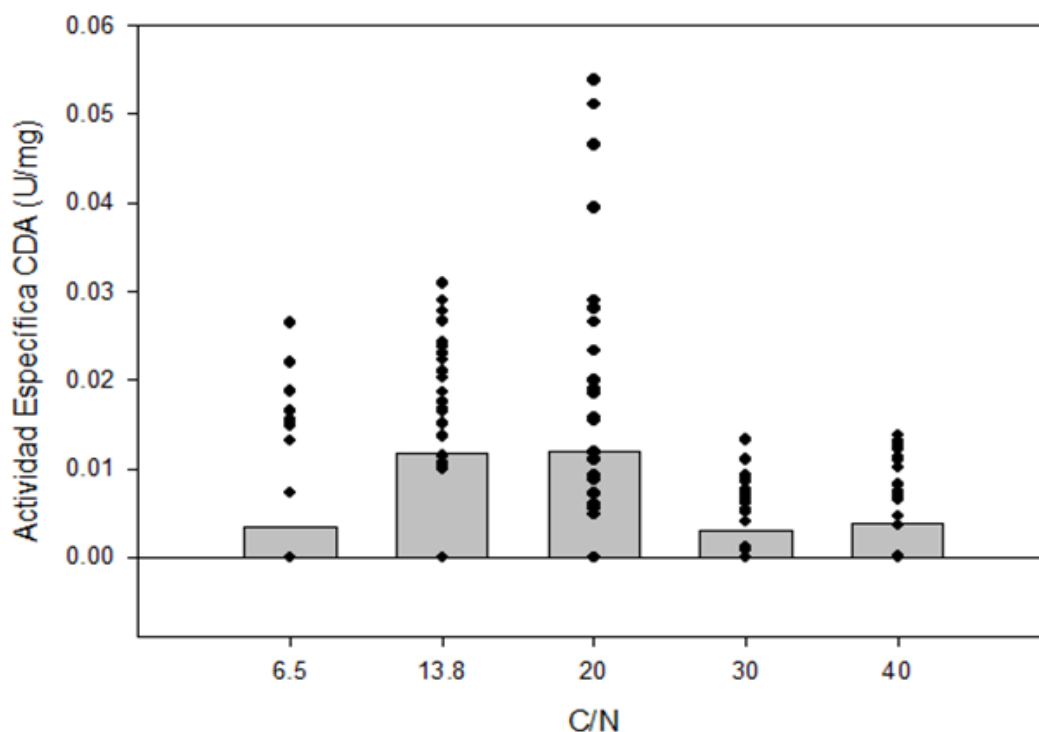
**Figura 22.** Biomasa de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes relaciones C/N.

La biomasa muestra un comportamiento usual, ya que aumenta drásticamente de 0 a 24h y posteriormente se mantiene constante o incluso disminuye, debido a que no se realizaron mediciones entre las 0 y 24h, la fase lag no se aprecia y esta etapa se observa como fase de crecimiento exponencial, con todas las relaciones C/N a las 24h el hongo ya ha alcanzado la fase estacionaria.

De manera general la biomasa aumenta según aumenta la relación C/N siendo la mejor relación para la producción de biomasa C/N 30, la actividad específica CDA no está directamente relacionada a la producción de biomasa ya que la mejor relación para la actividad específica CDA es de C/N 13.8 como se muestra en la Figura 19.

Como se observa en la Figura 19, los picos de actividad se encuentran a las 24 y 72h, se realizó un análisis de varianza, considerando de 24 a 96h y se obtuvo que no hay diferencia significativa entre las actividades específicas de C/N 13.8 y 20, entre

las C/N 30 y 40 y entre C/N 6.5 y 40, sin embargo si hay diferencia significativa entre los grupos (Anexo III), como se observa en la Figura 23.



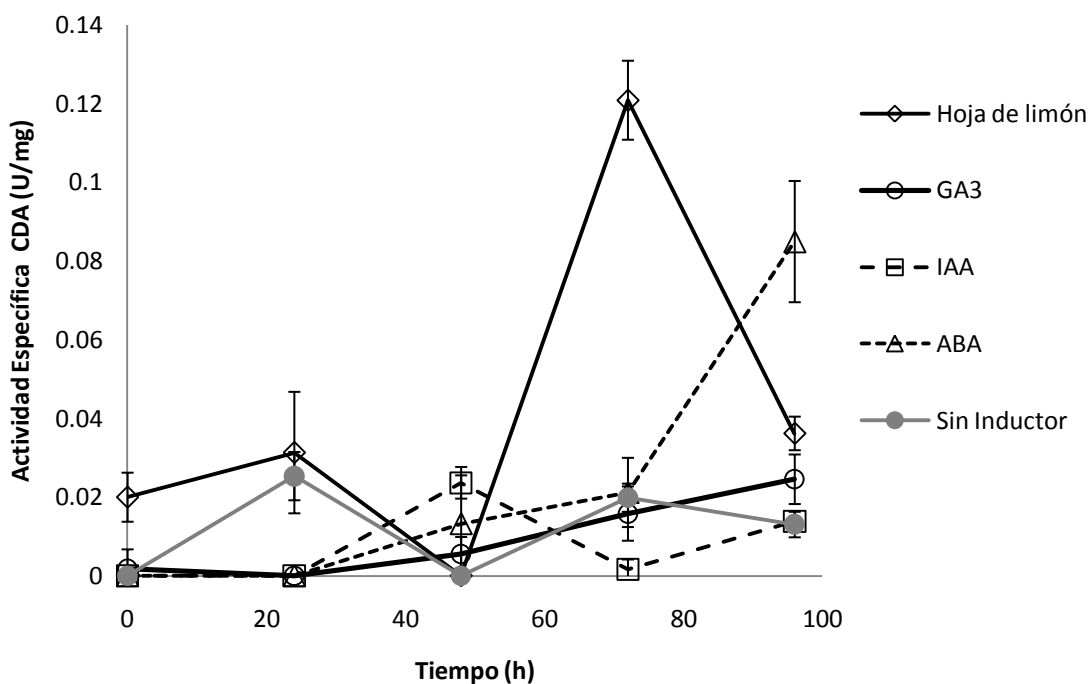
**Figura 23.** Dispersión de actividad específica CDA de *C. gloeosporioides* considerando todos los datos de cinética en cultivo sólido con medio de ácido glutámico a diferentes C/N (●), los histogramas representan la media de cada cinética (■).

Se seleccionó C/N 13.8 como la mejor para crecimiento y producción de actividad específica quitina desacetilasa.

*Colletotrichum gloeosporioides* (M7T5) a 72h de cultivo líquido con C/N 13.8 muestra una actividad CDA de  $0.398 \pm 0.099$  U/g SSI, mientras que en las mismas condiciones pero en cultivo sólido tiene actividad CDA de  $0.296 \pm 0.053$  U/g SSI, lo cual no es significativamente diferente (Anexo III).

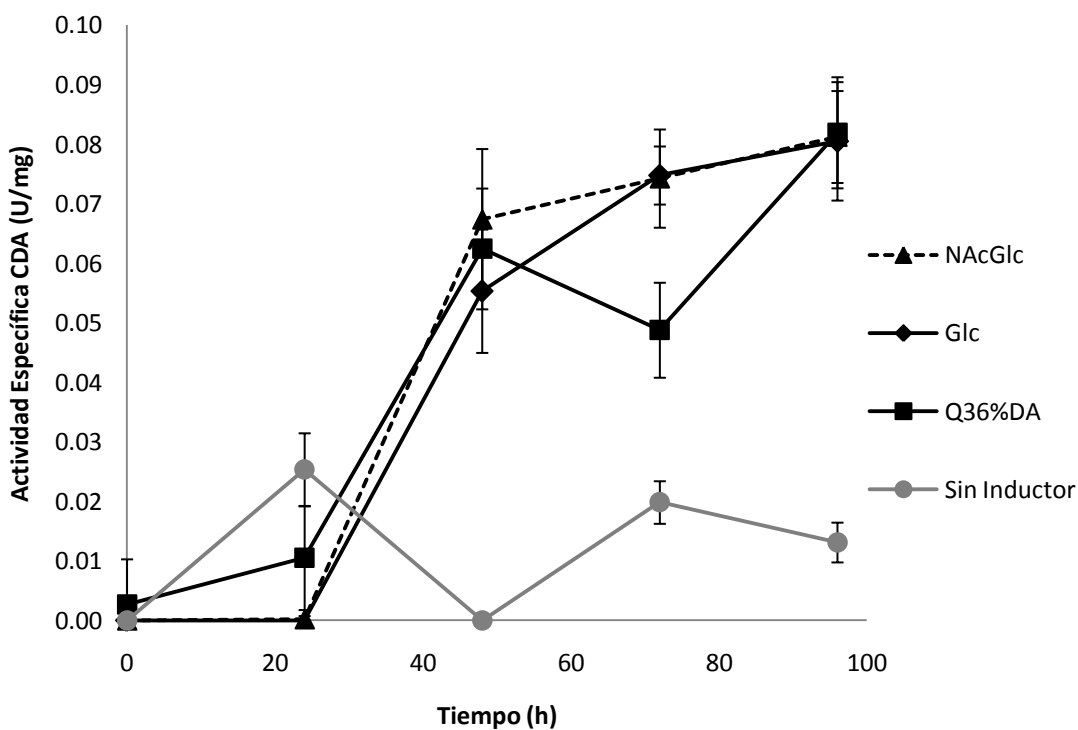
### 7.3. Efecto de inductores

Con el fin de tratar de aumentar la producción de la CDA y de acuerdo a la literatura se procedió a utilizar compuestos que probablemente tienen efecto inductor de dicha actividad, como se observa en la Figura 24, la presencia de hoja de limón incrementó la actividad CDA a las 72h, mientras que las fitohormonas no mostraron mejoras respecto al control, únicamente ABA a 96h muestra mayor actividad.



**Figura 24.** Cinética de actividades quitina desacetilasa específicas de *C. gloeosporioides* a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio de ácido glutámico en presencia de inductores.

En la Figura 25 se observa que el comportamiento durante la cinética fue muy similar entre: N-acetil glucosamina, glucosamina y quitosano. Lo anterior permite concluir que tanto el polímero como los monómeros que lo constituyen tienen igual efecto sobre la actividad CDA.



**Figura 25.** Cinética de actividades quitina desacetilasa específicas a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio de ácido glutámico en presencia de inductores.

En la Tabla 6 se muestran las actividades enzimáticas por gramo de SSI producidas por *C. gloeosporioides* en cultivo de 72h con medio ácido glutámico a C/N 13.8.

A las concentraciones probadas con NAcGlc, Glc y Q36%DA se observa actividad enzimática CDA (U/g SSI) un orden de magnitud mayor a la actividad sin inductor, todos los posibles inductores a excepción de IAA presentan diferencias significativas respecto al cultivo control sólido (Anexo III).

**Tabla 6.** Comparación de U/g SSI en condiciones control e inducidas a 72h de cultivo sólido.

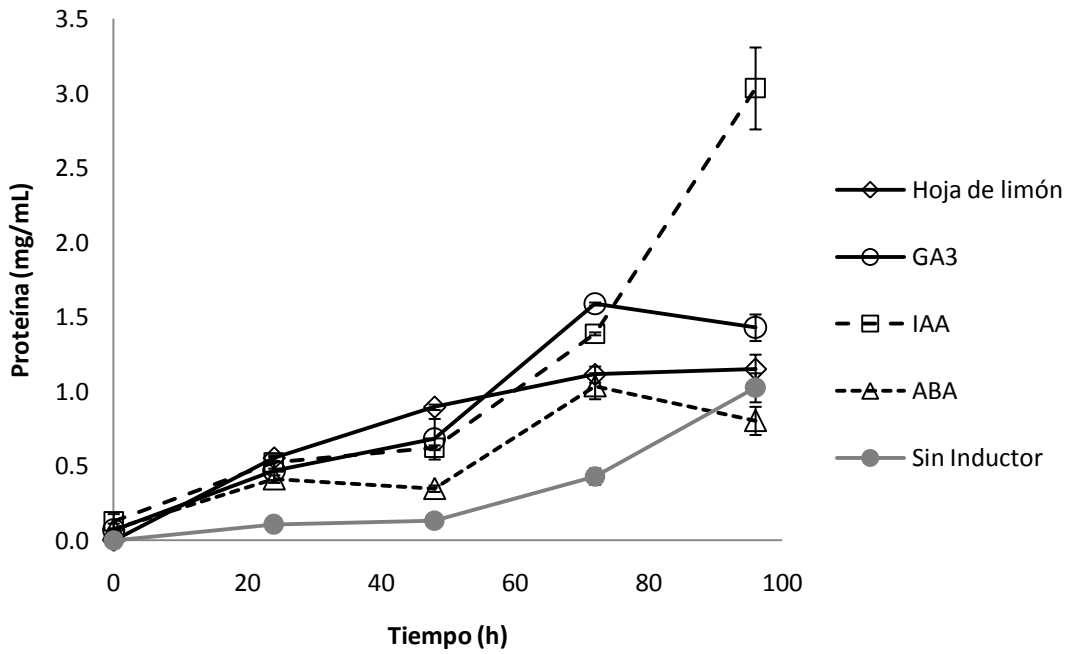
Inductor	U/g SSI
Sin Inductor	0.296 ± 0.053 <sup>d</sup>
Hoja	4.69 ± 0.160 <sup>a</sup>
NAcGlc (360 mg/L)	3.16 ± 0.323 <sup>b</sup>
Glc (768 mg/L)	3.358 ± 0.243 <sup>b</sup>
Q36%DA (1000 mg/L)	3.093 ± 0.470 <sup>b</sup>
GA <sub>3</sub> (0.23 mg/L)	0.878 ± 0.383 <sup>c</sup>
IAA (0.23 mg/L)	0.080 ± 0.120 <sup>d</sup>
ABA (0.23 mg/L)	0.768 ± 0.311 <sup>c</sup>

Valores con la misma letra no presentan diferencia significativa a  $p < 0.05$  (Tukey Kramer).

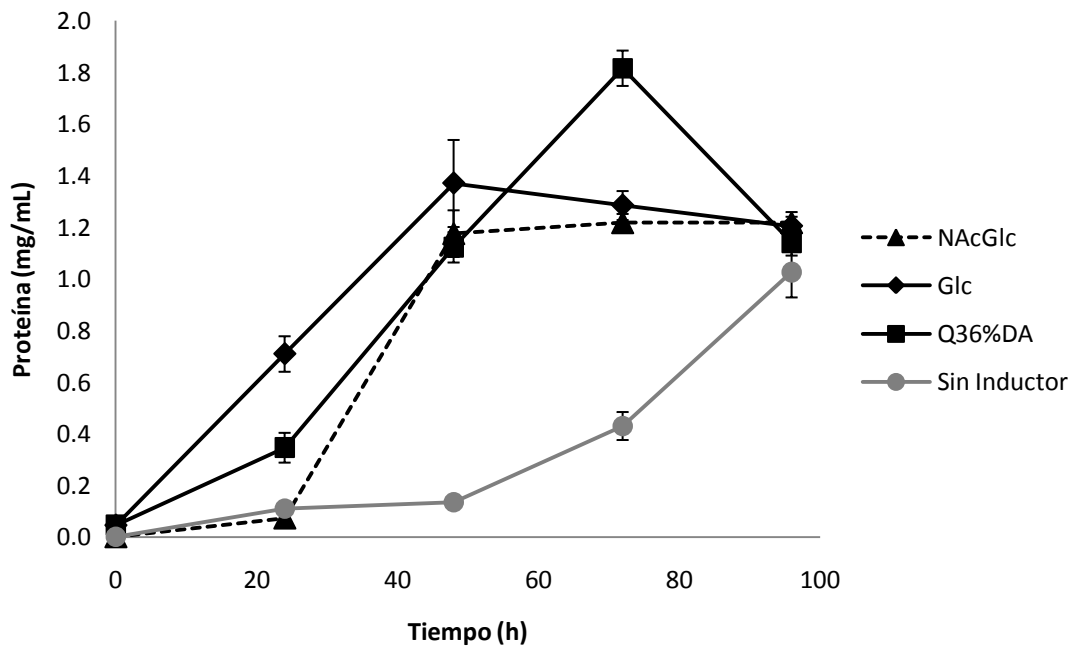
En la Figura 26, se observa que la proteína en los casos de inducción aumenta de manera sigmoideal llegando al máximo a las 72h, a excepción de IAA.

En la Figura 27, se observa que la proteína aumenta de manera sigmoideal, con máxima producción de 48 a 96h en los casos de NAcGlc y Glc y con máximo a las 72h con Q36%DA.





**Figura 26.** Cinéticas de producción de proteína en extractos enzimáticos de cultivo sólido de *C. gloeosporioides* a C/N 13.8 con medio ácido glutámico en presencia de inductores.



**Figura 27.** Cinéticas de producción de proteína en extractos enzimáticos de cultivo sólido de *C. gloeosporioides* a C/N 13.8 con medio ácido glutámico en presencia de inductores.

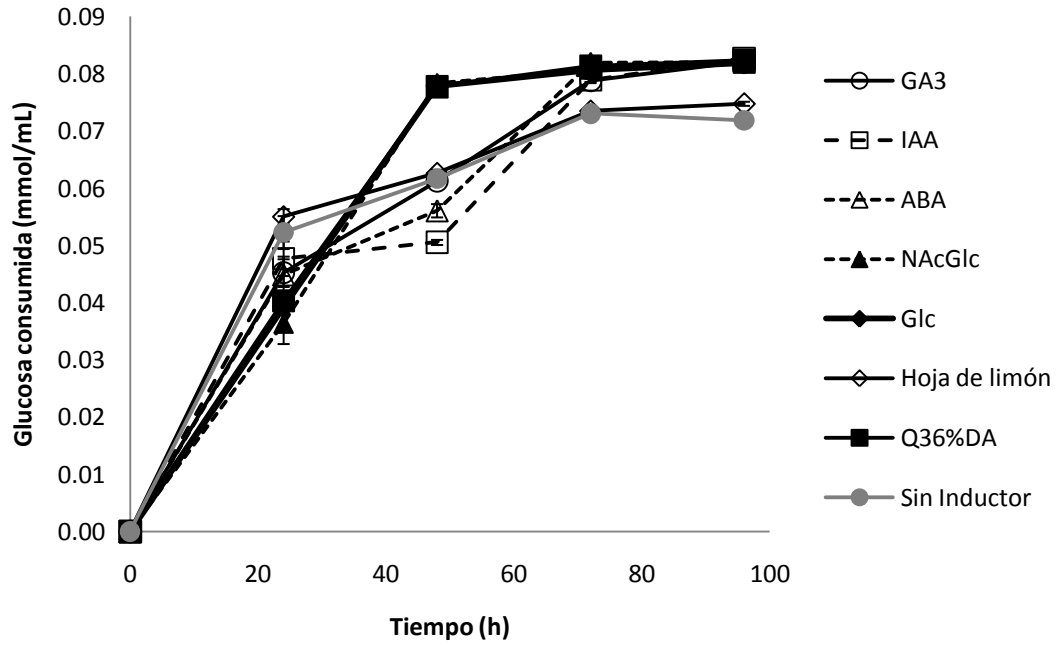
En presencia de carboximetil quitosano, quitosano (3g/L) o polietilenimina (0.5g/L), El Ghaouth y colaboradores (1992) determinaron actividad CDA mediante zimogramas, en esta investigación obtienen una banda de CDA de aproximadamente 40 kDa incrementa su intensidad, y únicamente en presencia de quitosano se intensifican bandas de 110 kDa y 33kDa, mientras que en presencia de glucosamina no se observa inducción, este incremento se atribuye a la naturaleza policatiónica de estos polímeros. En dicho trabajo la concentración de quitosano utilizada podría inhibir el crecimiento del hongo (Muñoz y col., 2009; Tajdini y col., 2010; Tayel y col., 2010), por otra parte se basa únicamente en la intensidad de las bandas en geles y no cuantifican la actividad enzimática.

En este trabajo en presencia de quitosano y glucosamina a una concentración de 1g/L, el hongo *C. gloeosporioides* mostró una inducción de CDA de las 48 a las 96h.

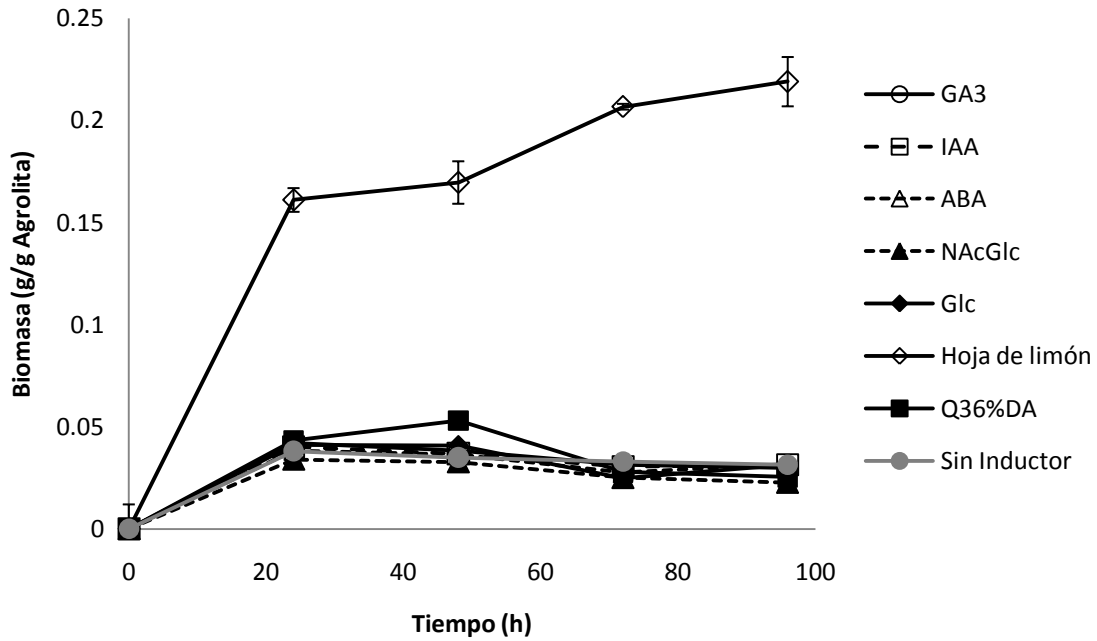
En las Figuras 28 y 29, se observa que el comportamiento de consumo de sustrato y el incremento de biomasa, son muy similares en presencia y ausencia de inductores.

La presencia de hoja de limón incrementa más de tres veces la biomasa producida, esto puede deberse a que la hoja le proporciona nutrientes adicionales al hongo.

La biomasa aumenta drásticamente durante las primeras 24h y posteriormente se mantiene constante o incluso disminuye, al igual que en la selección de relación C/N (Figura 22) esto puede deberse a que aproximadamente a las 24h el hongo entra a la fase estacionaria y entre las 48 y 72h comienza a observarse un decremento lo cual puede ser el comienzo de la fase de muerte.



**Figura 28.** Consumo de sustrato de *C. gloeosporioides* a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio ácido glutámico en presencia de inductores.

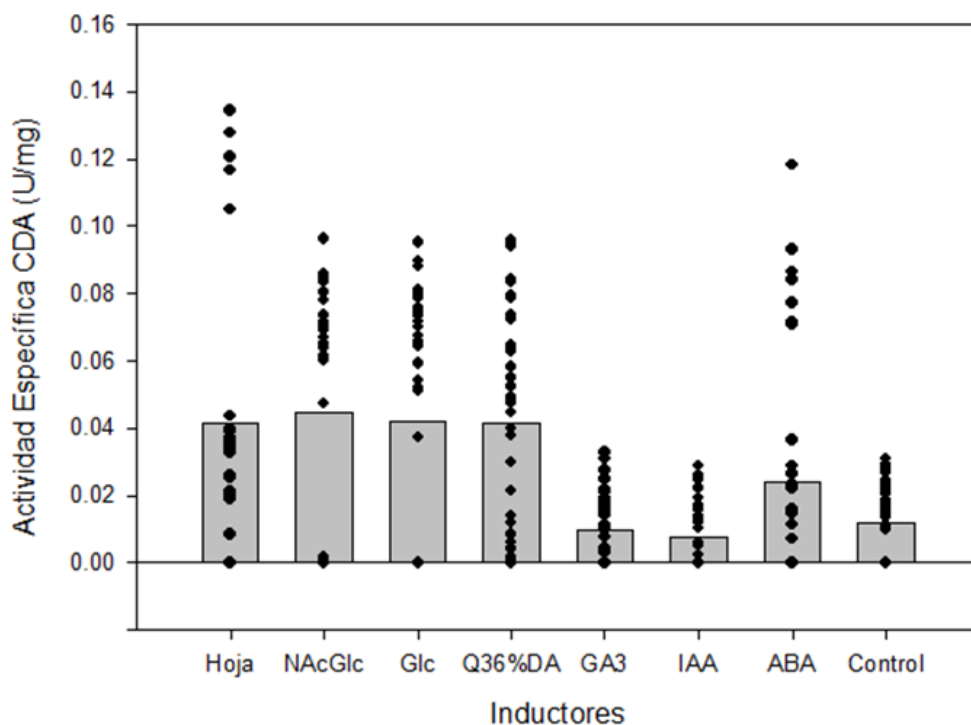


**Figura 29.** Biomasa fúngica de *C. gloeosporioides* producida a C/N 13.8 en cultivo sólido con medio ácido glutámico en presencia de inductores.

Se realizó ANOVA, considerando las actividades específicas CDA de las 24 a 96h de cultivo (Anexo III).

Se encontró que la actividad con GA<sub>3</sub> e IAA no es significativamente diferente al control sin inductor, con ABA hay inducción respecto al control sin embargo ésta es diferente y menor a la inducción producida en presencia de Hoja de limón, NAcGlc, Glc y Q36%DA, entre las cuales no hay diferencia significativa.

El comportamiento anterior se observa en la Figura 30 donde se muestra la dispersión de los datos de cada cinética y los histogramas de las medias de actividad específica CDA.



**Figura 30.** Dispersión de actividad específica CDA de *C. gloeosporioides* considerando todos los datos de cinética en cultivo sólido con medio ácido glutámico en presencia y ausencia de inductores (●), los histogramas representan la media de cada cinética (■).

En cultivo sólido hubo inducción de actividad CDA con NAcGlc, Glc y Q36%DA, el primero es un producto de alto precio y por ello ha sido descontinuado, debido a que el efecto fue el mismo, no resulta de interés continuar utilizándolo, sin embargo la glucosamina y quitosano son productos obtenidos a partir del desecho de camarón, por lo cual sería interesante probar ambos inductores a diferentes concentraciones y en cultivo líquido con fines comparativos.

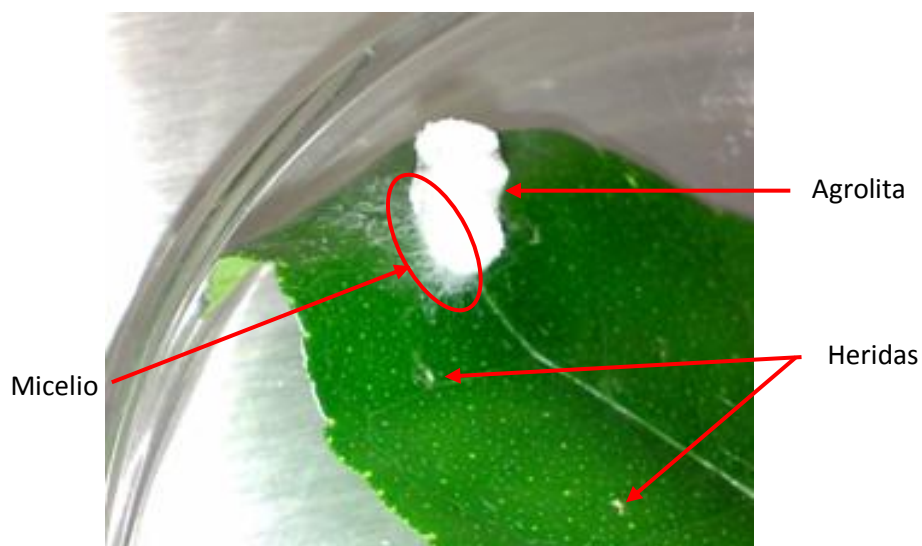
Las hormonas vegetales no mostraron inducción de actividad específica CDA respecto al control (Anexo III), esto puede deberse a que fueron probadas en concentraciones muy bajas, para poder comparar el efecto de los inductores es necesario tener las mismas condiciones, por lo cual más adelante se realizaron experimentos probando el efecto de diferentes concentraciones de inductores.

La actividad CDA con NAcGlc, Glc y Q36%DA, es estable durante 48h, lo cual resulta ventajoso en comparación con la hoja de limón que presenta un único tiempo de actividad, aunado a esto la hoja de limón se agregó al sistema como una unidad y no como una concentración, por lo cual se descarta como inductor para los siguientes experimentos, sin embargo, si se observó una inducción por parte de la hoja a 72h de cultivo y en esta etapa del trabajo se realizaron algunas micrografías del crecimiento del hongo en la hoja de limón, lo cual resulta de interés para continuar con estudios sobre la patogénesis de este hongo para su posible biocontrol.

#### 7.4. Crecimiento de *Colletotrichum* en hoja de limón (*Citrus limon*)

Se realizó un cultivo control del hongo sobre hoja de limón, el hongo fue inoculado directamente sobre la hoja en las heridas por presión y en el haz intacto en un sistema como el mostrado en la Figura 5 pero sin la cama de agrolita con medio de cultivo, para determinar si el hongo invadía la hoja en condiciones *in vitro*, se observó que es necesario herir la hoja para que el fitopatógeno se desarrolle en ausencia de un medio de cultivo o nutrientes exógenos.

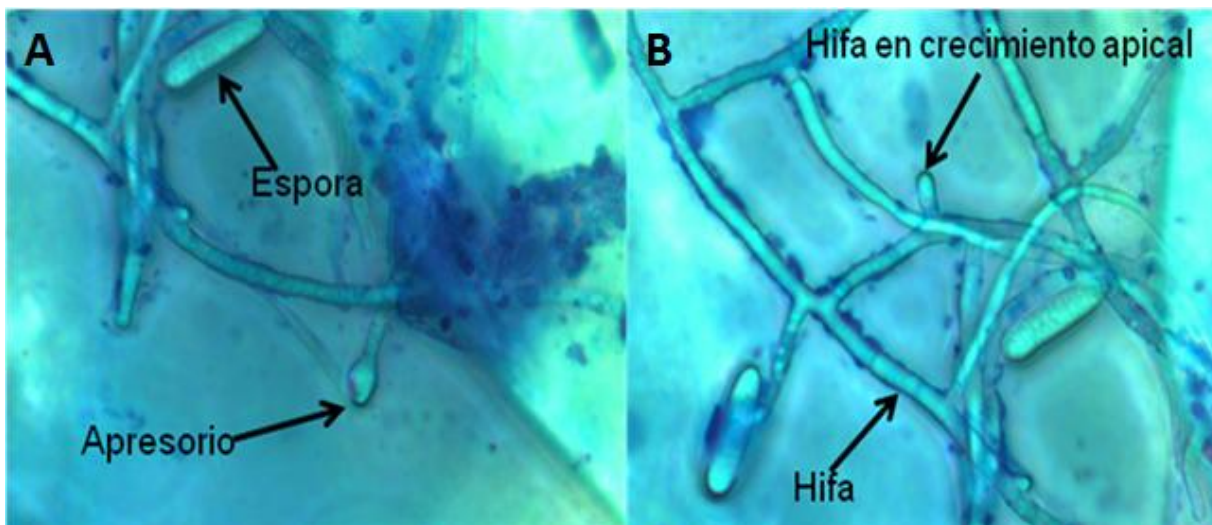
En los experimentos en cultivo sólido se observó que el hongo invadió zonas de la hoja sin heridas, esto se puede deber a que en estos experimentos el hongo fue inoculado en el medio de cultivo en la agrolita en contacto con la hoja de limón, lo cual permitió el desarrollo del hongo inicialmente sobre la agrolita y el sistema se mantuvo a temperatura de  $25.82 \pm 1.13$  °C, actividad de agua de  $0.995 \pm 0.005$  y humedad de  $79 \pm 3.44\%$  lo cual promovió la infección del hongo hacia la hoja (Figura 31) lo anterior se apoya en que se ha reportado que un factor determinante para la invasión del hongo a su hospedero es la humedad, que debe ser cercana a 100% (Binyamini y Schiffmann-Nadel, 1971).



**Figura 31.** *C. gloeosporioides* creciendo en agrolita-hoja a 72 h de cultivo sólido con medio ácido glutámico a C/N 13.8.

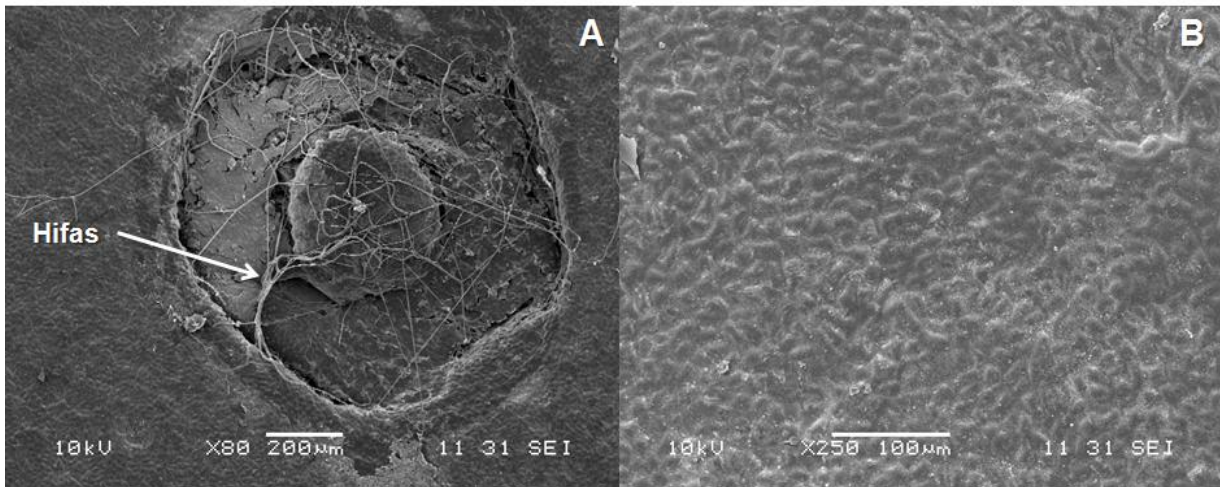
### 7.5. Microscopía Óptica y Electrónica

Se realizaron observaciones de las heridas al microscopio, verificando la invasión del hongo a las heridas, como se muestra en la Figura 32.

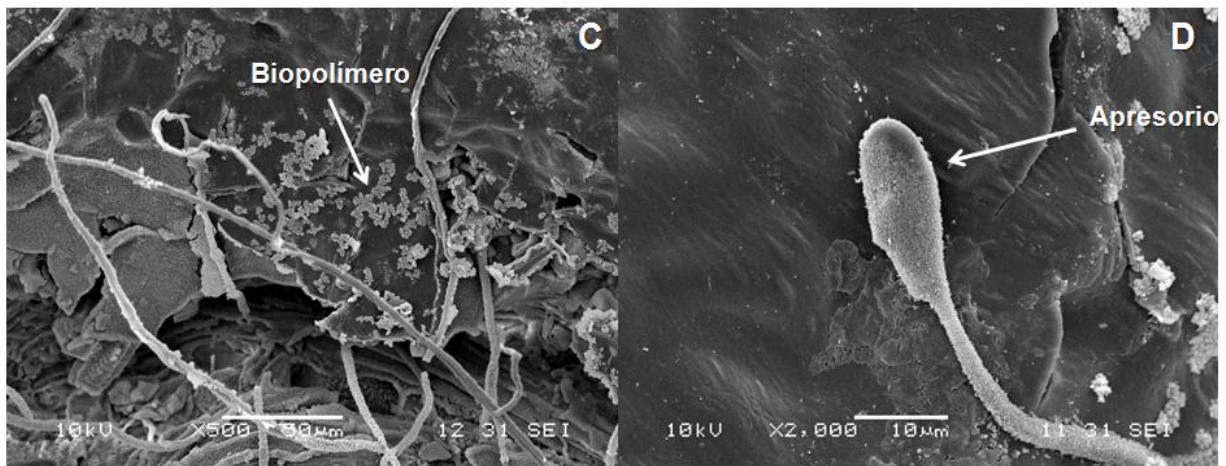


**Figura 32.** Desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* en heridas de hoja de limón a 72h de cultivo sólido con medio ácido glutámico, tinción con azul de metileno y observado a 100X: (A) Apresorio, hifas y esporas y (B) Esporas e hifas.

Se realizaron observaciones con microscopio electrónico de barrido, de heridas y zonas en las que ocurrió lo que se observa en la Figura 31, en donde el hongo creció simultáneamente en la hoja y agrolita, las micrografías obtenidas se muestran en las Figuras 33, 34, 35 y 36.



**Figura 33.** Micrografías electrónicas de barrido de hoja de limón a 72h de cultivo en contacto con agrolita inoculada con *C. gloeosporioides* en medio ácido glutámico: (A) Herida por presión y (B) Limbo sin herida.



**Figura 34.** Micrografías electrónicas de barrido de hoja de limón a 72h de incubación en contacto con agrolita inoculada con *C. gloeosporioides* en medio ácido glutámico: (C) Crecimiento de hifas en herida y (D) Apresorio con biopolímero.

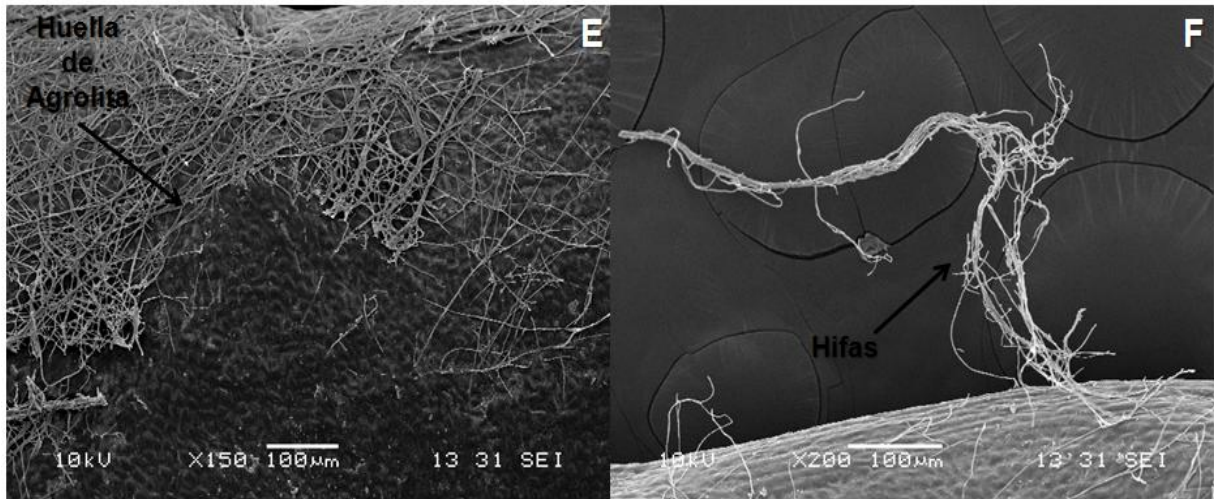


El estudio del desarrollo de estructuras de infección resulta de interés debido a que se ha reportado que en hojas de pepino inoculadas con suspensión de esporas de *C. lagenarium* hubo un aumento de actividad CDA a 24h de cultivo, cuando las esporas han germinado y las hifas jóvenes crecen en la superficie de la hoja para formar apresorios. Durante los siguientes dos días, en los cuales hay penetración y formación de hifas intracelulares primarias, la actividad CDA se mantuvo estática e incluso disminuyó ligeramente. Sin embargo hay un notable aumento en la actividad posteriormente, en paralelo con el desarrollo de la lesión, un período en el que las hifas secundarias se propagan de una célula a otra y a través del tejido. La máxima actividad CDA se da durante las etapas iniciales de la infección, durante la formación de apresorios y aumenta con lesiones. Lo anterior sugiere que la CDA es formada cuando el hongo (*C. lagenarium*) establece contacto íntimo con la planta hospedera que contiene quitinasas constitutivas en el apoplasto (Siegrist y Kauss, 1990).

Por otra parte Deising y Siegrist (1995) reportan que el hongo de la roya de haba (*Uromyces viciae-fabae*) presentó CDAs con pesos moleculares diferentes, cuyas bandas aparecen en zimogramas de extractos de material extracelular aislado de estructuras bien diferenciadas y no en tubos germinales, adjudican la producción de esta enzima a la diferenciación de estructuras de infección, proponen que estructuras que crecen sobre la hoja como hifas y apresorios tienen mayor cantidad de quitina que las estructuras que se desarrollan en el espacio intercelular como los haustorios.

En las micrografías del hongo sobre la hoja y agrolita (Figuras 35 y 36) observamos hifas y apresorios a 72h de cultivo, justamente a este tiempo es que se da la inducción de actividad CDA en presencia de la hoja, lo anterior permite pensar que aunque no se observan estructuras que se desarrollan en el espacio intercelular, la enzima es producida también en la etapa en la que el hongo forma apresorios y comienza a desarrollarse sobre su hospedero, esto se apoya en el trabajo de Howard y colaboradores (1991) donde demuestran bioconversión de quitina a quitosano del apresorio de *M. grisea*. Se ha reportado que *M. grisea* y *C. gloeosporioides*

comparten modos de vida y estrategias de infección, particularmente durante el estado de patogénesis temprana (Nesher y col., 2008).



**Figura 35.** Micrográficas electrónicas de barrido de hoja de limón a 72h de incubación en contacto con agrolita inoculada con *C. gloeosporioides* en medio ácido glutámico: (E) Huella de agrolita sobre hoja y (F) Hifas enlace agrolita-hoja.



**Figura 36.** Micrográficas electrónicas de barrido de agrolita con crecimiento de *C. gloeosporioides* a 72h de incubación en contacto con hoja de limón: (G) Hongo creciendo en agrolita y (H) Hifas, esporas y apresorio sobre agrolita.

Como se observa en la Figura 36G *C. gloeosporioides* crece de manera envolvente sobre la agrolita, en la Figura 36H se observa un apresorio sobre agrolita esto puede deberse a dos aspectos, en primera instancia Collins y colaboradores (1997)

proponen que los apresorios pueden ser inducidos *in vitro* por señales topográficas, Rawling y colaboradores (2007) sustentan que el contacto de la espora con superficies fuertes es importante para la germinación y formación de apresorios, por otra parte Deising y colaboradores (2000) proponen que la percepción de sencillas señales químicas presentes en la superficie de la planta tal vez son suficiente para detonar la expresión de un arreglo de genes requeridos para la formación e apresorio, hay transducción de señales a través del plasmalema, que inducen diferenciación y desarrollo patogénico.

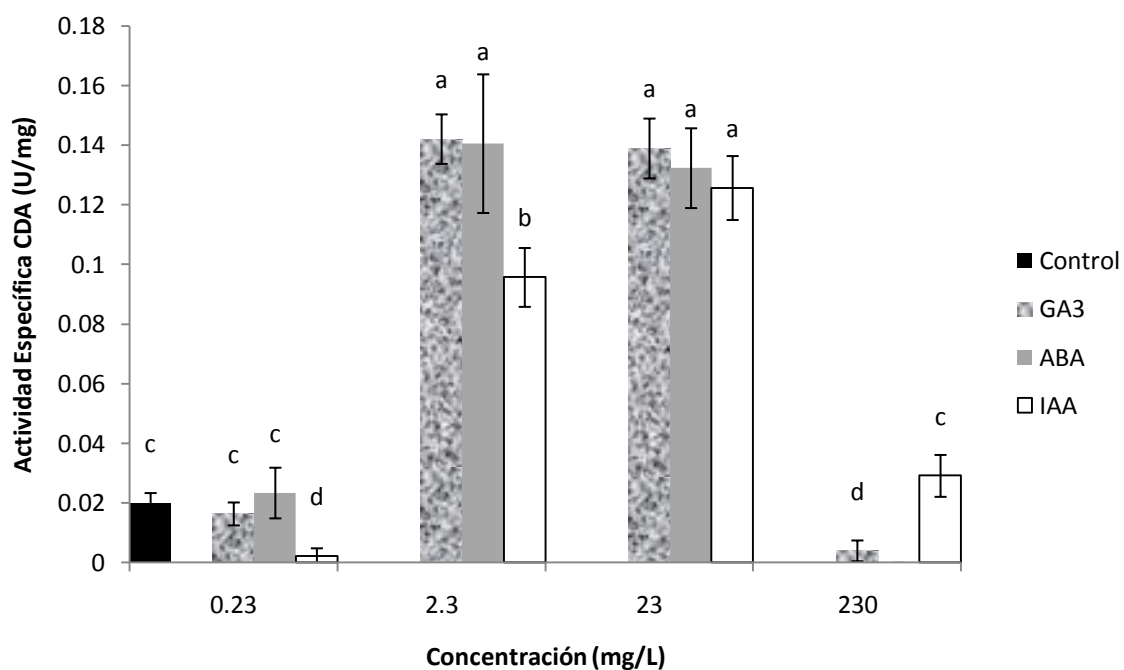
### **7.6. Efecto de la concentración de inductores**

Para esta etapa experimental se descartó NAcGlc por su alto costo y no se incluyó la hoja debido a que esta no fue adicionada al medio en una concentración sino que se agregó al sistema (Figura 5).

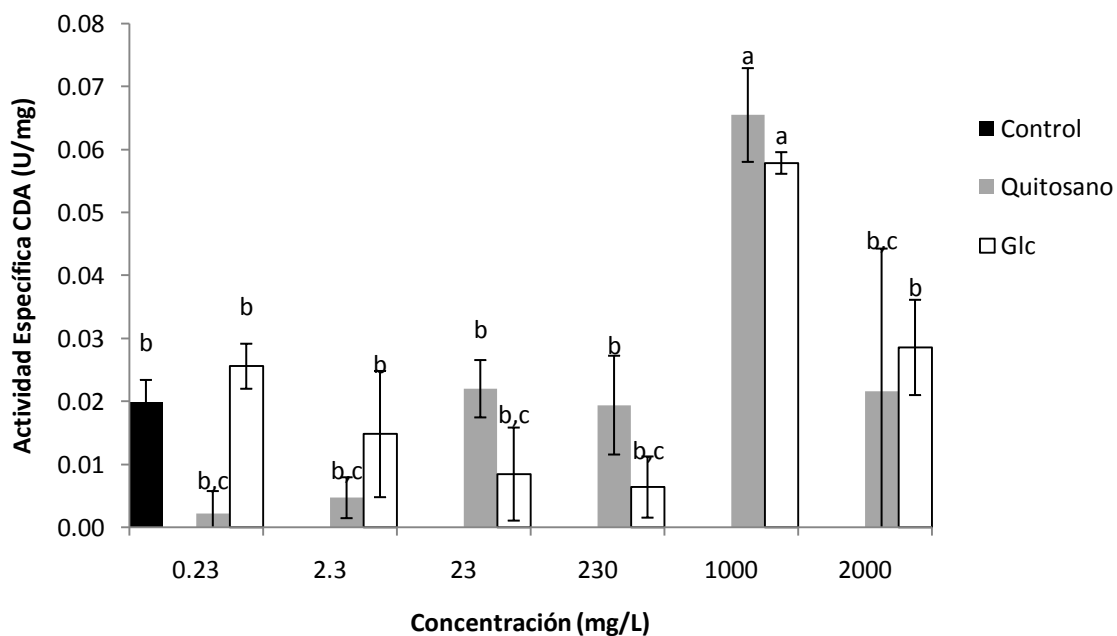
Se fijó 72h como tiempo de cultivo debido a las siguientes consideraciones:

- En cultivos control se observa pico de actividad a este tiempo.
- De los cinco inductores que mostraron un efecto positivo, cuatro muestran inducción a las 72h.
- El Ghaouth y colaboradores (1992) estudian efecto de quitosano en CDA a 72h de cultivo.
- Chatterjee y colaboradores (2008) trabajan con hormonas vegetales y las relacionan con el incremento de quitosano fúngico en cultivo de 72h.

En las Figuras 37 y 38 se muestra el efecto de la concentración de los diferentes inductores a 72h de cultivo.



**Figura 37.** Actividad específica CDA de *C. gloeosporioides* a 72h de cultivo sólido con medio ácido glutámico con diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub>, ABA e IAA.



**Figura 38.** Actividad específica CDA de *C. gloeosporioides* a 72h de cultivo sólido con medio ácido glutámico con diferentes concentraciones de Glc y Q36%DA.

Se realizó MANOVA con  $\alpha = 0.05$  en el programa NCSS 7.1.14., considerando las actividades específicas CDA de cultivo sólido de 72h en presencia de inductores a diferentes concentraciones, en el análisis se concluye que la concentración es una variable significativa y la mejor interacción (Inductor-Concentración) es ABA-23mg/L, sin embargo no hay diferencia significativa con ABA-2.3mg/L, GA<sub>3</sub>-2.3mg/L y GA<sub>3</sub>-23mg/L (Anexo III).

En la Tabla 7 se muestran las actividades enzimáticas en U/ g SSI producidas por *C. gloeosporioides* a 72h de cultivo control líquido y sólido y en presencia de GA<sub>3</sub> y ABA a diferentes concentraciones.

**Tabla 7.** Comparativa de U/g SSI producidas por *C. gloeosporioides* sin inductores y a diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub> y ABA.

Cultivo	Inductor	Concentración (mg/L)	U/g SSI
Líquido	Sin inductor	-----	0.398 ± 0.099 <sup>c,d</sup>
Sólido	Sin Inductor	-----	0.296 ± 0.053 <sup>d</sup>
Sólido	GA <sub>3</sub>	0.23	0.878 ± 0.383 <sup>c</sup>
Sólido	ABA	0.23	0.768 ± 0.311 <sup>c</sup>
Sólido	GA <sub>3</sub>	2.3	5.091 ± 0.268 <sup>a</sup>
Sólido	ABA	2.3	4.102 ± 0.734 <sup>a</sup>
Sólido	GA <sub>3</sub>	23	2.624 ± 0.231 <sup>b</sup>
Sólido	ABA	23	4.731 ± 0.462 <sup>a</sup>

Valores con la misma letra no presentan diferencia significativa a  $p < 0.05$  (Tukey Kramer).

Como se observa en la Tabla 7, la actividad CDA aumenta hasta 500% con 2.3mg/L de GA<sub>3</sub> y hasta 600% con 23 mg/L de ABA, respecto a 0.23mg/L de estas fitohormonas, esto permite concluir que la concentración probada inicialmente para las fitohormonas no era suficiente para observar inducción, es por ello que en la Figura 24 no se aprecia actividad quitina desacetilasa.

Se ha reportado la producción de CDAs de *C. lindemuthianum* en cultivo sólido, empleando como soporte salvado de trigo y como inductor 1%(p/p) de quitosano 85% desacetilado, a 96h de cultivo obtienen el máximo rendimiento (460.4±14.7 U/g SSI), de igual forma utilizaron partículas de cefalotórax de camarón como soporte sin inductor, obteniendo como máximo 392.0±6.4 U/g SSI a las 192h de cultivo, en el presente trabajo con 1g/L de quitosano 64% desacetilado como inductor a las 72h de cultivo *C. gloeosporioides* tiene un rendimiento de 1.296 ± 0.030 U/g SSI y con 0.023g/L de ABA a las 72h se obtiene un rendimiento de 4.731 ± 0.462 U/g SSI lo cual es tres órdenes de magnitud menor a lo obtenido por Suresh y colaboradores en 2011, esto puede deberse a que el cefalotórax de camarón y el salvado de trigo actúan como soportes sustratos.

En la Tabla 8 se comparan las actividades específicas CDA reportadas en la literatura y las obtenidas en el presente trabajo con *C. gloeosporioides*.

**Tabla 8.** Comparación actividad CDA específica.

Microorganismo	Cultivo	Tiempo de cultivo (h)	Inductor	Concentración (mg/L)	Actividad CDA Específica (U/mg)	Referencia
<i>Rhizopus oryzae</i>	Líquido	72	GA <sub>3</sub>	0.1	0.0475 ± 0.005	Chatterjee y col., 2008.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Líquido	72	IAA	3	0.0452 ± 0.006	Chatterjee y col., 2008.
<i>Rhizopus nigricans</i>	Líquido	18	----	----	1.9	Jeraj y col., 2006.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Sólido	72	GA <sub>3</sub>	23	0.1389 ± 0.01	Este trabajo
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Sólido	72	IAA	23	0.1256 ± 0.01	Este trabajo
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Sólido	72	ABA	23	0.132 ± 0.013	Este trabajo
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Líquido	72	----	----	0.019 ± 0.003	Este trabajo
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Líquido	72	----	----	0.002	Tsigos y col., 1995.
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Líquido	432	----	----	0.0195	Tokuyasu y col., 1997.
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Líquido	96	quitina	800	0.035	Cai y col., 2006.

Como se observa en la Tabla 8, la actividad específica CDA producida por *C. gloeosporioides* sin inductor a 72h es un orden de magnitud mayor que la obtenida por *C. lindemuthianum* en las mismas condiciones de cultivo y es igual a la obtenida antes de comenzar el tren de purificación después de 432h de cultivo, esto es congruente con lo obtenido en el presente trabajo donde la actividad CDA en líquido y sólido es igual.

En la literatura la adición de estas fitohormonas relacionada al incremento de quitosano y de actividad CDA sólo ha sido probadas en el fitopatógeno *Rhizopus oryzae*, la actividad específica CDA de *Rhizopus oryzae* en presencia de GA<sub>3</sub> e IAA en cultivo líquido es casi 300% menor que la obtenida por *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con 23mg/L de estas fitohormonas, esto se puede deber a la diferencia de sistema de cultivo y a que la concentración probada (23mg/L) es 230 y 8 veces mayor a las concentraciones propuestas como óptimas de GA<sub>3</sub> e IAA respectivamente por Chatterjee y colaboradores (2008).

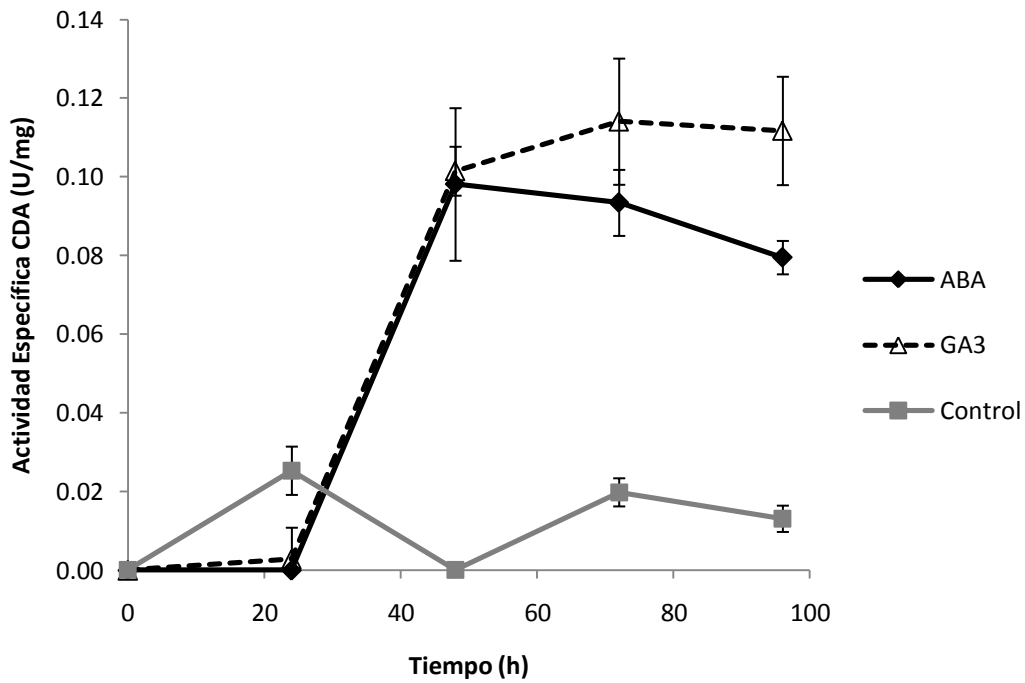
El fitopatógeno *Rhizopus nigricans* a 18h de cultivo sin inductor produce casi 15 veces la actividad producida por *C. gloeosporioides* a 72h de cultivo en presencia de fitohormona.

#### **7.6.1. Actividad CDA de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con condiciones de inducción seleccionadas**

Se sabe que el GA<sub>3</sub> puede ser inactivado irreversiblemente por hidroxilación del carbono 2 del anillo aromático y reversiblemente por conjugación con glucosa, de igual forma el IAA puede ser inactivado por foto-oxidación, por oxidación enzimática o formando enlaces con glucosa, proteínas o amino ácidos, a diferencia de ABA que puede reaccionar con glucosa formando un éster que tiene actividad similar, lo cual representa una desventaja para las fitohormonas GA<sub>3</sub> e IAA (Sinha R. K., 2004).

Para observar si la actividad CDA disminuía debido a la inactivación de GA<sub>3</sub> en presencia de glucosa, se realizaron cinéticas de actividad CDA específica con GA<sub>3</sub> y ABA, esto se muestra en la siguiente figura.



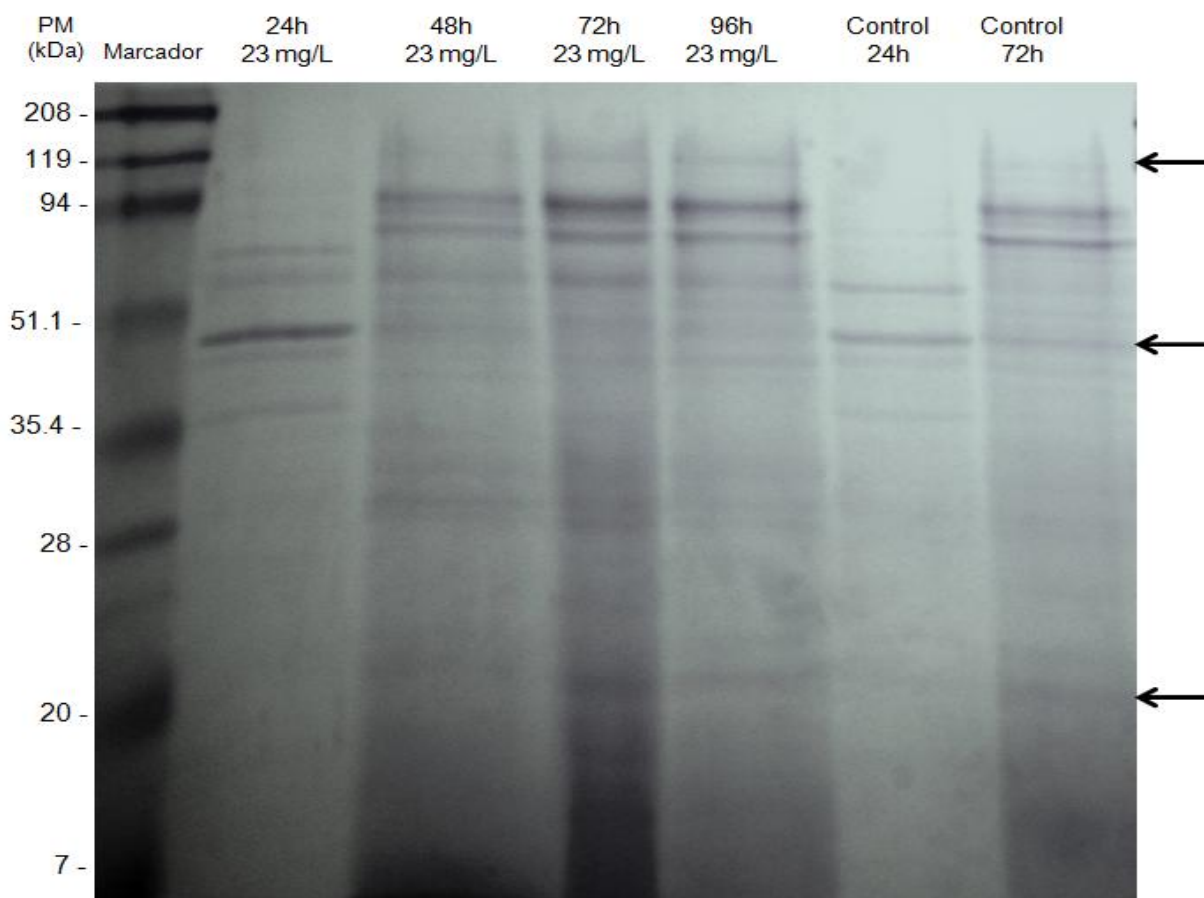


**Figura 39.** Actividad Específica CDA de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de ABA y GA<sub>3</sub>.

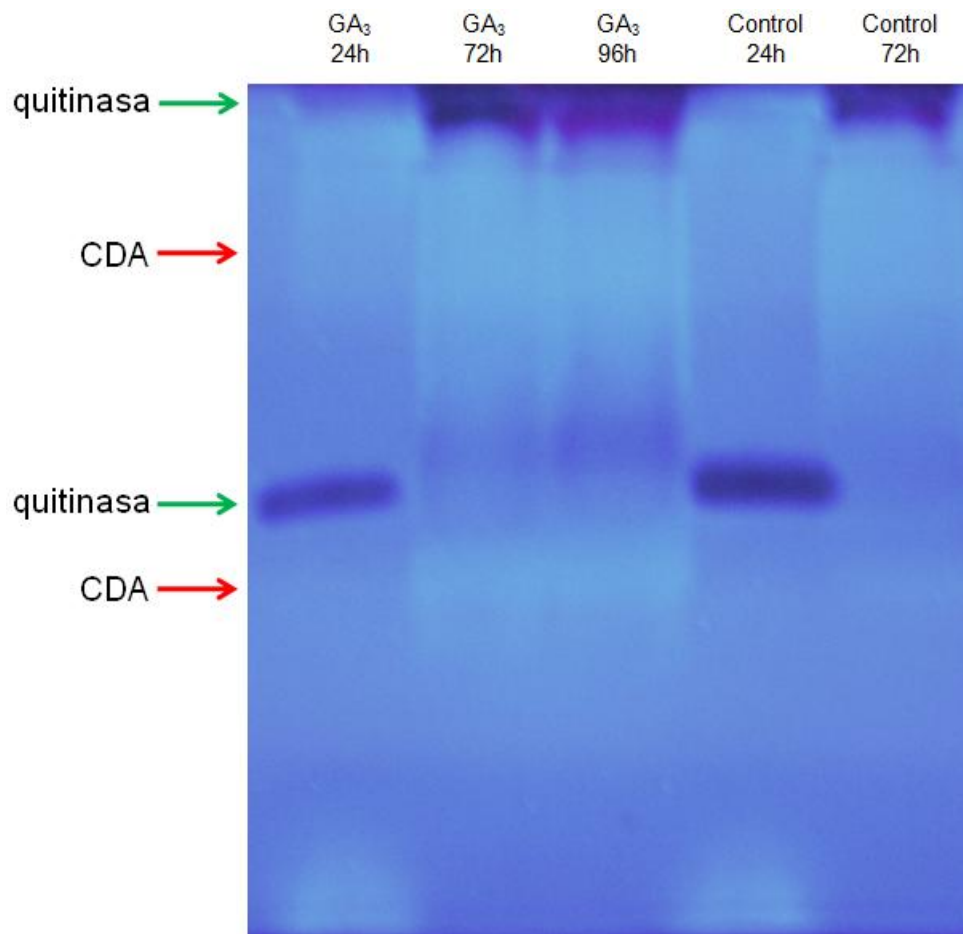
Como se observa en la Figura 39, hay una clara inducción a partir de las 48h por ambas fitohormonas. La actividad específica a las 72h no es igual a la determinada en el experimento anterior (Figura 37), sin embargo siguen siendo los mejores inductores.

### 7.7. SDS-PAGE y Zimogramas de Actividad CDA

En el gel SDS-PAGE (Figura 40) en los carriles de extractos inducidos de 48, 72 y 96h se observan bandas de aproximadamente 150kDa y 23kDa que en los carriles de extractos control e inducido de 24h (extractos con baja o nula actividad CDA) no se distinguen. Por otra parte en el zimograma (Figura 41) en todos los carriles hay una banda opaca que en el caso de los extractos de 24h corrió y en los otros se quedó en la parte superior de gel, esta banda puede ser la misma que se observa en el gel en condiciones desnaturalizantes ( $\approx 50$ kDa), sabiendo que el sustrato del zimograma es etilen glicol quitina se puede pensar que se trata de una quitinasa (Trudel y Asselin, 1989).



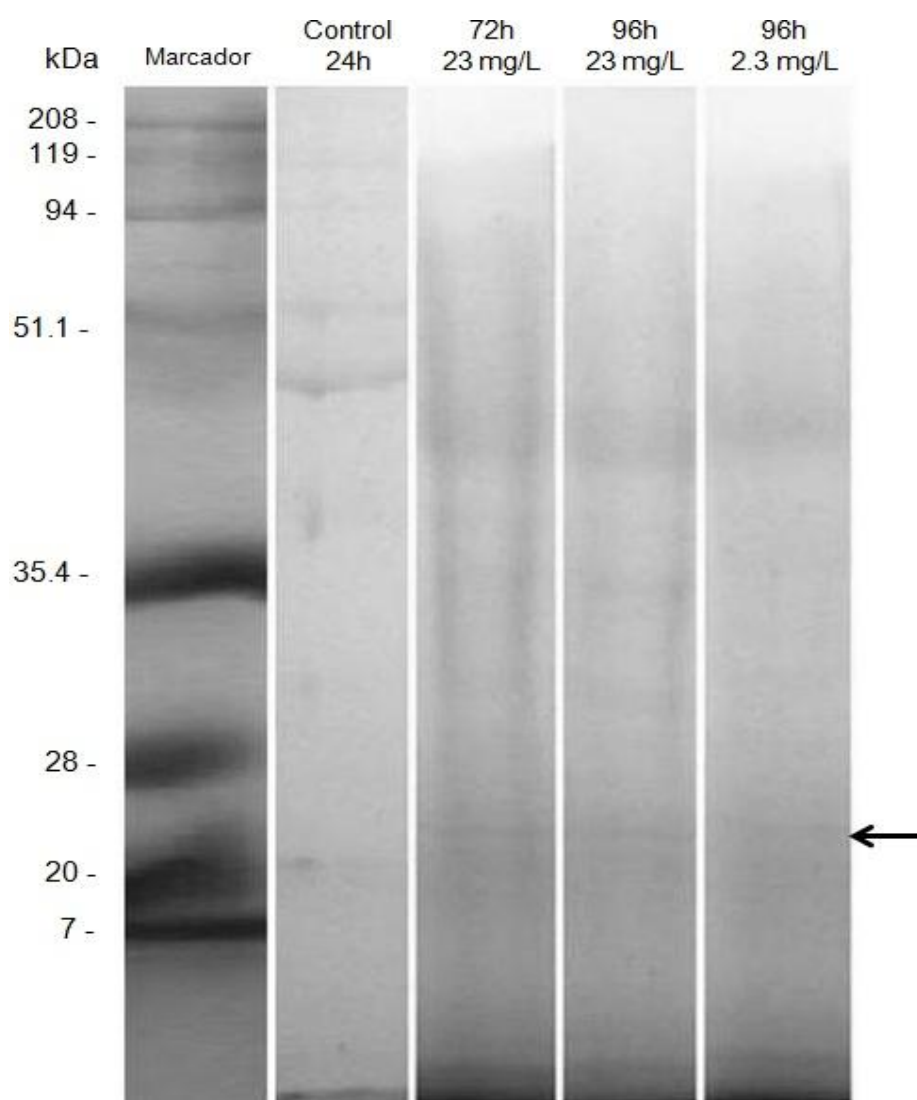
**Figura 40.** SDS-PAGE de extractos enzimáticos de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de GA<sub>3</sub>.



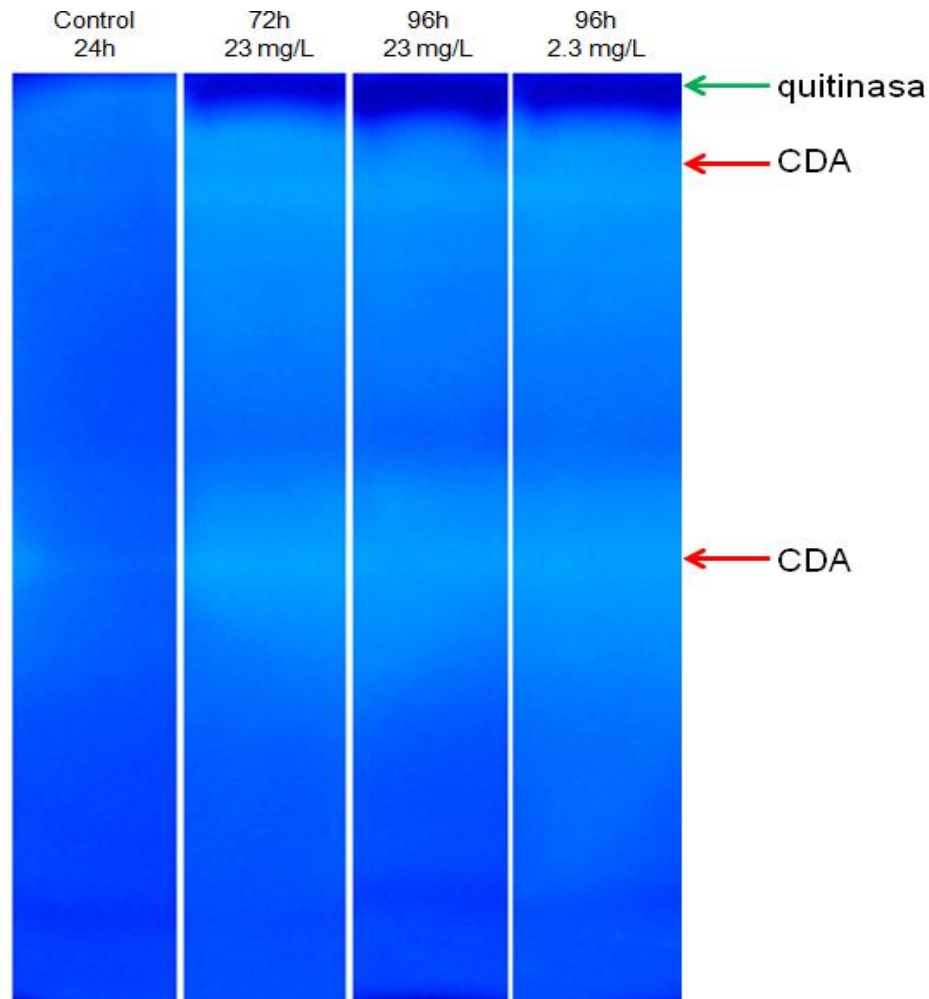
**Figura 41.** Zimograma de actividad CDA de extractos enzimáticos de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de  $GA_3$ .

En la Figura 41 se observan claramente dos bandas con actividad CDA en los extractos de 72 y 96h con 23mg/L de  $GA_3$ , estas mismas bandas se observan en el extracto control de 72h, sin embargo la intensidad de fluorescencia es menor ya que se trata de un extracto con actividad enzimática constitutiva.

En la Figura 42 se señala una banda de aproximadamente 23 kDa que se observa únicamente en los extractos con actividad CDA mientras que en el carril del extracto control no está presente, esta banda tiene un peso molecular cercano al de la CDA de *C. lindemuthianum* purificada por Tokuyasu y colaboradores en 1997 (31.5kDa) y a la purificada por Shrestha y colaboradores en 2004 (25kDa). Lo anterior es congruente con el zimograma de la Figura 43, en el cual se observan dos bandas de actividad en cada extracto y la banda de menor peso molecular tiene mayor intensidad.



**Figura 42.** SDS-PAGE de extractos enzimáticos de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 2.3 y 23 mg/L de ABA.



**Figura 43.** Zimograma de actividad CDA de extractos enzimáticos de *C. gloeosporioides* en cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 2.3 y 23 mg/L de ABA.

El zimograma de extractos con ABA muestra el mismo patrón que el zimograma de extractos con GA<sub>3</sub>.

La quitina desacetilasa de *C. lindemuthianum* es una metaloenzima mononuclear y se sugiere que es una proteína monomérica (Tokuyasu y col, 1997; Blair y col., 2006). De manera general en trabajos de purificación y caracterización de enzimas CDAs se han reportado pesos moleculares únicos en cada cultivo, sin embargo Deising y Siegrist en 1995 obtienen cinco isoformas de CDAs de *Uromyces viciae-fabae* con pesos aparentes de: 48.1, 30.7, 25.2, 15.2 y 12.7 kDa y las relacionan con el desarrollo de estructuras de infección por parte del fitopatógeno. Según lo

observado en las Figuras 41 y 43, en los cultivos realizados se encuentran presentes dos CDAs de diferentes pesos moleculares.

Christodoulidou y colaboradores en 1996 aislaron dos CDAs de *Saccharomyces cerevisiae*, observaron que la delección del gen de una de las enzimas provocaba que la actividad disminuyera en 50% por lo cual concluyen que su actividad es aditiva, ambas enzimas son expresadas específicamente durante la esporulación lo cual concuerda con la existencia de quitosano únicamente en la etapa de desarrollo. Esta levadura pertenece a los Ascomicetos al igual *C. gloeosporioides*, lo cual permite suponer que las CDAs de este fitopatógeno en condiciones constitutivas están asociadas a la etapa de esporulación.

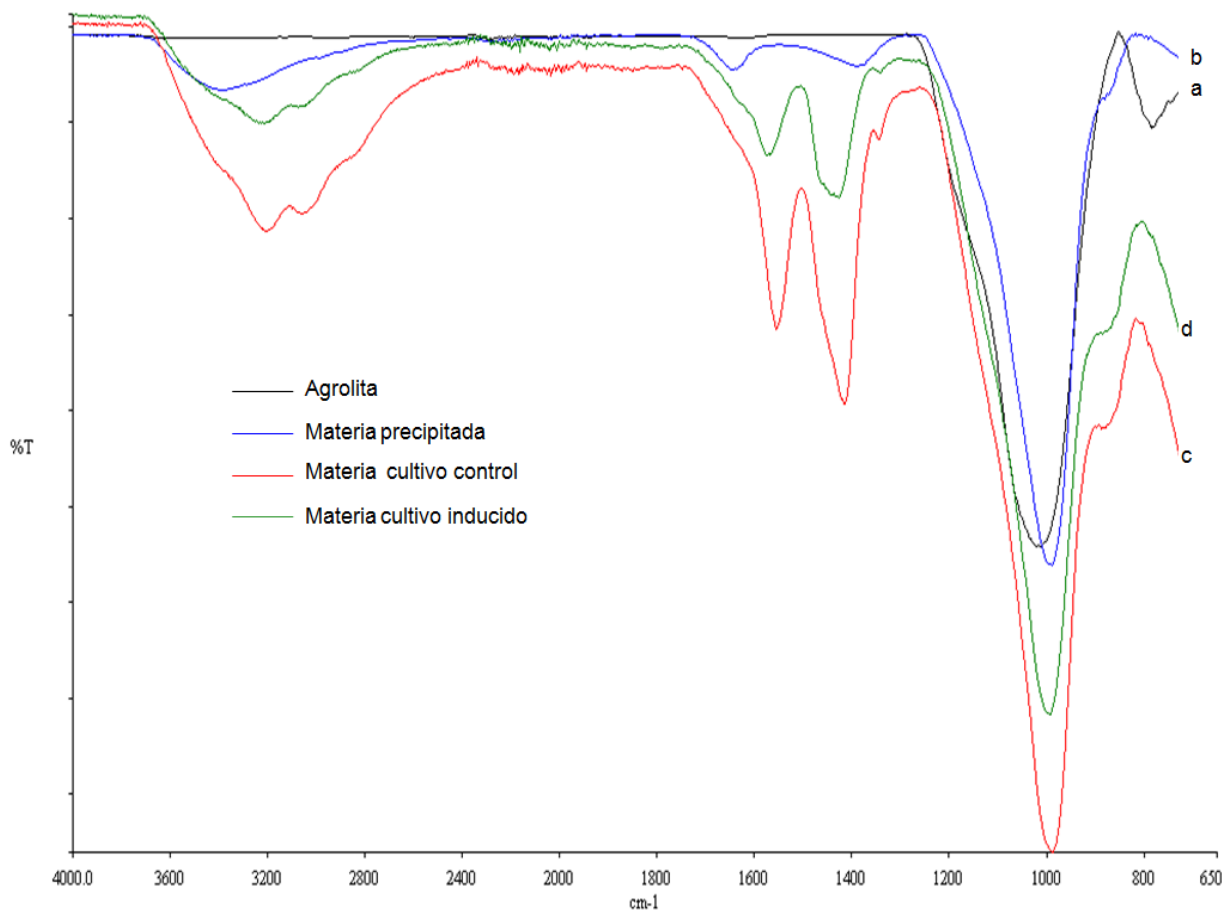
Puede suponerse que en el presente trabajo se observan quitina desacetilasas de pesos moleculares similares a las de *C. lindemuthianum* (Tsigos y Bouriotis, 1995; Shrestha y col., 2004). Resulta de interés saber si estas enzimas de *C. gloeosporioides* tienen actividad aditiva, es decir, si la actividad enzimática total disminuye al no expresarse alguna de estas; a qué etapa del desarrollo están relacionadas y que porcentaje de glicosilación presentan, se han purificado CDAs de *C. lindemuthianum* de  $\approx 150$ kDa con un porcentaje de glicosilación de 66.6% (Tsigos y Bouriotis, 1995) y una CDA de *C. lindemuthianum* clonada y purificada en *Pichia pastoris* de  $\approx 25$ kDa sin glicosilación (Shrestha y col., 2004), la banda de  $\approx 22$ kDa que se observa en las Figuras 41 y 43 probablemente tiene un porcentaje de glicosilación menor que la banda de  $\approx 150$ kDa.

### 7.8. Quitosano de biomasa fúngica

Con el antecedente de que el GA<sub>3</sub> y el IAA son susceptibles a inactivarse por reacción con glucosa a diferencia del ABA que no sólo no se inactiva sino que también se ha reportado que su presencia induce la antracnosis del chile pimienta por *C. acutatum* (Hwang y col., 2008), para la obtención de quitosano de la biomasa fúngica se adicionaron 23 mg/L de ABA como probable inductor de producción de quitosano.

Para verificar que la materia extraída de la biomasa fúngica es quitosano, se obtuvieron espectros de absorción por espectrofotometría ATR-FTIR.

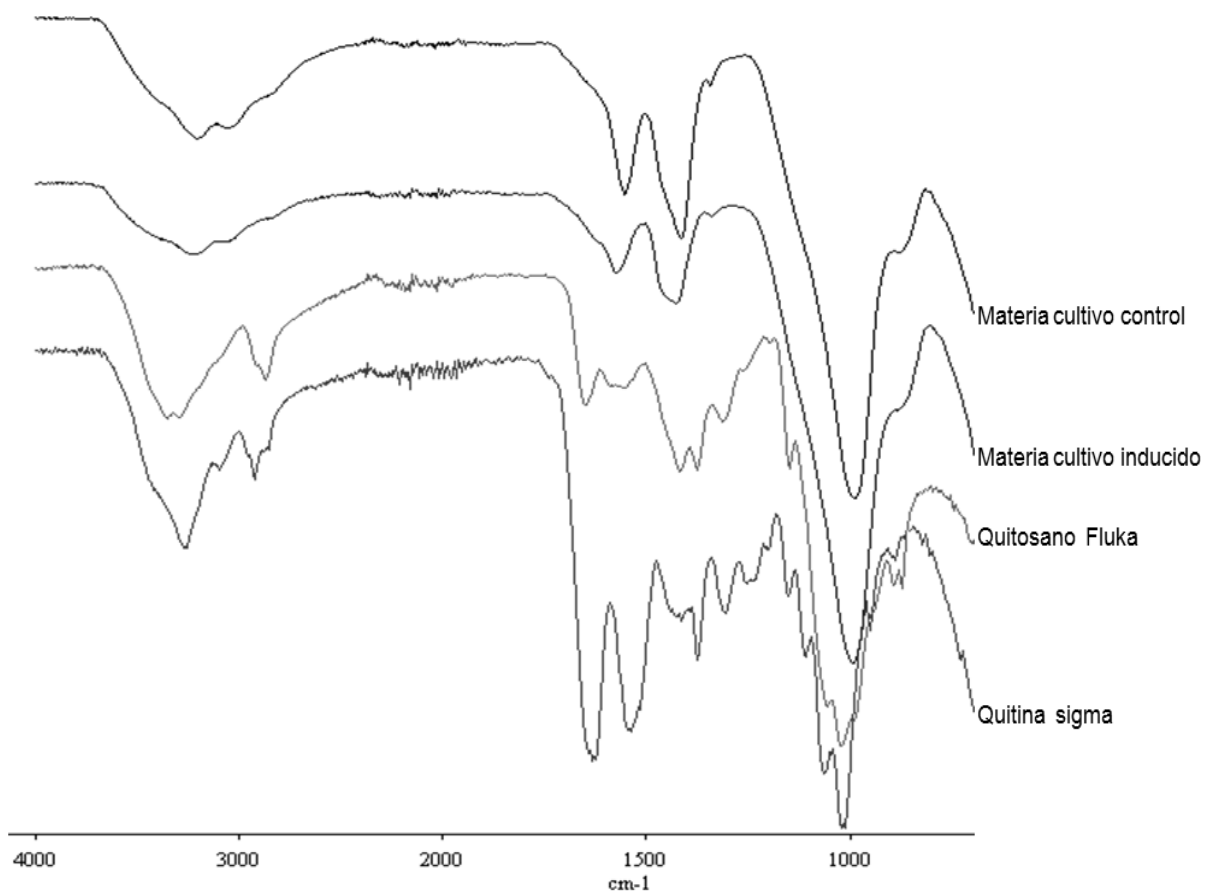
En la Figura 44 se muestran los espectros de los materiales obtenidos durante la extracción del quitosano de biomasa de *C. gloeosporioides*, la agrolita muestra una banda de absorción aproximadamente 990cm<sup>-1</sup> esta misma banda se observa en los espectros b, c y d, sin embargo durante la purificación la materia soluble es filtrada para separar restos de agrolita, por lo cual en el espectro c y d esta banda es referente al estiramiento C-O-C del material soluble, por otra parte la banda de 3200cm<sup>-1</sup> referente a estiramiento NH y las bandas de 1550 y 1420cm<sup>-1</sup> características del grupo amino, se definen mejor en los espectros c y d respecto al espectro b (materia precipitada). Se observan ligeramente bandas de absorción alrededor de 3400 y 2820cm<sup>-1</sup> característica del grupo -OH y característica del estiramiento C-H del metilo respectivamente, el pico característico del grupo amina de la amida (≈1600cm<sup>-1</sup>) de la quitina no se observa lo cual significaría que el polímero se encuentra en su mayoría desacetilado y la banda en 885cm<sup>-1</sup> apenas visible, se refiere al β-anómero (Brugnerotto y col., 2001).



**Figura 44.** Espectros de absorción de: (a) agrolita, (b) quitosano precipitado, (c) materia obtenida de cultivo sólido con medio ácido glutámico y (d) materia obtenida de cultivo sólido con medio ácido glutámico adicionado con 23 mg/L de ABA.



Sin embargo, comparando los espectros de los compuestos obtenidos, quitina y quitosano comercial no se observan las bandas características por lo que no es posible concluir que el material extraído sea quitosano (Figura 45).

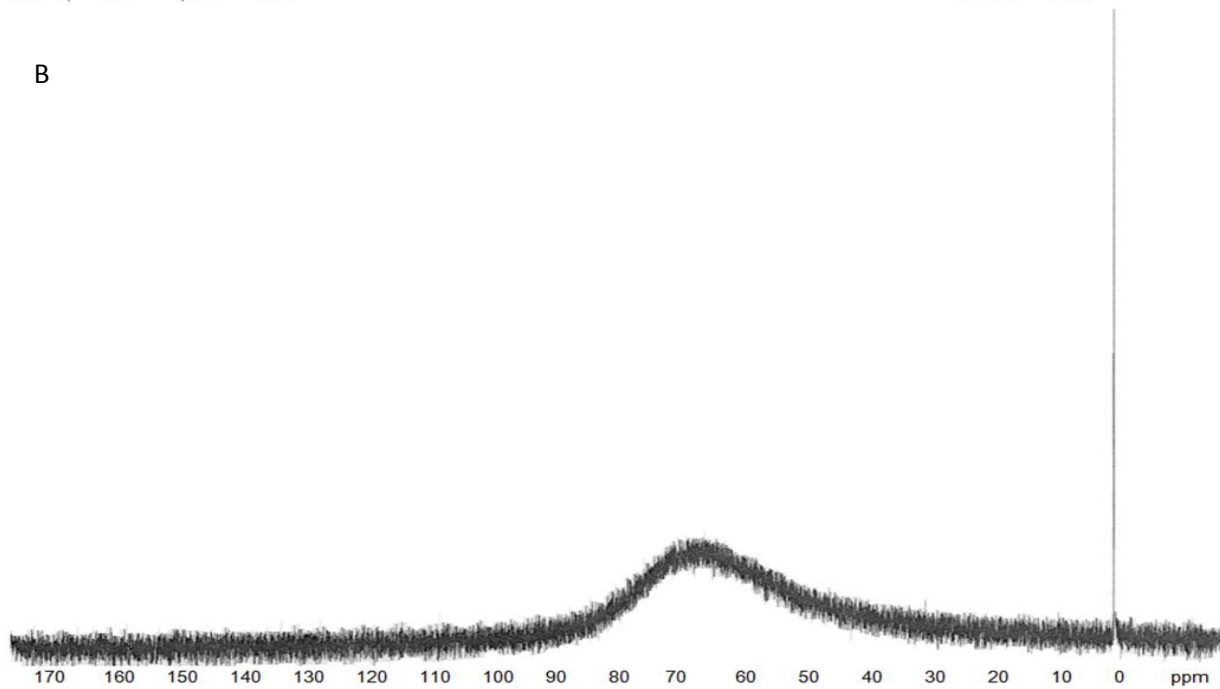
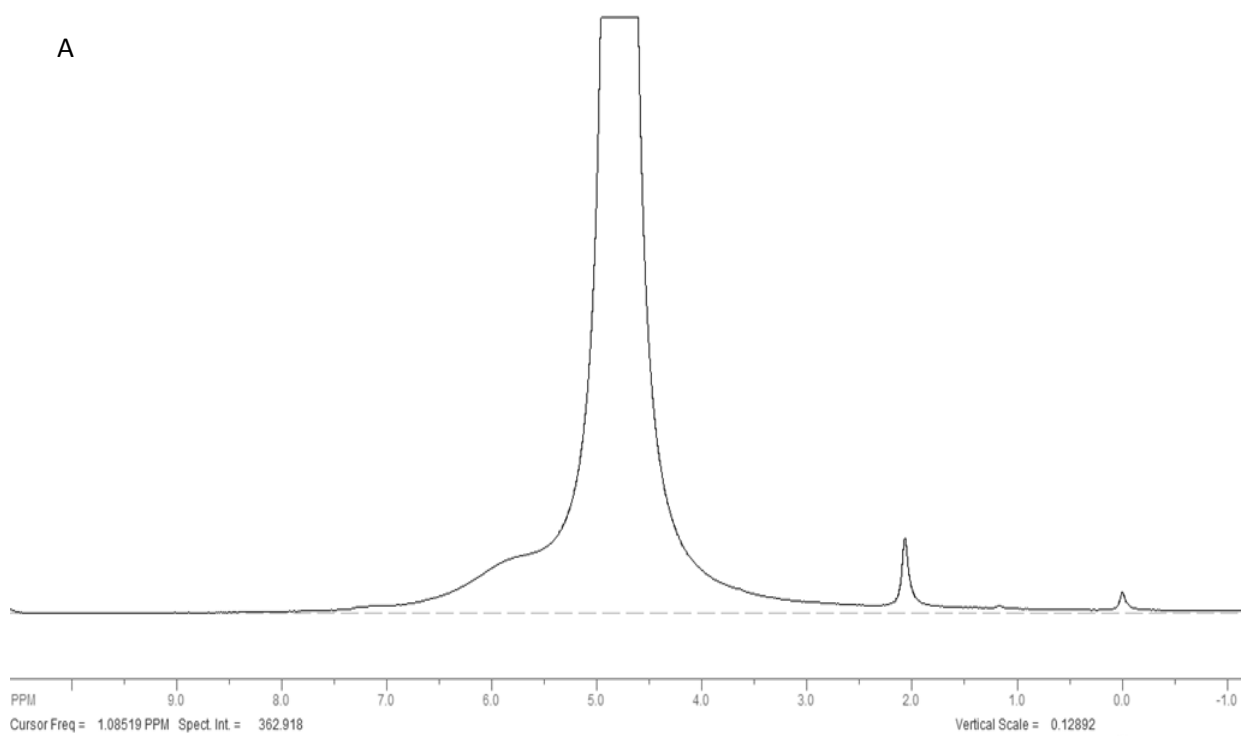


**Figura 45.** Espectros de absorción (ATR-FTIR) de quitina comercial Sigma, quitosano comercial de alto peso molecular Fluka y quitosanos obtenidos en cultivo sólido control y cultivo sólido inducido con 23 mg/L de ABA.

Por otra parte se realizó  $^1\text{H}$ -RMN con el objetivo de determinar si efectivamente se trataba de quitosano y conocer su grado de acetilación, el espectro obtenido indico que no se solubilizó quitosano en  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  ya que se observaron únicamente los picos de agua (5 ppm),  $\text{CH}_3$  (2 ppm) y el pico de referencia (0 ppm) (Figura 46A). Para confirmar lo anterior se realizó  $^{27}\text{Al}$ -RMN en el que se observó pico característico de aluminio (Figura 46B), esto pudo deberse a que la agrolita está compuesta de diversos minerales entre ellos el óxido de aluminio (Tabla 9), el cual interfirió en el proceso de extracción de quitosano fúngico.

**Tabla 9.** Composición de agrolita (Agrolita de México S.A. de C.V.)

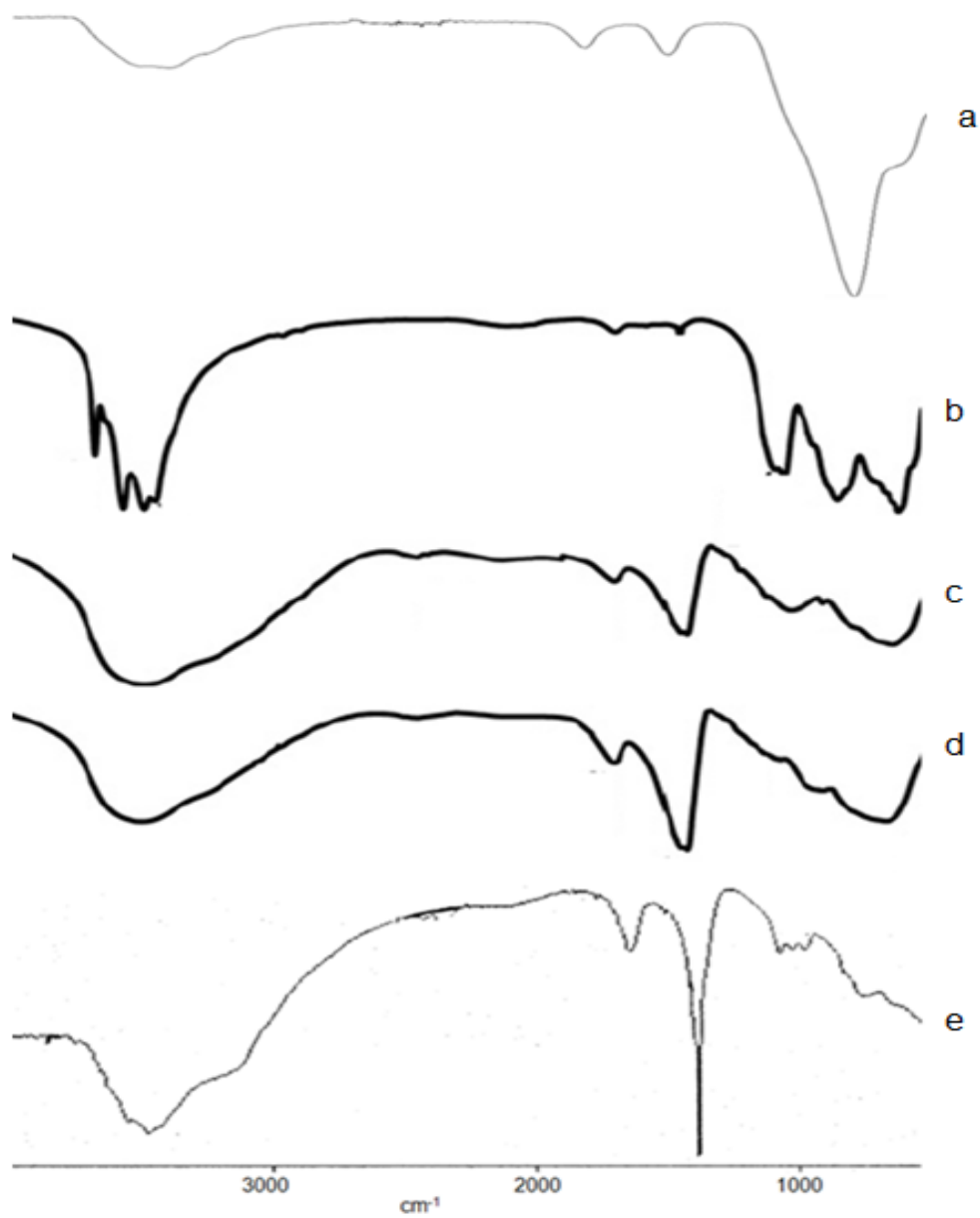
Elemento	Oxido	Porcentaje
Sílice	$\text{SiO}_2$	75.30
Aluminio	$\text{Al}_2\text{O}_3$	13.92
Hierro	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0.51
Sodio	$\text{Na}_2\text{O}$	4.98
Potasio	$\text{K}_2\text{O}$	4-58
Calcio	$\text{CaO}$	0.62
Otros		0.09



**Figura 46.** (A) Espectro de H-RMN de materia obtenida de cultivo control y (B) Espectro del núcleo  $^{27}\text{Al}$  de materia obtenida de cultivo control.

Lo que nos permite concluir que el material obtenido está compuesto principalmente de aluminio y que la cantidad de quitosano en la muestra es muy baja y que posiblemente se encuentre interaccionando con el aluminio, debido a las propiedades del quitosano para atrapar metales (Rinaudo, 2006).

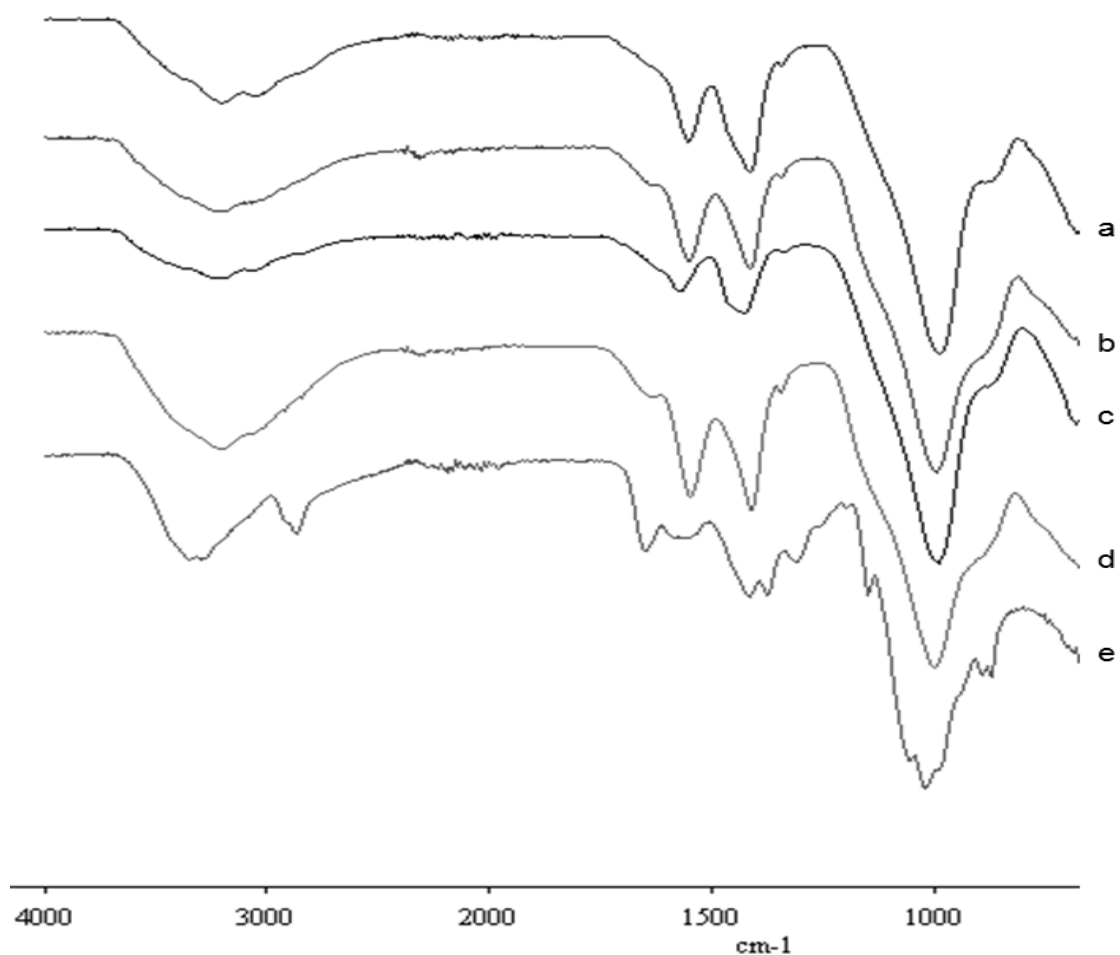
Se realizó un control del proceso de extracción de quitosano en el que se repitió el procedimiento pero sólo a agrolita, *i.e.* sin biomasa fúngica. Se obtuvo un gel, el cual se dejó secar para obtener su espectro. En la Figura 47 se muestran espectros de los compuestos extraídos de la agrolita y de geles de hidróxido de aluminio obtenidos a diferentes valores de pH (Du y col., 2009) y gel de alúmina en forma de hidroxihidrogel (Meher y col., 2005). Los espectros presentan las mismas bandas características a aproximadamente  $3400\text{cm}^{-1}$  debida a la vibración OH,  $1600\text{cm}^{-1}$  atribuida a momentos de flexión de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $1400\text{cm}^{-1}$  referente a la deformación C-H y  $1000\text{cm}^{-1}$  debida al enlace Al-O (Saitoh y col., 2011). Esto sustenta la propuesta de que el material que se obtuvo contiene principalmente aluminio.



**Figura 47.** Espectros de absorción (ATR-FTIR): (a) gel de aluminio de agrolita, (b) gel de hidróxido de aluminio precipitado a pH 9\*, (c) gel de hidróxido de aluminio precipitado a pH 7\*, (d) gel de hidróxido de aluminio precipitado a pH 5\*, (e) hidroxihidrogel°. (\*Du y col., 2009; °Meher y col., 2005)

Con base a lo anterior se modificó el protocolo de extracción de quitosano a condiciones más suaves de acuerdo a la metodología propuesta por Nwe y colaboradores en 2002, en la cual la temperatura y tiempo de reacción son de 40°C y 16h, con el objetivo de que en condiciones de extracción más suaves la agrolita no reaccionara, evitando la interferencia.

En la Figura 48 se muestran los espectros de geles obtenidos con temperaturas altas (TA), 121°C en la extracción con hidróxido de sodio y 95°C en la extracción con HCl y con temperatura baja (TB), 40°C para las extracciones con hidróxido de sodio y con ácido acético.



**Figura 48.** Espectros de absorción ATR-FTIR (a) y (b) compuestos obtenidos de cultivo control a TA y TB, respectivamente; (c) y (d) compuestos obtenidos de cultivos inducidos a TA y TB, respectivamente; (e) quitosano Fluka.

Como se observa en la Figura 48, los espectros de los geles de cultivo control e inducido obtenidos con ambas metodologías son muy similares, la diferencia radica en que los espectros b y d (materiales obtenidos con metodología a TB) presentan una mejor definición de las bandas de 1600 y 1400cm<sup>-1</sup>, sin embargo son en compuestos con aluminio, por lo cual para obtener quitosano de cultivo sólido, es necesario experimentar con otro tipo de soporte para evitar la interferencia.

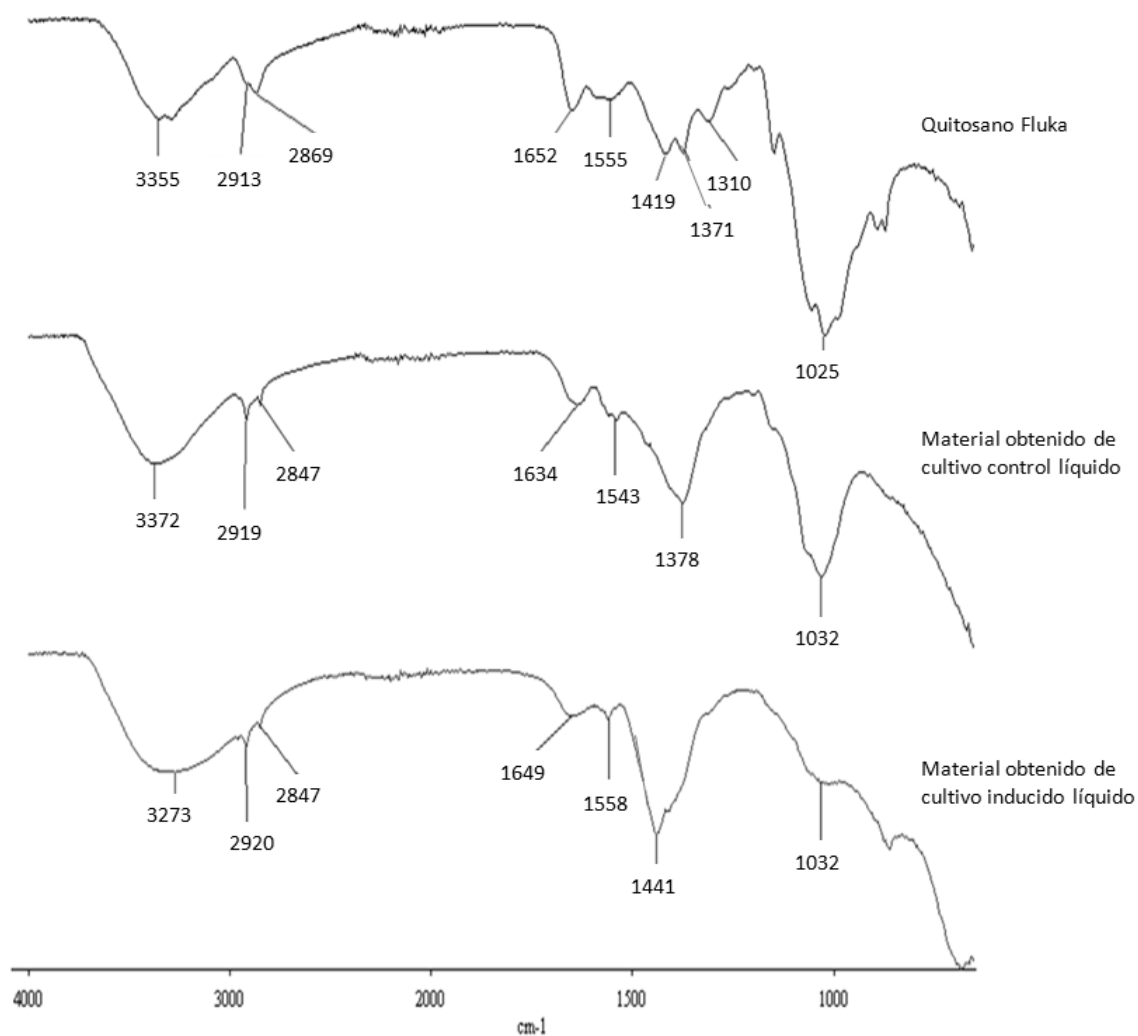
Con la finalidad de obtener quitosano sin contaminantes metálicos se realizaron cultivos líquidos, los rendimientos se resumen en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Rendimientos de quitosano de cultivo líquido.

	Cultivo Control	Cultivo Inducido
<b>Biomasa (g)</b>	1.0139	0.4958
<b>Materia extraída (g)</b>	0.0106	0.0073
<b>Rendimiento respecto a Biomasa (%)</b>	1.04	1.47

Como se muestra en la Tabla 10, la presencia de ABA disminuye el crecimiento del hongo más de 50%, sin embargo hay un aumento de 45% en rendimiento de materia extraída del cultivo inducido respecto al control, considerando que las actividades quitina desacetilasa específicas a 72h de cultivo líquido control e inducido fueron  $0.014 \pm 0.002$  y  $0.054 \pm 0.011$  U/mg respectivamente, se puede concluir que la hipótesis propuesta en este trabajo se cumple en su totalidad en cultivo sólido y líquido.

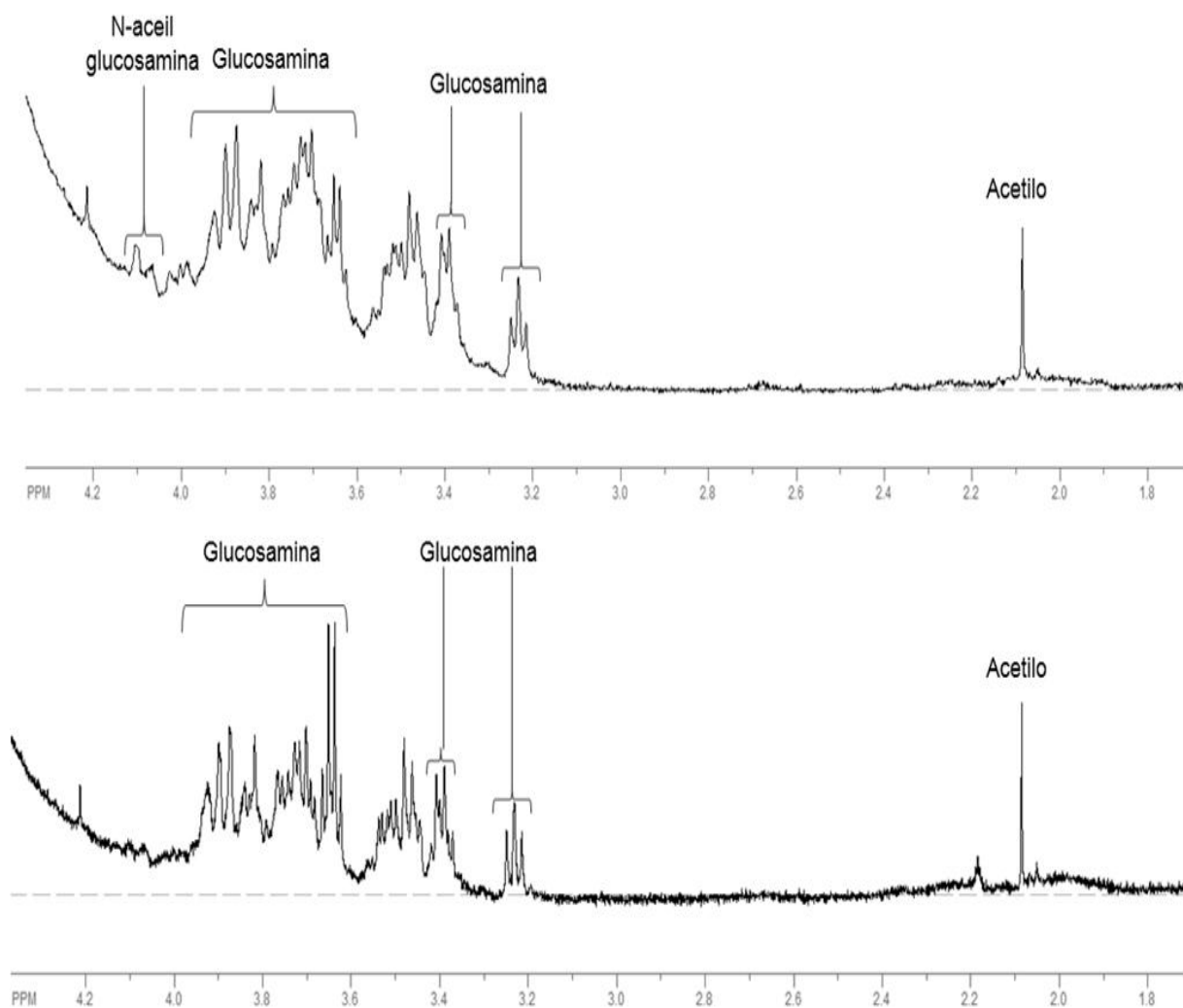
En la Figura 49 se muestran los espectros ATR-FTIR de quitosano comercial y materiales obtenidos en cultivo líquido control e inducido, los materiales presentan bandas características del quitosano, no se definen las bandas de aproximadamente 1419 y 1310  $\text{cm}^{-1}$ , esto puede ser por la influencia de los parámetros de cristalinidad y porcentaje de desacetilación de los materiales (Guibal y col., 1999).



**Figura 49.** Espectros de absorción de quitosano comercial y quitosanos obtenidos en cultivos líquidos control e inducido.



Los materiales extraídos de la biomasa de *C. gloeosporioides* en cultivos líquidos fueron analizados mediante  $^1\text{H}$ -RMN, en la Figura 50 se muestran los espectros obtenidos.



**Figura 50.** Espectro de H-RMN de: (a) y (b) quitosanos de cultivos líquidos control e inducido.

En los espectros mostrados se observa el pico característico del grupo acetilo (2.1 ppm), aproximadamente a 3.2 ppm se observa triplete característico de glucosamina, se observa doblete característico de glucosamina (3.4 ppm), de 3.6 a 4 ppm se observan varios picos en su mayoría característicos de glucosamina y algunos de N-acetil glucosamina, en el espectro 50A se observa doblete característico de N-acetil glucosamina, el pico de D<sub>2</sub>O va aproximadamente de 4.2 a 5.8 ppm, por lo cual no se aprecian algunos otros picos característicos de N-acetil glucosamina y glucosamina que se presentarían entre 5 y 6 ppm (Einbu., 2007).

Los espectros obtenidos indican que el quitosano obtenido de la biomasa del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* se encuentra hidrolizado, esto se puede deber al método de extracción.

## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó una selección del hongo productor de quitina desacetilasas a partir de 10 aislados, obteniéndose que *C. gloeosporioides* fue el mejor productor, se estudió el efecto de la relación C/N del medio y el efecto de la adición de inductores.

El hongo *C. gloeosporioides* produce quitina desacetilasas constitutivamente en cultivo líquido y sólido ( $0.398 \pm 0.099$  y  $0.296 \pm 0.053$  U/g SSI respectivamente), en cultivo sólido la actividad CDA no está directamente relacionada con la producción de biomasa ni con el aumento de la relación C/N del medio de cultivo.

La actividad CDA es claramente inducida en cultivo sólido en presencia de N-Acetil Glucosamina, Glucosamina y Quitosano 36% desacetilado a una concentración de 1000 mg/L mientras que las fitohormonas Ácido Giberélico, Ácido Abscísico y Ácido Indol Acético inducen actividad a concentraciones de 0.23 y 23 mg/L siendo esta última la concentración óptima.

La actividad CDA fue corroborada en zimogramas, en los cuales se observan claramente dos bandas con actividad CDA en cada carril lo cual permite suponer que en los extractos crudos enzimáticos se encuentran dos quitina desacetilasas de diferentes pesos moleculares y apoyándose en el hecho de que en los geles SDS-PAGE hay bandas presentes en los extractos con actividad y ausentes en los extractos sin actividad podemos concluir que los pesos moleculares de estas enzimas son aproximadamente 23 y 150 KDa, en el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* se han purificado CDAs con estos pesos moleculares en diferentes trabajos (Zhao y col., 2010).

De manera constitutiva el hongo *C. gloeosporioides* tiene quitina como componente de sus paredes celulares y la enzima CDA puede actuar sobre este biopolímero. No es posible concluir que la mayor producción de CDA en los cultivos con inductores sea responsable de las diferencias en rendimiento entre el control (1.04%) y el inductor, 23 mg/L de ABA, (1.47%), debido al método de extracción probado.

## 9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudió la relación C/N aumentando la cantidad de glucosa, es de interés evaluar diferentes fuentes de nitrógeno para la producción enzimática, puesto que se ha publicado que este elemento tiene un mayor efecto que el carbono.

Se recomienda la construcción de una gráfica de desarrollo del hongo en las mismas condiciones de cultivo para poder relacionar la producción de esta enzima a determinada etapa del desarrollo, de manera constitutiva.

Resulta de gran interés continuar con estudios sobre las interacciones y efectos de la presencia de hoja en el sistema, en este caso se utilizó la hoja completa, sin embargo puede probarse en trozos o como extracto. De igual forma se recomienda utilizar cascara de frutos u otras partes de la planta.

Se probaron fitohormonas como inductores, debido a que se sabe que hay acumulación y/o liberación de este tipo de sustancias durante el daño mecánico a la planta, sin embargo hay otro tipo de sustancias liberadas como ácidos, terpenoides, alcaloides, alcoholes o mezclas volátiles que podrían ser probadas en el sistema propuesto.

Se utilizó como soporte agrolita, sin embargo reacciona fácilmente y complica la extracción de quitosano, por lo cual se propone probar diversos soportes inertes y sustratos soportes.

Por otra parte sería de utilidad la purificación de las enzimas producidas para estudiar su papel en condiciones basales, inducidas y durante la patogénesis.

Lo anterior con la finalidad de generar información para la obtención de quitosano a partir de quitina por métodos completamente biológicos, así como para la formulación de productos para el control biológico.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Akimitsu K., Isshiki A., Ohtani K., Yamamoto H., Eshel D., Prusky D. 2004. Mini-review: Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 271–275.
2. Alfonso C., Nuero O., Santamaría F., Reyes F. 1995. Purification of a Heat-Stable Chitin Deacetylase from *Aspergillus nidulans* and Its Role in Cell Wall Degradation. *Current Microbiology*. 30: 49-54.
3. Araki Y. and Ito E. 1975. A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii* Enzymatic Deacetylation of Chitin. *European Journal of Biochemistry*. 55: 71-78.
4. Arimura G., Kost C., Boland W. 2005. Review: Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1734: 91-111.
5. Asselbergh B. and Monica Höfte M. 2007. Basal tomato defences to *Botrytis cinerea* include abscisic acid-dependent callose formation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 33-40.
6. Banks I., Specht C., Donlin M., Gerik K., Levitz S., Lodge J. 2005. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 4(11): 1902-1912.
7. Beaney P, Gan Q, Magee T., Healy M., Lizardi-Mendoza J. 2007. Modification of chitin properties for enzymatic deacetylation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82: 165-173.
8. Binyamini N. and Schiffmann-Nadel M. 1971. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*. 62: 592-594.
9. Birkenmeier G. and Ryan C. 1998. Evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiology*. 117: 687-693.
10. Blair D., Hekmat O., Schuttelkopf A., Shrestha B., Tokuyasu K., Withers S., and van Aalten D. 2006. Structure and Mechanism of Chitin Deacetylase from the Fungal Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*. 45: 9416-9426.
11. Blumenthal C. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in

- food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39: 214-228.
12. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
  13. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M. Argüelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 42: 3569-3580.
  14. Cai J., Yang J., Du Y., Fan L., Qiu Y., Li J., Kennedy J. 2006. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydrate Polymers*. 65: 211-217.
  15. Chatterjee S., Adhya M., Guha A.K., Chatterjee B. P. 2005. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*. 40: 395-400.
  16. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B., Guha A. 2008. Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *International Journal of Biological Macromolecules*. 42: 120-126.
  17. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B., Guha A. 2009. Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. *Microbiological Research*. 164: 347-351.
  18. Christodoulidou A, Bouriotis V., Thireos G. 1996. Two Sporulation-specific Chitin Deacetylase-encoding Genes Are Required for the Ascospore Wall Rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(49): 31420-31425.
  19. Collins T., Moerschbacher B., Read N. 2001. Synergistic induction of wheat stemrust appressoria by chemical and topographical signals. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 58: 259-266.

20. Dammann C., Enrique Rojo E., Sánchez-Serrano J. 1997. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *The Plant Journal*. 11(4): 773-782.
21. Davis L. and Bartnicki-García. 1984. The Co-ordination of Chitosan and Chitin Synthesis in *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology*. 130: 2095-2102.
22. Deising H. and Siegrist J. 1995. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. 127: 207-212.
23. Deising H., Werner S., Wernitz M. 2000. Review: The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection*. 2: 1631-1641.
24. Di Mario F., Rapaná P., Tomati U., Galli E. 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43: 8-12.
25. Du X., Wang Y., Su X., Li J. 2009. Influences of pH value on the microstructure and phase transformation of aluminum hydroxide. *Powder Technology*. 192: 40-46.
26. Einbu A. 2007. Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis. Norwegian University of Science and Technology.
27. El Ghaouth A., Arul J., Grenier J., Asselin A. 1992. Effect of chitosan and other polyons on chitin deacetylase in *Rhizopus stolonifer*. *Experimental Mycology*. 16: 173-177.
28. El Gueddari N., Rauchhaus U., Moerschbacher B., Deising H. 2002. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist*. 156: 103-112.
29. English P., Jurale J., Albersheim P. 1971. Host-Pathogen Interactions. Parameters affecting polysaccharide-degrading enzyme secretion by *Colletotrichum lindemuthianum* grown in culture. *Plant Physiol*. 47: 1-6.
30. Fernando T.H.P.S., Jayasinghe C.K., Wijesundera R.L.C. 2001. Cell wall degrading enzyme secretion by *Colletotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*. *Mycology Research*. 105 (2): 195-201.

31. Flamini G., Tebano M., Cioni P. 2007. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. *Analytica Chimica Acta*. 589: 120-124.
32. Gao L., Sun M., Liu X., Che Y. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycology Research*. 3: 87-92.
33. Ghormade V., Kulkarni S., Doiphode N., P.R. Rajamohanam P.R., Deshpande M.V. 2010. FORMATEX. Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications. Current Research, Tecnology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Botechnology. 1054-1066.
34. Gómez-Gómez L. 2004. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology*. 4: 1055-1062.
35. Guibal E., Milot C., Eterradosi O., Gauffier C., Domard A. 1999. Study of molybdate ion sorption on chitosan gel beads by differentspectrometric analyses. *International Journal of Biological Macromolecules*. 24: 49-59.
36. Guyot J., Ntawanga Omandab E., Fabrice Pinard F. 2005. Some epidemiological investigations on *Colletotrichum* leaf disease on rubber tree. *Crop Protection*. 24: 65-77.
37. Hirai A., Odani H., Nakajima A. 1991. Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*. 26: 87-94.
38. Howard R.J., Bourette T.M., Ferrari M.A. Infection by *Magnaporthe*: an *in vitro* analysis, in: Mendgen K., Lesemann. D.E. (Eds.), *Electron Microscopy of Plant Pathogens*, Springer-Verlag, Berlin, 1991, pp. 251–264.
39. Hu K., Hu J., Ho K., Yeung K. 2004. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate Polymers*. 58: 45-52.
40. Hwang S., Kim J., Kim Y. and Kim H. 2008. ABA Increases Susceptibility of Pepper Fruits to Infection of Anthracnose by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Pathology Journal*. 24(4): 400-406.



41. Jeraj N., Kunič B., Lenasi H., Breskvar K. 2006. Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 1294-1299.
42. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of the United States America*. 90: 2564-2568.
43. Kauss H. and Bauch B. 1988. Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods in Enzymology*. 161:518-523.
44. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
45. Lahey K., Yuan R, Burns J., Ueng P., Timmer L.W., Chung K. 2004. Induction of Phytohormones and Differential Gene Expression in Citrus Flowers Infected by the Fungus *Colletotrichum acutatum*. *MPMI*. 17(12): 1394-1401.
46. León J., Rojo E., Sánchez-Serrano J. 2001. Review article. Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 52(354): 1-9.
47. Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation process. *Carbohydrate. Res.* 273: 235-242.
48. Martinou A., Tsigos I., Dimitris K. 2001. Chitin deacetylases: From basic research to biotechnology applications. *Chitin Enzymology*. pp 503-510.
49. Meher T, Basu A.K., Ghatak S. 2005. Physicochemical characteristics of alumina gel in hydroxyhydrogel and normal form. *Ceramics International*. 31: 831-838.
50. Mendgen K. and Hahn M. 2002. Review: Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7(8):352-6.
51. Mendgen K., Hahn M., Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanism of penetration by plant pathogen fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:367-86.
52. Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.

53. Muñoz Z., Moret A., Garcés S. 2009. Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum sp.* on tomatoes and grapes. *Crop Protection* 28: 36-40.
54. Nahar P., Ghormade V., Deshpande M. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 80–88.
55. Neshher I., Barhoom S, Sharon A. 2008. Open Access Cell cycle and cell death are not necessary for appressorium formation and plant infection in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC Biology*. 6:9.
56. Nicolella C., Van Loosdrecht M., Heijnen S. 2000. Particle-based biofilm reactor technology. *Trends in Biotechnology*. 18(7): 312-320.
57. Nwe N. and Stevens W. 2002. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters* 24: 131–134.
58. Nwe N. and Stevens W. 2004. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*. 39:1639–1642.
59. Nwe N., Stevens W., Tokura S., Tamura H. 2008. Characterization of chitosan and chitosan–glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*. 42: 242-251.
60. Pacheco N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para obtención de quitosanos: Caracterización y aplicación. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
61. Palomino J., Martin A., Camacho M., Guerra H., Swings J., Portaels F. 2002. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(8): 2720-2722.
62. Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay which is more generally applicable. *Analytical Chemistry*. 83: 346-353.

63. Plassard C. and Fransson P. 2009 Review: Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. *Fungal Biology Reviews*. 23: 30-39.
64. Pochanavanich P. and Suntornsuk W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*. 35: 17–21.
65. Prashanth K. V. H. and Tharanathan R. N. 2007. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends in food sciences and technology*. 18: 117-131.
66. Ramírez-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.
67. Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31: 603-632.
68. Saitoh T., Yamaguchi M., Hiraide M. 2011. Surfactant-coated aluminum hydroxide for the rapid removal and biodegradation of hydrophobic organic pollutants in water. *Water research*. 45: 1879 -1889.
69. Shahidi F. y Abuzaytoun R. 2005. Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications and Health Effects. *Advances in Food and Nutrition Research*. 49: 93-135.
70. Shrestha B., Blondeau K., Stevens W., L. Hegarat F. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*. 38: 196-204.
71. Siegrist, J., Kauss, H. 1990. Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 36: 267-275.
72. Sinha R. K. 2004. Modern Plant Physiology. Alpha Science International. pp460-504.
73. Snowden Anna L. 1990. Miscelaneuas tropical and subtropical fruits en: A color Atlas of POSTHARVEST Diseases & Disorders of fruits & Vegetables. Wolfe Scientific Ltd. Primera edicion. España. pp302.

74. Suresh P.V., Sachindra N. M., Bhaskar N. 2011. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science Technology*. 48(3):349-356.
75. Tajdini F., Amini M., Nafissi-Varcheh N., Faramarzi M. 2010. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47: 180-183.
76. Tan S., Tan T., Wong S., Khor E. 1996. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*. 30: 239-242.
77. Tayel A., Moussa S., Opwis K., Knittel D., Schollmeyer E., Nickisch-Hartfiel A. 2010. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47: 10-14.
78. Tokuyasu K., Mitsutomi M., Yamaguchi I., Hayashi K., Mori Y. 2000. Recognition of Chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*. 39: 8837-8843.
79. Tokuyasu K., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi K., Mori Y. 1997. Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2–4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydrate Research*. 303: 353-358.
80. Trudel J. and Asselin A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 178(2): 362-366.
81. Trudel J. y Asselin A. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electroforesis. *Analytical Biochemistry*. 189: 249-253.
82. Tsigos I. and Bouriotis V. 1995. Purification and characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 26286-26291.
83. Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 18: 305-312.

84. Tsigos I., Zydowicz N., Martinou A., Domard A., Bouriotis V. 1999. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. *European Journal of Biochemistry*. 261: 698-705.
85. Vetter J. 2007. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. 2007. *Food Chemistry*. 102(1): 6-9.
86. Voigt C. A., Schäfer W., Salomon S. 2006. A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 242–247.
87. Wang W., Du Y., Wang X. 2008. Physical properties of fungal chitosan. *World Journal of Microbiological Biotechnology*. 24:2717-2720.
88. White S., Farina P., Fulton I. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied Environmental Microbiology*. 38(2): 323-328.
89. Wittstock U. and Gershenzon J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 1-8.
90. Wu T., Zivanovic S., Draughon A., Conway W., Sams C. 2005. Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53: 3888-3894.
91. Wu T., Zivanovic S., Draughon A., Sams C. 2004. Chitin and Chitosans Value-Added Products from Mushroom Waste. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52: 7905-7910.
92. Zhao Y., Park R, Muzzarelli R. 2010. Review: Chitin Deacetylases: Properties and Applications. *Marine Drugs*. 8: 24-46.
93. Zulfiqar M., Brlansky R. H., Timmer L. W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia*. 88(1): 121-128.

## ANEXO I. CURVAS DE CALIBRACIÓN.

### Curva de Proteína (Seroalbúmina bovina)

#### Microensayo de Bradford

Procedimiento:

Se toman 2.50 mg de seroalbúmina bovina (Sigma) se disuelven en 25ml de agua destilada para preparar una solución 100µg/mL.

Se diluye con agua destilada para preparar una serie de muestras con concentraciones de 0 a 100µg/mL.

Se agregaron 160µL de la muestra preparada a la dilución requerida y 40µL de reactivo de Bradford en cada pozo, se procedió a leer absorbancia a 595nm en el lector ELISA.

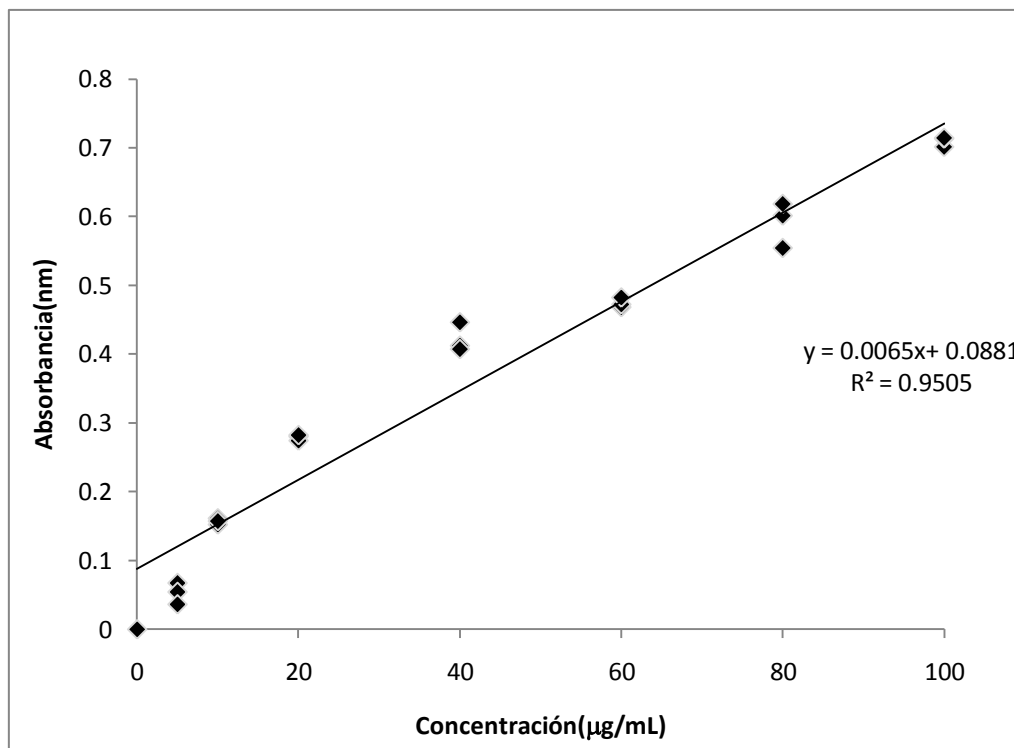


Figura A.I.1. Curva de calibración para determinación de proteína con método de Bradford.

## Curva de Proteína (Seroalbúmina bovina)

### Método de Lowry-Peterson

Procedimiento:

Se toman 2.50 mg de seroalbúmina bovina (Sigma) se disuelven en 25ml de agua destilada para preparar una solución 100µg/mL.

Se diluye con agua destilada para preparar una serie de muestras con concentraciones de 0 a 100µg/mL.

Se adiciona 1mL de reactivo A se adiciona a 1mL de las muestras preparadas.

Se mezclan y se incuban a 30° C por 10 minutos. Posteriormente se agrega 0.5 mL de reactivo B y se agita, incubándose a 30° C por 30 minutos.

Se determina absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305).

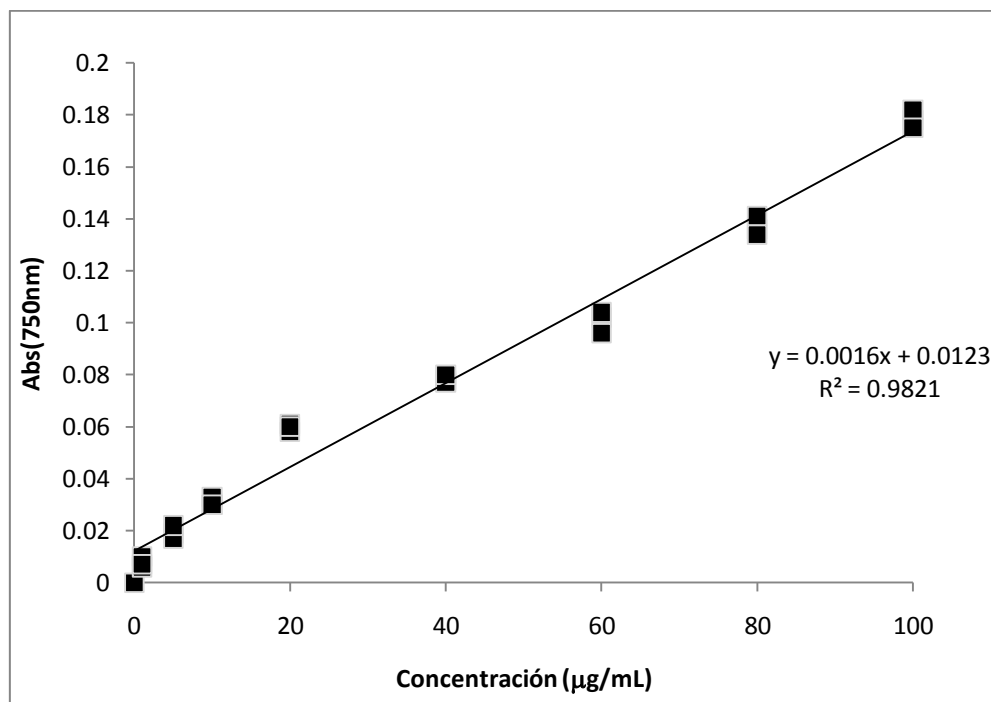


Figura A.I.2. Curva de calibración para determinación de proteína con método de Lowry-Peterson.

## Curva de Azúcares reductores (Glucosa)

### Método de Miller (DNS)

Procedimiento:

Preparar una solución de Glucosa a una concentración de 1g/L.

En tubos con rosca preparar diluciones de 0 a 1g/L.

Agregar a cada tubo 1mL de reactivo DNS, tapar y agitar.

Calentar los tubos en baño maría por 5 minutos y enfriar con agua.

Agregar 8mL de agua destilada a cada tubo.

Leer a 575nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305).

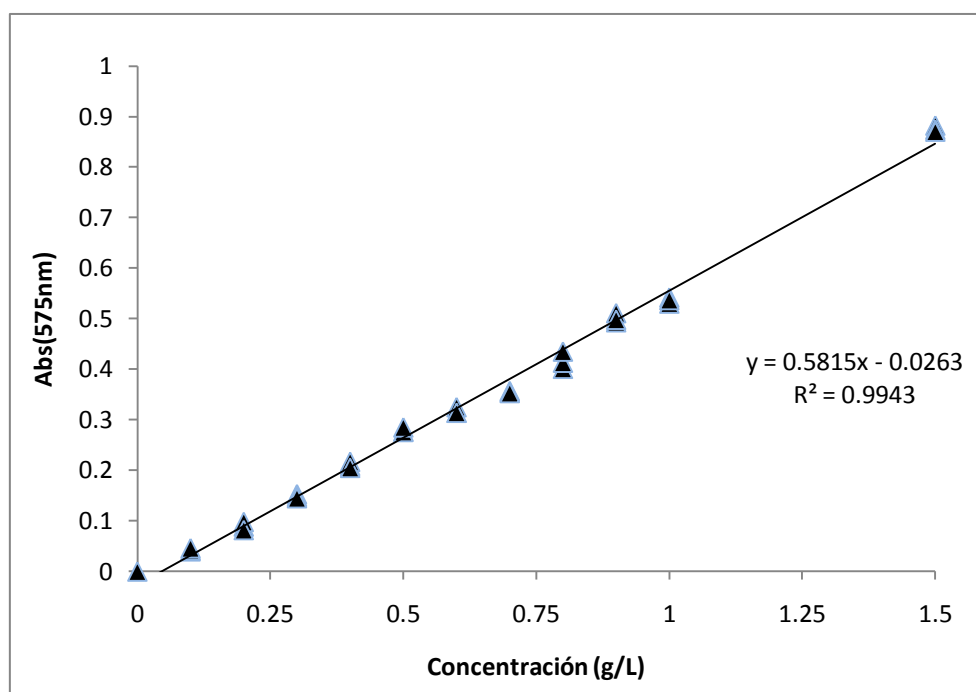


Figura A.1.3. Curva de calibración para determinación de azúcares con método de Miller.



## Curva de ácido (Ácido acético)

Procedimiento:

Preparar soluciones patrón de ácido acético de 1000 y 5000  $\mu\text{g/L}$

Se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de solución de ácido acético a dilución requerida en un pozo de microplaca.

Se agregan 30  $\mu\text{L}$  de solución de resazurina 0.01% (p/v).

Se determina la absorbancia a 690nm.

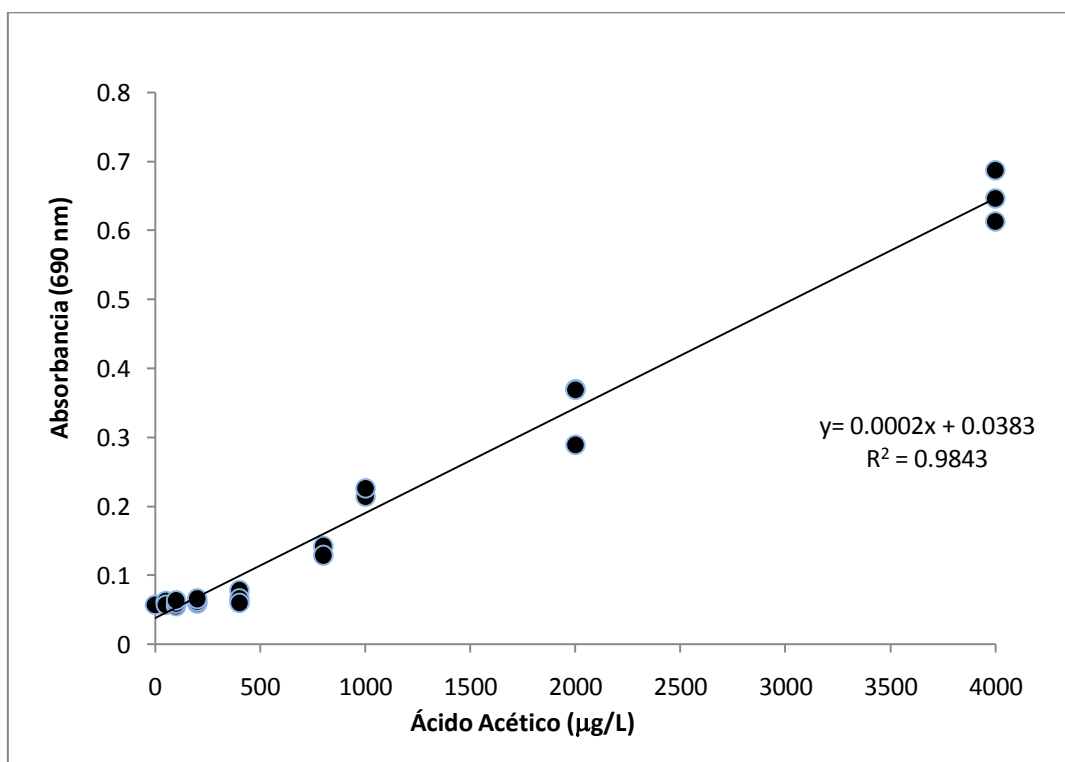


Figura A.I.4. Curva de calibración para determinación de ácido acético con resazurina.

## Curva de Glucosamina

### Método de Kauss y Bauch.

Procedimiento:

Preparar una solución de Glucosamina a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ .

En tubos de ensaye preparar diluciones de 0 a 0.1  $\mu\text{g/mL}$ .

Proceder de igual forma que en la determinación pero sustituyendo 50  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático por solución de glucosamina a diferentes diluciones.

Se determina absorbancia a 650nm.

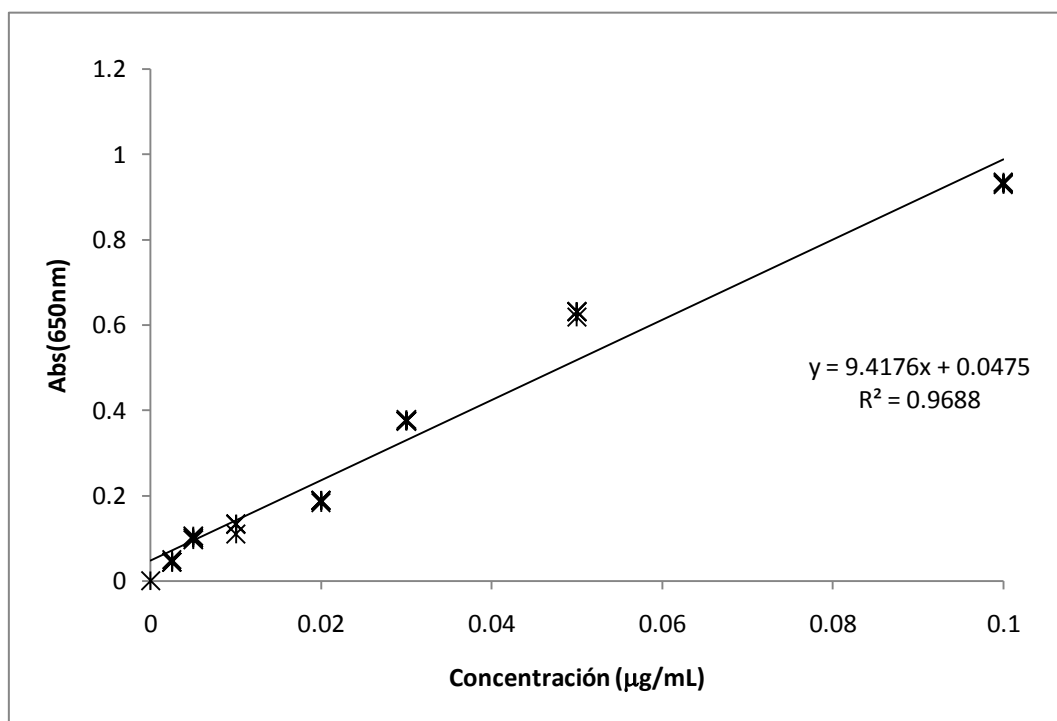


Figura A.I.5. Curva de calibración para determinar glucosamina para determinación de CDAs con método de Kauss y Bauch.

## ANEXO II. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

### Reactivo A

Reactivos previos:

- a) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio

Se disuelven en 250mL de agua destilada: 25g de carbonato de sodio, 0.25g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5g de tartrato de sodio y potasio.

- b) Solución de dodescil sulfato de sodio (SDS)

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

- c) Solución de hidróxido de sodio

Se disuelven 8g de hidróxido de sodio en 250mL de agua destilada.

Se mezclan las soluciones a, b y c aforándose con agua destilada a 1L.

### Reactivo B

Es una solución de Fenol-Folin Ciocalteu y agua destilada en proporción 1:1.

### Reactivo DNS

Disolver:

- 2.5g de ácido 3,5-dinitrosalicílico
- 2.5g de hidróxido de sodio
- 0.125g de sulfito de sodio anhidro
- 0.5g de fenol

Aforar a 1L con agua destilada

Almacenar por no más de una semana, protegido de la luz.

## ANEXO III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

### Selección del hongo productor de quitina desacetilasas

Tabla A.III.1. Claves de cepas utilizadas.

Género	Clave	Clave de ANOVA
<i>Aspergillus</i>	M2T2	1
<i>Aspergillus</i>	M6T4	3
<i>Aspergillus</i>	M9T6	4
<i>Aspergillus</i>	H11	6
<i>Aspergillus</i>	M9T4	10
<i>Colletotrichum</i>	M7T5	2
<i>Colletotrichum</i>	M2T3	9
<i>Rhizopus</i>	H10	5
<i>Rhizopus</i>	H5	8
<i>Mucor</i>	H42	7

Tabla A.III.2. Descriptivos de análisis estadístico de selección de hongo productor de CDAs.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1.00	12	.2944800	.24961707	.07205824	.1358809	.4530791	.00000	.74302	
2.00	12	.4780540	.29799104	.08602260	.2887196	.6673885	.02713	.95246	
3.00	12	.5401709	.42186273	.12178128	.2721321	.8082097	.00000	1.35610	
4.00	12	.5586156	.30339783	.08758341	.3658458	.7513854	.00000	.95627	
5.00	12	.3472357	.42191480	.12179631	.0791639	.6153076	.00000	1.27613	
6.00	12	.8730476	.56327235	.16260272	.5151614	1.2309338	.00000	1.77116	
7.00	12	.2865468	.30783898	.08886546	.0909553	.4821384	.00000	.81918	
8.00	12	.2027327	.33909482	.09788824	-.0127179	.4181832	-.22800	.72779	
9.00	12	.3510437	.28030237	.08091632	.1729480	.5291393	.00000	.88772	
10.00	12	.0683841	.10598215	.03059441	.0010463	.1357219	.00000	.27084	
Total	120	4.000311	.39756129	.03629221	.3281689	.4718933	-.22800	1.77116	
Model	Fixed Effects		.34870695	.03183244	.3369467	.4631156			
	Random Effects			.07092591	.2395856	.5604767			.04017180

Tabla A.III.3. ANOVA de U/g SSI de todas las cepas durante la cinética ( $\alpha=0.05$ ).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.433	9	.604	4.964	.000
Within Groups	13.376	110	.122		
Total	18.809	119			

Tabla A.III.4. Agrupación de cepas según Tukey y Duncan.

VAR00003	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD <sup>a</sup>	10.00	12	.0683841			
	8.00	12	.2027327	.2027327		
	7.00	12	.2865468	.2865468		
	1.00	12	.2944800	.2944800		
	5.00	12	.3472357	.3472357		
	9.00	12	.3510437	.3510437		
	2.00	12	.4780540	.4780540	.4780540	
	3.00	12		.5401709	.5401709	
	4.00	12		.5586156	.5586156	
	6.00	12			.8730476	
	Sig.		.125	.280	.158	
Duncan <sup>a</sup>	10.00	12	.0683841			
	8.00	12	.2027327	.2027327		
	7.00	12	.2865468	.2865468	.2865468	
	1.00	12	.2944800	.2944800	.2944800	
	5.00	12	.3472357	.3472357	.3472357	
	9.00	12	.3510437	.3510437	.3510437	
	2.00	12		.4780540	.4780540	
	3.00	12			.5401709	
	4.00	12			.5586156	
	6.00	12				.8730476
	Sig.		.085	.093	.103	1.000

### Establecimiento de la relación C/N

Tabla A.III.5. Descriptivos de análisis estadístico de establecimiento de relación C/N.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
6.50	8	.016819	.0057717	.0020406	.011994	.021644	.0073	.0265	
13.80	16	.022588	.0056204	.0014051	.019593	.025583	.0114	.0309	
20.00	16	.026254	.0142524	.0035631	.018659	.033848	.0109	.0539	
30.00	16	.007312	.0024234	.0006058	.006021	.008603	.0040	.0132	
40.00	16	.009294	.0032610	.0008153	.007557	.011032	.0036	.0138	
Total	72	.016413	.0108111	.0012741	.013872	.018953	.0036	.0539	
Model			.0077282	.0009108	.014595	.018231			
Fixed Effects				.0039750	.005376	.027449			
Random Effects									.0000713

Tabla A.III.6. ANOVA de Actividad específica de *C. gloeosporioides* a diferentes C/N ( $\alpha=0.05$ ).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	4	.001	17.986	.000
Within Groups	.004	67	.000		
Total	.008	71			

Tabla A.III.7. Agrupación de relaciones C/N según Tukey y Duncan.

CN	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD <sup>a</sup> <sub>..b</sub>	30.00	16	.007312			
	40.00	16	.009294	.009294		
	6.50	8		.016819	.016819	
	13.80	16			.022588	.022588
	20.00	16				.026254
	Sig.		.964	.100	.313	.737
Duncan <sup>a..b</sup>	30.00	16	.007312			
	40.00	16	.009294			
	6.50	8		.016819		
	13.80	16		.022588	.022588	
	20.00	16			.026254	
	Sig.		.510	.058	.225	

### Efecto de Inductores

Tabla A.III.8. Claves de Inductores utilizados

Inductor	Clave	Clave de ANOVA		Clave de MANOVA
		Efecto Inductores (cinética)	Efecto Inductores (72h)	Efecto de Concentración Inductores
Control líquido			1	
Control Sólido			2	
Control		1		
Hoja de limón	Hoja	2	3	
N-Acetil Glucosamina	NAcGlc	3	4	
Glucosamina	Glc	4	5	4
Quitosano DA 36%	Q36%DA	5	6	5
Ácido Giberélico	GA <sub>3</sub>	6	7	1
Ácido Abscísico	ABA	7	8	2
Ácido Indol Acético	IAA	8	9	3

## Efecto de Inductores en cinética

Tabla A.III.9. Descriptivos de análisis estadístico del efecto de inductores.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	32	.01457	.010311	.001823	.01086	.01829	.000	.031	
2	24	.04709	.046608	.009514	.02741	.06677	.000	.134	
3	32	.05578	.033870	.005988	.04357	.06799	.000	.096	
4	32	.05266	.033134	.005857	.04071	.06460	.000	.095	
5	32	.06056	.032837	.005805	.04872	.07240	.001	.112	
6	32	.01150	.010818	.001912	.00760	.01540	.000	.033	
7	32	.02978	.034743	.006142	.01726	.04231	.000	.118	
8	32	.00984	.010167	.001797	.00618	.01351	.000	.029	
Total	248	.03484	.034902	.002216	.03048	.03921	.000	.134	
Model			.028906	.001836	.03123	.03846			
Fixed Effects									
Random Effects				.007633	.01679	.05289			.000436

Tabla A.III.10. ANOVA de Actividad específica de *C. gloeosporioides* con diferentes inductores ( $\alpha=0.05$ ).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.100	7	.014	17.158	.000
Within Groups	.201	240	.001		
Total	.301	247			

Tabla A.III.11. Agrupación de relaciones inductores según Tukey y Duncan.

	Trat	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup> .,b	8	32	.00984		
	6	32	.01150		
	1	32	.01457		
	7	32	.02978	.02978	
	2	24		.04709	.04709
	4	32			.05266
	3	32			.05578
	5	32			.06056
	Sig.			.127	.273
Duncan <sup>a,.b</sup>	8	32	.00984		
	6	32	.01150		
	1	32	.01457		
	7	32		.02978	
	2	24			.04709
	4	32			.05266
	3	32			.05578
	5	32			.06056
	Sig.			.550	1.000

## Efecto de Inductores a 72h de cultivo

Tabla A.III.12. Descriptivos de análisis estadístico de efecto de inductores a 72h de cultivo.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	2	.3984	.09963	.07045	-.4967	1.2935	.33	.47	
2	8	.2961	.05405	.01911	.2509	.3413	.24	.40	
3	6	4.6911	.16072	.06561	4.5224	4.8597	4.49	4.88	
4	8	3.1596	.32372	.11445	2.8890	3.4303	2.86	3.68	
5	8	3.3579	.24309	.08595	3.1547	3.5612	3.11	3.76	
6	8	3.0930	.47057	.16637	2.6996	3.4864	2.39	3.63	
7	8	.8776	.38348	.13558	.5570	1.1982	.00	1.23	
8	8	.7683	.31186	.11026	.5075	1.0290	.25	1.19	
9	8	.0803	.12080	.04271	-.0207	.1813	.00	.29	
Total	64	1.9063	1.60692	.20086	1.5049	2.3077	.00	4.88	
Model	Fixed Effects		.29136	.03642	1.8334	1.9793			
	Random Effects			.57777	.5740	3.2387			2.79077

Tabla A.III.13. ANOVA de U/g SSI de *C. gloeosporioides* a 72h de cultivo con inductor ( $\alpha=0.05$ ).

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	158.009	8	19.751	232.658	.000
Within Groups	4.669	55	.085		
Total	162.678	63			

Tabla A.III.14. Agrupación de inductores según Tukey y Duncan.

INDUCTOR	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>	9	.0803				
..b	2	.2961	.2961			
	1	.3984	.3984	.3984		
	8		.7683	.7683		
	7			.8776		
	6				3.0930	
	4				3.1596	
	5				3.3579	
	3					4.6911
Sig.		.640	.149	.136	.825	1.000
Duncan <sup>a..b</sup>	9	.0803				
	2	.2961				
	1	.3984				
	8		.7683			
	7		.8776			
	6			3.0930		
	4			3.1596		
	5			3.3579		
	3				4.6911	
Sig.		.083	.524	.148	1.000	



## Efecto Concentración de Inductores a 72h de cultivo

Tabla A.III.15. Agrupación de concentraciones según Tukey y Duncan

	Concentr	N	Subset				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a..b</sup> ..c	230.00	31	.0120541				
	.23	31	.0135883				
	2000.00	12		.0251178			
	1000.00	12			.0616637		
	2.30	31				.0791619	
	23.00	31					.0896551
	Sig.			.996	1.000	1.000	1.000
Duncan <sup>a..b..c</sup>	230.00	31	.0120541				
	.23	31	.0135883				
	2000.00	12		.0251178			
	1000.00	12			.0616637		
	2.30	31				.0791619	
	23.00	31					.0896551
	Sig.			.618	1.000	1.000	1.000

Tabla A.III.16. Agrupación de inductores según Tukey y Duncan.

	IndClave	N	Subset		
			1	2	3
Tukey HSD <sup>a..b</sup> ..c	5.00	40	.0215356		
	4.00	36	.0236244		
	3.00	24		.0650048	
	1.00	24			.0779658
	2.00	24			.0802676
	Sig.			.930	1.000
Duncan <sup>a..b..c</sup>	5.00	40	.0215356		
	4.00	36	.0236244		
	3.00	24		.0650048	
	1.00	24			.0779658
	2.00	24			.0802676
	Sig.			.424	1.000

Tabla A.III.17. MANOVA de efecto de Actividad específica a 72h de cultivo con inductor ( $\alpha=0.05$ ).

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Inductor	4	2.899322E-03	7.248305E-04	0.11	0.978368	0.067783
B: Concentración	5	0.1864382	3.728763E-02	371.90	0.000000*	
AB	20	0.1343173	6.715865E-03	66.98	0.000000*	
S	118	1.183111E-02	1.002637E-04			
Total (Adjusted)	147	0.4328621				
Total	148					

\* Term significant at alpha = 0.05

### Efecto de interacción de Inductor y Concentración.

Term	Count	Mean	Standard Error
AB: Inductor,Concentración			
1,0.23	6	1.641333E-02	4.087862E-03
1,2.3	6	0.1524133	4.087862E-03
1,23	6	0.139	4.087862E-03
1,230	6	0.004035	4.087862E-03
1,1000	0	0.0608681	0
1,2000	0	-0.1609862	0
2,0.23	6	2.341667E-02	4.087862E-03
2,2.3	6	0.1405483	4.087862E-03
2,23	6	0.1571083	4.087862E-03
2,230	6	-2.63678E-16	4.087862E-03
2,1000	0	5.144167E-02	0
2,2000	0	-0.2692583	0
3,0.23	6	2.206667E-03	4.087862E-03
3,2.3	6	9.570166E-02	4.087862E-03
3,23	6	0.1329433	4.087862E-03
3,230	6	2.916833E-02	4.087862E-03
3,1000	0	0.08061	0
3,2000	0	-6.236333E-02	0
4,0.23	6	0.025595	4.087862E-03
4,2.3	6	1.482667E-02	4.087862E-03
4,23	6	0.008475	4.087862E-03
4,230	6	0.006415	4.087862E-03
4,1000	6	5.785667E-02	4.087862E-03
4,2000	6	2.857833E-02	4.087862E-03
5,0.23	7	2.208571E-03	3.784625E-03
5,2.3	7	4.725714E-03	3.784625E-03

## ANEXO IV. ESPECTROS.

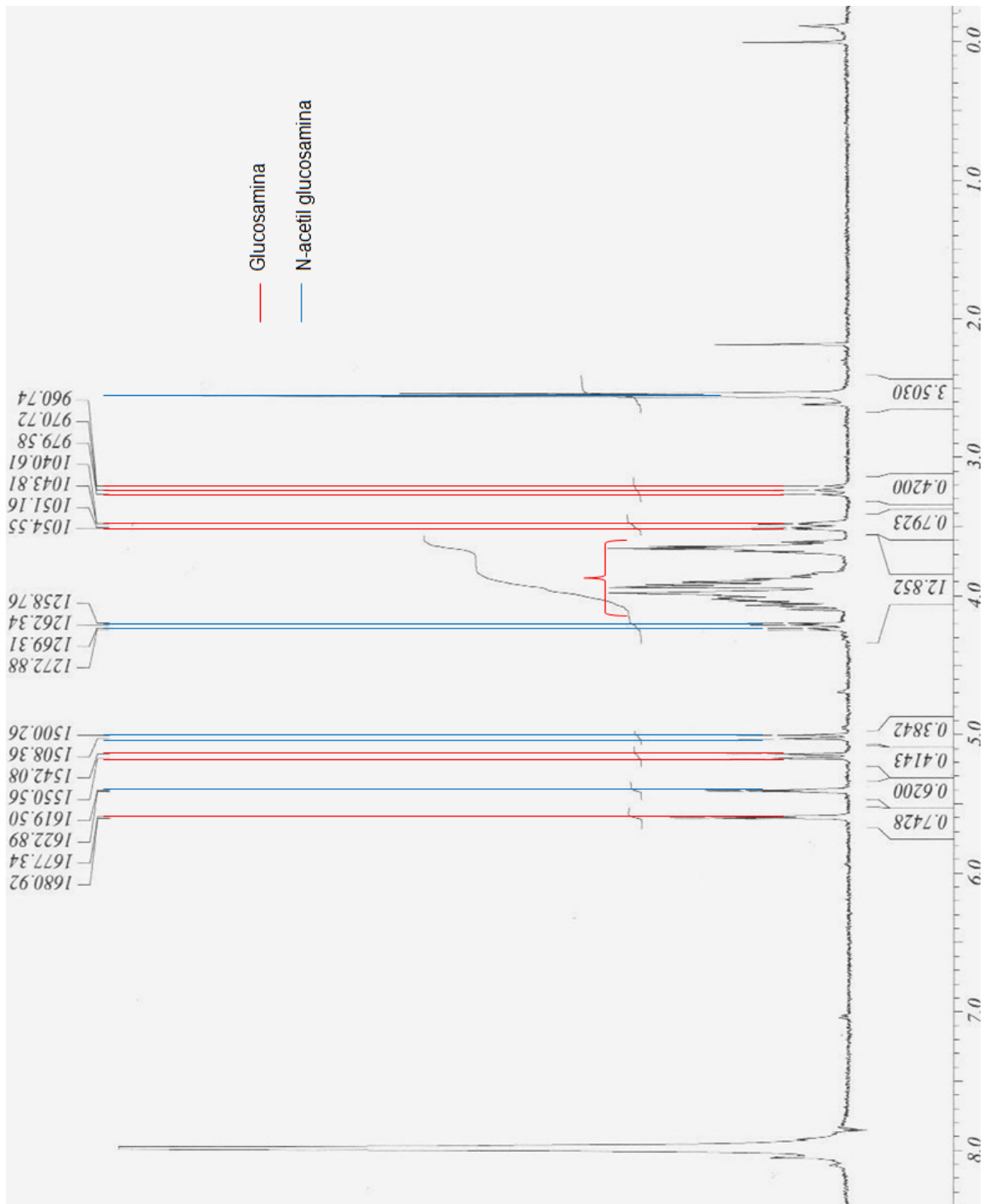


Figura A.IV.1 Espectro  $^1\text{H-RMN}$  de mezcla (1:1) de N-acetil glucosamina y glucosamina.

## TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESO

XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 20 a 24 de Junio 2011.  
Querétaro, México.

Trabajo: Selección de hongos fitopatógenos productores de quitina desacetilasas.

Trabajo: Hoja de limón y quitosano como inductores para producción de quitina desacetilasas de *Colletotrichum gloeosporioides* en cultivo líquido y sólido.

Iztapalapa, D.F. a 5 de septiembre de 2011.

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

Estudio del efecto de la adición de inductores sobre la producción de quitina  
desacetilasas de hongos fitopatógenos.

que presentó

I.B.I. Diana Carolina De Santiago Uribe

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

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

Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Departamento de Biotecnología

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Vocal: Dra. Neith Pacheco López

Vocal: Dr. Alberto López Luna

