



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

USO DE PREPARACIONES CRUDAS DE LAS QUITINASAS
DE *Serratia marcescens* PARA LA OBTENCION
DE PROTOPLASTOS DE *Aspergillus niger*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JUAN MORALES HERNANDEZ



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. FEBRERO DE 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de tesis fue realizada en el Laboratorio de Enzimas Microbianas del Departamento de Microbiología de la ENCB del IPN, bajo la dirección del Dr. Ramón Cruz Camarillo y co-asesora la M. en C. Griselda Ma. Chávez Camarillo.

La investigación se llevó a cabo con el apoyo de la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI) del IPN, bajo el programa DEPI-920802 "Aprovechamiento integral de subproductos proteín-quitinosos por vía fermentativa", y corresponde específicamente a los proyectos:

DEPI-92086 "Acción antifúngica de las enzimas quitinolíticas de *Serratia marcescens*".

DEPI-93674 "Empleo de las quitinasas para la liberación de enzimas fúngicas intracelulares de interés biotecnológico".

DEPI-941549 "Empleo de las quitinasas extracelulares de *Serratia marcescens* formadas durante la fermentación de subproductos proteín-quitinosos para la producción de protoplastos fúngicos".

DEDICATORIA

Para que pudiera realizarse la ilusión que tuve un día, ha sido gracias al resultado de un esfuerzo que tuvo como respaldo primordial el aliento e invaluable apoyo de mis **Padres**:

PETRA ISABEL HERNANDEZ DE MORALES
y **JOSE MORALES TELLEZ**,

y de mis **Hermanos**:

Martín, Micaela, Ma. Guadalupe, Rubén, Hilda,
Elvia, José Carlos y a la memoria de Ma. Isabel,

a quienes con todo respeto y cariño dedico esta tesis.

A mis **Sobrinitos**: Luis Enrique, Edgar, Erick, Eber y Angel,

quienes me han enseñado a valorar más a la niñez, deseando lo mejor en sus vidas.

A tí **Adela**: porque siempre estabas ahí cuando necesité de tí, por brindarme tu apoyo, por motivarme a seguir adelante, por tu paciencia y comprensión.

A mis **Amigos y Compañeros de la UNAM-Iztacala**: quienes siempre me infundieron palabras de optimismo, juzgando no ser necesario nombrarlos ya que al leer estas líneas sabrán quiénes son.

A mis **Compañeros tesistas**: Irma, Martha, Lupita, Luz, Noemí, Rocío, Chela, Claudia, Patricia, Ana y José Luis, por los momentos compartidos en la ENCB-IPN.

A mis **Tíos**, particularmente, a **L. Miguel Hernández**, porque siempre se preocupó por guiarme y enseñarme a ser fiel conmigo mismo y con mis semejantes.

AGRADECIMIENTOS

Me complace agradecer al **Dr. Ramón Cruz Camarillo**, Jefe del Laboratorio de Enzimas Microbianas del Departamento de Microbiología de la ENCB, por su asesoría y revisión del presente trabajo, y a la **M. en C. Griselda Ma. Chávez Camarillo**, reiterándole las gracias por su paciencia como co-asesora en la parte experimental.

Así mismo, debo dar las gracias a un número de personalidades, que amablemente, me auxiliaron en el desarrollo de esta tesis. A este respecto, quiero agradecer particularmente a la **Biol. Rosalía Torres Bezaury** y a la **M. en C. Milagros Gómez Nieto** del Laboratorio de Genética, por las facilidades otorgadas para el uso del microscópio binocular de contraste de fases, fundamental para las microfotografías. Por otra parte, estoy enormemente agradecido con el Laboratorio de Bacteriología Médica, especialmente con la **Q.B.P. Graciela Castro Escarpulli** y al **Q.B.P. José Luis Munguía**, por permitirme trabajar con el equipo de cómputo del laboratorio y al asesoramiento personal del programa computacional, respectivamente, sin cuya ayuda no hubiera sido posible avanzar en el desarrollo del escrito.

A todos ellos mi gratitud como personas y mi reconocimiento como profesionales.

También estoy especialmente agradecido a los siguientes profesores, que como Miembros de la Comisión Dictaminadora, leyeron críticamente una copia del trabajo antes de que se preparara la redacción definitiva:

Biol. Irene Frutis Molina.

Dr. Ramón Cruz Camarillo.

Dr. Víctor Rivera Aguilar.

Biol. J. Gerardo Ortis Montiel.

M. en C. José Luis Sánchez Vargas.

Hago patente mi agradecimiento a la **Sala de Cómputo** de la **ENCB**, por facilitarme concluir el escrito y a la impresión de la misma.

Quiero dar las gracias a todos los autores de los libros (tesis) y revistas con los que me permití citar información y usar algunas ilustraciones extraídas de obras publicadas por ellos.

Me es grato agradecer a la **UNAM Campus IZTACALA**, por haberme permitido permanecer parte de mi vida en sus instalaciones y haber adquirido enormes conocimientos tanto en las ciencias como en las humanidades.

Finalmente, también deseo hacer extensivo mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas, que de alguna manera, contribuyeron a la realización de esta tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	7
1.0. INTRODUCCION	9
1.1. DEFINICIÓN DE PROTOPLASTO Y ESFEROPLASTO	9
1.2. ENZIMAS LÍTICAS DE PARED Y ALGUNAS DE SUS APLICACIONES	10
1.3. GENERALIDADES SOBRE LA PARED CELULAR DE HONGOS	13
1.3.1. FUNCIONES	13
1.3.2. COMPOSICION QUIMICA	13
1.4. COMPOSICION DE LA PARED CELULAR DE <i>Aspergillus niger</i>	16
1.5. LA QUITINA, SU ESTRUCTURA Y POSIBLES USOS	16
1.6. DEGRADACION MICROBIANA-ENZIMATICA DE SUBPRODUCTOS SOLIDOS INSOLUBLES. EL CASO DE LA QUITINA	18
1.7. DEGRADACION MICROBIOLÓGICA DE LOS DESECHOS PROTEIN-QUITINOSOS, POSIBLES USOS DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACION	20
1.8. LAS QUITINASAS DE <i>Serratia marcescens</i>	26
1.9. CONDICIONES PARA LA OBTENCION DE PROTOPLASTOS	27
1.10. OBJETIVOS	30
1.11. METAS	30
2.0. MATERIALES Y METODOS	32
3.0. RESULTADOS Y DISCUSION	41
4.0. CONCLUSIONES	78
5.0. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

RESUMEN

La fermentación de los desperdicios del camarón por *S. marcescens*, origina un caldo en el que coexisten proteasas, quitinasas, y quitobiasas. El presente trabajo concierne específicamente al empleo de las enzimas quitinolíticas de esta bacteria para hidrolizar la pared celular del hongo filamentoso *A. niger*, y comprendió dos aspectos:

El primero, es la obtención de protoplastos fúngicos. El segundo, se refiere a la evaluación del fenómeno lítico mediante diferentes procedimientos y además al estudio de la participación de las proteasas en el proceso.

Cabe destacar que las quitinasas no tienen un uso práctico establecido. Potencialmente podrían ser útiles en la formulación de bioinsecticidas y antimicóticos.

En este trabajo se demuestra que después de la fermentación de los subproductos proteín-quitinosos, los sobrenadantes contienen quitinasas capaces de digerir la pared celular de *A. niger* en presencia de KCl 0.6 M, originando una significativa producción de protoplastos en tan sólo 3 h. Estos pueden purificarse por filtración y ulterior centrifugación.

La eficiencia de conversión es función de la concentración de la enzima, y del tiempo de incubación. Los protoplastos siguen viables después de 24 h, y presentan una tendencia a su fusión. Todo este proceso fue seguido por observación microscópica y documentada por microfotografías.

Así mismo, las quitinasas de *S. marcescens* dañan la pared micelial de *A. niger* bajo tres formas distintas: un ataque a la zona apical, que es la más sensible a la acción lítica; otro sobre zonas puntuales de la pared, de la cual emergen protuberancias celulares; y un ataque extensivo a lo largo de toda la pared.

La segunda parte del trabajo consistió en estudiar la acción lítica de las quitinasas en ausencia de estabilizadores osmóticos, con objeto de implementar una técnica que permitiera su evaluación cuantitativa y a la optimización de la lisis micelial. Al respecto, se ensayaron cuatro procedimientos:

a) Disminución de la turbiedad ($AS_{620 \text{ nm}}$) de suspensiones miceliales de *A. niger* (método turbidimétrico). b) Disminución de la masa micelial (método gravimétrico). c) Evaluación de la N-acetil-D-

glucosamina liberada por la acción de las quitinasas (AS_{535nm}) (método de Miller). d) incremento en la liberación de proteínas intracelulares solubles (método de Lowry).

La técnica adoptada fue la disminución de la turbiedad a 620 nm de las suspensiones miceliales, y con este ensayo se probaron diferentes condiciones, encontrando los valores óptimos para la lisis a una concentración de enzima de 40-50 UQ/ml, una concentración de sustrato de 50 mg/ml (peso húmedo), un pH de 6.5, 37°C y 110 rpm.

Por otra parte, se demostró que si las quitinasas-quitobiasas eran inhibidas por agentes mercuriales, las proteasas presentes en el extracto crudo eran incapaces de producir un efecto lítico, al menos en las 5 h que duraban los ensayos.

1.0. INTRODUCCION.

1.1. DEFINICION DE PROTOPLASTO Y ESFEROPLASTO.

A lo largo de más de dos décadas, se ha generado una extensa literatura de trabajos sobre la liberación de protoplastos, particularmente en hongos filamentosos (58, 59, 62, 63, 68, 87, 88), empleando las enzimas líticas de algunos microorganismos que degradan la pared celular (5, 46, 73, 81, 82, 84, 85).

El proceso de liberación de los protoplastos, depende en gran medida de la hidrólisis de los polisacáridos, los cuales constituyen los principales componentes de la pared celular de los hongos (8).

La acción lítica involucra una completa o parcial destrucción de la pared, permitiendo la salida del contenido celular, en forma de esfera discreta cubierta por una membrana plasmática, la cual ha sido descrita como protoplasto o esferoplasto (63).

La diferencia en terminología, es un reflejo de la incertidumbre acerca de la presencia o ausencia de residuos de la pared, asociada a la membrana plasmática. En consecuencia, el término "protoplasto", es normalmente usado para describir a una estructura desprovista completamente de pared, y que sólo consiste de una membrana celular y todos los componentes intracelulares íntegros; en tanto que "esferoplasto", es normalmente referido a una estructura en la que sólo se ha eliminado parcialmente la pared celular (16).

Por otra parte, la adopción de una forma esférica por la pérdida de rigidez y la presencia de fragilidad o sensibilidad osmótica, son criterios suficientes para que, en el caso de las células fúngicas, el resultante sea considerado como protoplasto (87).

Los mismos autores (16, 87) coinciden en señalar que los términos protoplasto y esferoplasto, pueden ser empleados indistintamente para las células fúngicas. Nosotros adoptaremos el término protoplasto.

1.2. ENZIMAS LÍTICAS DE PARED Y ALGUNAS DE SUS APLICACIONES.

El interés en este tipo de enzimas viene de hace más de 25 años, gracias a la preocupación de muchos microbiólogos por descubrir la naturaleza química y ultraestructura de la pared celular de los hongos. Estas enzimas constituyeron una herramienta que se empleó para remover los componentes de la pared, mediante una técnica conocida como "disección enzimática", siendo el punto de partida para la aplicación, en lo sucesivo, de enzimas líticas para la liberación de protoplastos (67).

El primer reporte de una enzima, de origen microbiano, que atacaba a la quitina de la pared celular, apareció en los inicios de este siglo (1905), y años después, en 1914, fue publicada la primera descripción de una lisis celular (67).

La obtención de protoplastos en hongos filamentosos, fue primeramente reportado en *Neurospora crassa*, usando una preparación de enzimas líticas del caracol de jardín *Helix pomatia* (6, 21). Estas enzimas eran obtenidas del jugo digestivo del caracol, las cuales contenían numerosas carbohidrasas, incluyendo quitinasas y β -glucanasas. Así mismo, se sabe que la combinación de enzimas del caracol con quitinasa comercial, eleva la producción de protoplastos de *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* (82). Otros trabajos (26, 27), también influyeron en el empleo de enzimas de origen microbiano, que ahora son de uso común.

Varias especies de *Streptomyces* y *Micromonospora*, se han caracterizado también por producir complejos enzimáticos capaces de degradar la pared celular de numerosos hongos filamentosos (27, 88).

Cabe destacar que estas propiedades líticas, no son exclusivas de estos microorganismos, sino que también en ciertos hongos, son fuentes potenciales de este tipo de enzimas (42, 46, 54, 67, 89).

Por lo general, estas enzimas son inducibles, añadiendo en el medio de crecimiento sustratos inductores, tales como preparaciones crudas de micelio (28), paredes celulares purificadas (18, 89), y algunos polisacáridos como quitina y laminarina (20, 61).

En muchas instancias, estos complejos enzimáticos han sido elaborados como productos comerciales (Tabla 1). Esta diversidad de enzimas, tanto de origen animal (*Helix pomatia*) como de microorganismos, han facilitado el desarrollo de modelos enzimáticos para la degradación de la pared celular de hongos, lo que ha permitido:

a) La liberación de enzimas intracelulares de hongos de importancia médica, para la formulación de antimicóticos de uso tópico; y de importancia industrial para el combate de hongos fitopatógenos y en la producción de bioinsecticidas (3, 7, 19, 43, 90).

b) La preparaciones de protoplastos, los cuales son empleados en :

i) Algunos casos de ingeniería genética como herramienta para el intercambio del material genético mediante la fusión (15, 35, 39, 66).

ii) Estudios de la regeneración y reversión de protoplastos (30, 59, 63, 64, 88).

iii) La extracción de componentes intracelulares, como enzimas, proteínas y otros organelos subcelulares (47, 68).

c) En el estudio de la síntesis y composición de la pared celular (18, 65, 74).

TABLA I. ALGUNAS ENZIMAS DISPONIBLES COMERCIALMENTE PARA LA OBTENCION DE PROTOPLASTOS.

NOMBRE	INDUSTRIA PROVEEDORA
β -D-glucuronidasa	Sigma London Chemical Company Ltd., Poole.
Quitinasa	Sigma London Chemical Company Ltd., Poole.
Gusulasa	Endo Laboratories, New York.
Celulasa CP	John y E. Sturge Ltd., Selby, UK.
Celulasa CT	John y E. Sturge Ltd., Selby, UK.
Celulasa	Merck, Darmstadt, Alemania.
Lisozima	Merck, Darmstadt, Alemania.
Zimoliasa	Kirin Breweries Co. Ltd., Takasaki, Japón.
Driselasa	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokio, Japón.
Helicasa	L' Industrie Biologique, Grenneville, Francia.
β -D-glucanasa	BDH Chemical Ltd., Poole.
Enzima lítica L ₁	BDH Chemical Ltd., Poole.
Novozym 234	Novo Enzyme Product Ltd., Windsor.
Cereflo 200L	Novo Enzyme Product Ltd., Windsor.

Datos tomados de las refs. 33, 67.

1.3. GENERALIDADES SOBRE LA PARED CELULAR DE HONGOS.

1.3.1. FUNCIONES.

La pared determina la forma de las células, ya que si se elimina mediante la aplicación de enzimas, los protoplastos resultante siempre serán esféricos. Actúa también como una interfase entre el hongo y su medio: protege a la célula de la lisis osmótica y posiblemente de los metabolitos de otros organismos (24). El modo de crecimiento (como hifa o como levadura) y de sus distintas estructuras diferenciadas que puede producir, son consecuencia directa de los componentes de la pared y de la forma en que éstos se ordenan durante su crecimiento (65, 74). En muchos casos, sirve como una fuente de reserva de carbohidratos, los cuales pueden ser reutilizados bajo condiciones limitadas o en ciertos estadios del ciclo celular (24).

1.3.2. COMPOSICION QUIMICA.

La variada funcionalidad de la pared es, sin duda alguna, un reflejo de su composición química y de la organización espacial de sus componentes (25). Al respecto, la información existente sobre esta temática es notable (8, 23, 24, 25, 74). En uno de estos trabajos, predomina la afirmación de que la composición química de la pared celular, difiere tanto cualitativa como cuantitativamente en los distintos grupos de hongos, correlacionándose estrechamente en su clasificación taxonómica (8).

Generalmente hablando, las paredes celulares de los hongos están compuestas de homo y heteropolisacáridos, proteínas, complejos proteín-polisacáridos y cantidades variables de constituyentes menores como lípidos y melaninas (8, 23).

En muchos hongos, los polisacáridos representan el 80 a 90% de la materia seca de sus paredes celulares (23). De acuerdo con su función, son clasificados en dos grupos: polisacáridos

esqueléticos o fibrilares y polisacáridos amorfos o matriciales. Los polímeros lineales de N-acetil-D-glucosamina y glucosa, constituyen los elementos químicos básicos de la quitina, celulosa, no celulósicos β -glucanas y α -glucanas. Son polisacáridos insolubles, de alta cristalinidad, cuya función es dar sostén a la pared manteniendo la forma. Los polisacáridos de la matriz, son generalmente amorfos, o insignificanamente cristalinos, conformados por otros azúcares en forma de homo- y heteropolímeros, incluyendo galactosa, polímeros de galactosamina y polímeros de manosa (mananas); además de glucanas (polímeros de glucosa) con frecuencia asociados químicamente con proteínas, formando complejos proteína-polisacáridos, que rellenan los espacios entre los polisacáridos fibrilares, sirviendo como sustancias cementantes (24). Comúnmente se distinguen dos tipos de glucanas: R-glucanas, compuestas de unidades D-glucosa eslabonados entre sí por cadenas ramificadas con enlaces glicosídicos β -(1, 3), y algunos enlaces β -(1, 6). Son insolubles en álcali, comprendiendo un 20 o 30% de los polisacáridos esqueléticos típicos de la pared; y las S-glucanas, en forma de microfibrillas irregulares y gruesas, solubles en álcali, comprendiendo 15 a 20% de los polisacáridos fibrilares de la pared, compuestas por unidades de D-glucosa con enlaces α -(1, 3) (25).

En las tablas 2 y 3, se presentan ejemplos del análisis resultante de hidrolizados químicos de la pared celular de los hongos filamentosos *A. niger* y *A. nidulans* y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así como de otros hongos representativos de diferentes grupos taxonómicos.

Por otra parte, la arquitectura de los componentes de la pared celular, es uno de los rasgos más característicos de los hongos, y dando un panorama general, los constituyentes microfibrilares β -glucana, quitina y la celulosa, están embebidos dentro de los polisacáridos amorfos y de una matriz de proteína-polisacáridos. La superficie externa de la pared en muchos hongos, es frecuentemente lisa o ligeramente reticular, dado que los polisacáridos microfibrilares del esqueleto son más prominentes sobre la superficie interna de la pared. Es, sin embargo, raro observar límites bien definidos entre los estratos, menos aún, cuando una capa se une o se funde dentro de otra (25). Esta característica multiestratificada, es la causa principal de la alta resistencia

TABLA 2. COMPOSICION QUIMICA DE LA PARED CELULAR DE ALGUNOS HONGOS

POR CIENTO EN BASE SECA			
COMPONENTE	<i>A. nidulans</i> ^a	<i>A. niger</i> ^b	<i>S. cerevisiae</i> ^a
Glucosa	39.0	72.8	35.2
Glucosamina	13.5	26.3	2.1
Manosa	4.0	5.1	20.0
Galactosa	9.0	14.4	-
Galactosamina	2.3	2.0	-
Proteína	3.5	2.5	15.6
Lípido	10.2	7.0	2.7

^aDatos reportados por (24).

^bDatos tomados de (38, 75).

TABLA 3. COMPOSICION DE LA PARED CELULAR DE HONGOS REPRESENTATIVOS DE DIFERENTES GRUPOS TAXONOMICOS.

PORCIENTO DEL PESO SECO			
COMPONENTE	PHYCOMYCETE ^A <i>Phytophthora</i> <i>heveae</i>	ASCOMYCETE ^B <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	BASIDIOMYCETE ^A <i>Agaricus</i> <i>bisporus</i>
Celulosa	36.0	-	-
Quitina	-	42.0	43.0
α -(1, 3)-glucana	-	49.0	14.0
β -(1, 3)-glucana	54.0	-	27.0
Lípido	2.5	7.0	1.5
Proteína	4.6-6.5	2.5	16.0

^ADatos tomados de (65).

^BSegún (38, 80).

mecánica, dada la naturaleza de las uniones de los componentes. En un caso particular, han sido descritas la existencia de enlaces covalentes entre la quitina y glucanas en *A. niger* (80).

1.4. COMPOSICION DE LA PARED CELULAR DE *Aspergillus niger*.

Colocado dentro de los ascomicetos, su pared micelial está constituida principalmente por una mezcla compleja de quitina y glucanas (8, 80).

Aún cuando una alta proporción de estos polisacáridos pueden ser solubilizados por tratamiento químico, una importante cantidad del residuo sigue insoluble. Estas pueden comprender más de la mitad del material de la pared celular y que consisten de una considerable proporción de quitina y glucanas (38). Los resultados logrados por medio de un proceso químico de éstos materiales permitieron cuantificar los residuos de anhidro-N-acetil-D-glucosamina (quitina) y los residuos de anhidro-D-glucosa (glucana), determinándose que la proporción de ambas, fue de 42.0 y 49.0, respectivamente (80).

Por otra parte, el resultado de una hidrólisis total de la pared celular, mostró mediante cromatografía en papel, la presencia de varios azúcares, entre ellos galactosa, manosa, galactosamina, glucosa y glucosamina, siendo éstos dos últimos, los azúcares presentes en mayor proporción (38, 75). demostrándose lo complejo de tales componentes (Tablas 2 y 3).

Similares características han sido reportadas también en *A. nidulans* (92).

1.5. LA QUITINA, SU ESTRUCTURA Y POSIBLES USOS.

La quitina es un material blanco en su forma pura, insoluble en agua, ácidos y álcalis diluidos, y disolventes orgánicos; soluble sólo en ácidos clorhídrico, sulfúrico, nítrico y fórmico anhidro, así como en soluciones concentradas de cloruro de litio y tiocianato de calcio (20).

Excepto en algunas diatomeas, la quitina no se encuentra pura en la Naturaleza, sino que esta asociada con proteínas, carbohidratos, carotenos y sales diversas, formando materiales de muy diversa textura y coloración, según la proporción de estas sustancias. Es componente estructural del exoesqueleto de invertebrados marinos, insectos, y desde luego, de hongos (37, 58).

Su molécula presenta una configuración lineal, que se asemeja a la celulosa en muchas formas, excepto que está constituida por N-acetil-D-glucosamina (NAG) en lugar de glucosa, unida por enlaces glicosídicos β -(1, 4), como muestra la fig. 1.

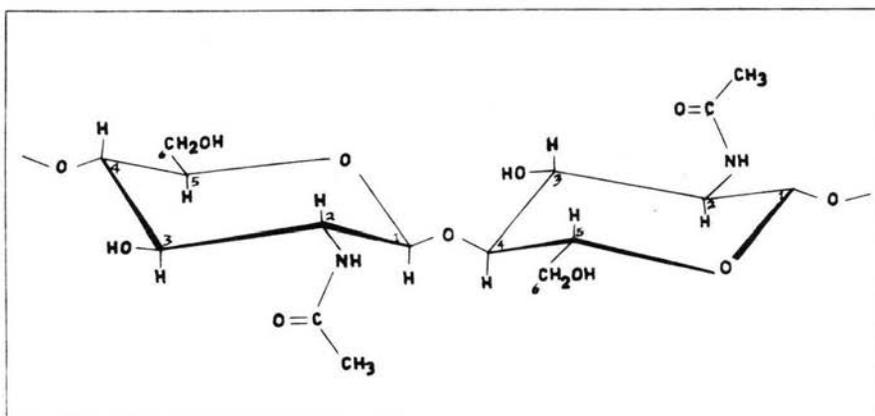


Fig. 1. Estructura del disacárido quitobiosa, la unidad mínima de repetición de la quitina.

En la quitina, el enlace glicosídico produce una alternancia en la posición de sus radicales de la NAG, de manera que la unidad mínima de repetición no es este aminoazúcar, sino su disacárido quitobiosa (10).

Cabe señalar que la quitina es, después de la celulosa, el compuesto orgánico más abundante en la Naturaleza (57), constituyendo un recurso renovable que debe ser aprovechado.

En los años cincuenta a sesentas, se vivió un notable auge sobre el estudio de los materiales lignocelulósicos, empleando procedimientos por vía microbiana o enzimática. Sin embargo, el interés en su aprovechamiento decayó rápidamente al no encontrar procedimientos económicos para eliminar a la lignina (un material que dificulta el ataque microbiano-enzimático sobre la celulosa). En consecuencia, se incrementó sorprendentemente la necesidad de investigar los materiales de naturaleza quitinosa, a tal grado que se han publicado una gran cantidad de libros y artículos, que proponen una diversidad de usos para la quitina y sus derivados (quitosana, N-acetil-D-glucosamina, y glucosamina), según se enlistan en la tabla 4.

Es de aclararse, que estas aplicaciones son sólo propuestas surgidas de trabajos, a escala de laboratorio, en las que se han empleado procesos químicos y fisicoquímicos para la obtención y/o modificación, tanto de la quitina como de sus derivados, siendo pocos los estudios con enfoque microbiológico. Al respecto, desde mediados de la década de los setentas, se han realizado en el Laboratorio de Enzimas Microbianas, investigaciones para la búsqueda de aplicaciones prácticas de los desechos proteína-quitinosos, aspecto que será abordado más adelante.

1.6. DEGRADACION MICROBIANA-ENZIMATICA DE SUBPRODUCTOS SOLIDOS INSOLUBLES. EL CASO DE LA QUITINA.

La biodegradación de sustratos sólidos insolubles, como la quitina, se realiza generalmente por un conjunto de microorganismos. Por su tamaño y complejidad molecular, estos sustratos no son degradados dentro de la célula, sino que los microorganismos recurren a la secreción de enzimas específicas que los hidrolizan fuera de ella. Al degradarse se forman compuestos de bajo peso molecular que pueden ser incorporados por las células para servir de acuerdo a su composición, como fuente de nitrógeno, carbono y energía (20).

En torno a esto, y a grandes rasgos, la degradación enzimática de la quitina puede llevarse

TABLA 4. ALGUNAS APLICACIONES PROPUESTAS PARA LA QUITINA Y SUS DERIVADOS

SUSTANCIA	AREA	POSIBLES USOS
QUITINA	MEDICINA:	Polvo cicatrizante, gasa algodón, esponjas vendas e hilos para cirugía. Anticoagulante, y para la fabricación de membranas. Tratamiento de pelo y piel.
	CROMATOGRAFIA:	Como soporte y para la inmovilización de enzimas.
	FARMACIA:	Excipiente y transportador de drogas.
	INMUNOLOGIA:	Adyuvante.
	AGRICULTURA:	Mejoramiento de suelos y para despertar respuestas antivirales en plantas.
INDUSTRIAS VARIAS:	Fabricación de nuevas telas nuevos adhesivos sucedáneos de vidrio, nuevos tipos de papel, etc.	
QUITOSANA	MEDICINA:	Disminución de colesterol en sangre. Acelera cicatrización de heridas y estimula el sistema inmune. Despliega la actividad antitumoral e inhibe el crecimiento bacteriano.
	CROMATOGRAFIA:	Soporte de intercambio catiónico. Para inmovilizar enzimas.
	FARMACIA:	Excipiente.
	ALIMENTOS:	Clarificación de vinos y jugos. Cubiertas protectoras de frutas.
	TRATAMIENTO DE EFLUENTES:	Quelantes de iones de metales pesados. Clarificante y precipitante.
	AGRICULTURA:	Recubrimiento de semillas, aditivo de insecticidas.
	ACUACULTURA Y BIOTECNOLOGIA:	Para flocular cultivos.
QUIMICA:	Purificación de biológicos.	
N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA Y/O SUS DERIVADOS ALQUILADOS	MEDICINA:	En el tratamiento de enteritis y colitis. Antiviral y antitumoral.
	ALIMENTACION INFANTIL:	Para modificar la flora intestinal y lograr metabolizar lactosa.
GLUCOSAMINA Y/O SUS DERIVADOS ALQUILADOS Y SALES	MEDICINA:	Antitumoral (citotóxica) y antiviral. Para combatir osteoartritis, hipertrofia cardiaca y disfunciones musculares

Fuentes: 2, 11, 34, 56, 86.

a cabo por dos caminos. En uno, se requiere inicialmente de la desacetilación de la quitina, para transformarse en quitosana. Este y el segundo camino se asemejan, ya que tanto la quitina como la quitosana, son degradados por endoespilimerasas (endoquitinasas y endoquitosanasas) a oligosacáridos de diferente tamaño. Debido a que la acción de tales enzimas produce una disminución en la viscosidad de las suspensiones de los polisacáridos iniciales, se les conoce como del tipo "licuefactiva".

Los oligosacáridos resultantes, son después hidrolizados por oligosacaridasas (quitobiasas), para formar exclusivamente NAG cuando el polisacárido inicial es la quitina, en tanto que si el polisacárido inicial es la quitosana, se forma una mezcla de NAG y glucosamina.

Este esquema se complementa con la intervención de exopolisacáridasas que pueden atacar, según su especificidad, a la quitina ó a la quitosana por un extremo, separando paulatinamente mono ó disacáridos. A esta acción enzimática se le llama "sacarificante".

Estas generalizaciones pueden comprenderse mejor si se examinan las figs. 2A y 2B, que muestran detalladamente las vías existentes para la degradación de la quitina.

1.7. DEGRADACION MICROBIOLOGICA DE LOS DESECHOS PROTEIN-QUITINOSOS, POSIBLES USOS DE LOS PRODUCTOS DE LA FERMENTACION.

Desde 1976, en el Laboratorio de Enzimas Microbianas de la ENCB, se han llevado a cabo investigaciones acerca del aprovechamiento integral de los desechos proteína-quitinosos por vía microbiana, tomando como modelo de trabajo los desperdicios de camarón (carapacho).

Dentro de esta línea de investigación, se han considerado tres objetivos:

1) Conocer las enzimas responsables de la biodegradación de los materiales proteína-quitinosos. Sus mecanismos de inducción y regulación; su purificación y caracterización.

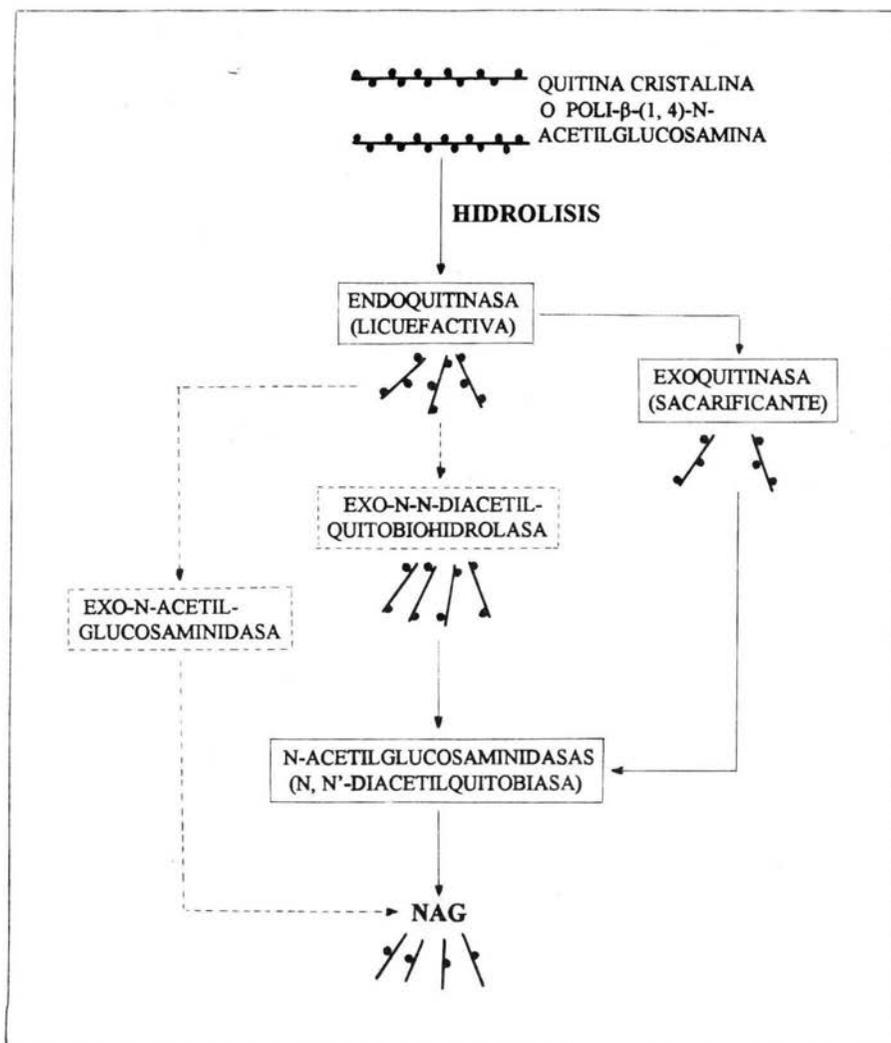


Fig. 2A. Biodegradación del polímero íntegro mediante exoquitinasas y oligosacaridasas.

Las flechas continuas indican actividades enzimáticas demostradas. Las punteadas se refieren a enzimas hipotéticas.

N-acetil-D-glucosamina=NAG (—●—). (17).

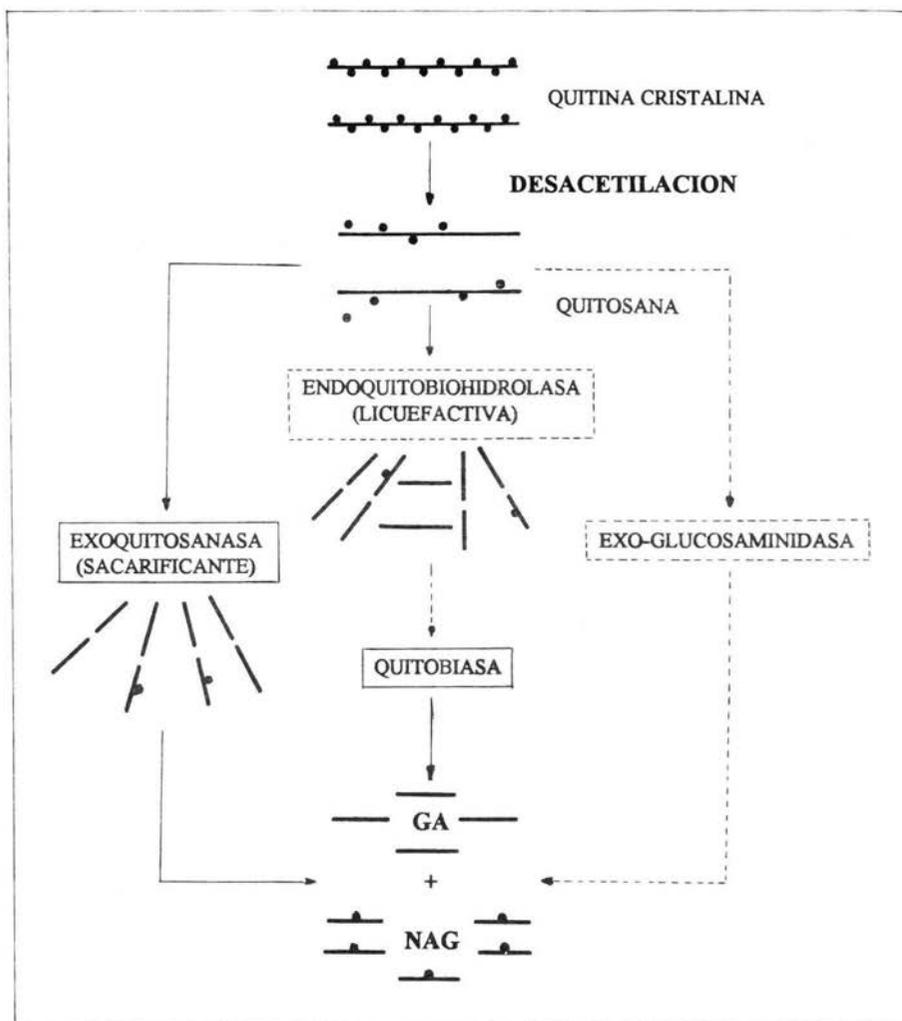


Fig. 2B. Degradación de la quitina mediante desacetilación previa para transformar la quitina en quitosana.

Las flechas continuas indican actividades enzimáticas demostradas. Las punteadas se refieren a enzimas hipotéticas.

N-acetil-D-glucosamina=NAG (—●—); Glucosamina=GA (—); Gpo. acetilo=(●).(17).

2) Establecer cualitativa y cuantitativamente los productos de la fermentación.

3) Buscar usos prácticos para estos productos.

En relación con el primer objetivo, los estudios han comprendido aspectos relacionados con la biosíntesis y regulación del complejo quitinasas-quitobiasas, usando medios de diversa composición, conteniendo distintos sustratos quitinosos, tanto en cultivos en crecimiento y no proliferantes (1, 13, 14, 50). También se ha abordado la purificación parcial y caracterización de estas enzimas en su forma cruda (4, 13, 14, 76, 77).

Del segundo objetivo, se sabe que de la fermentación de los desperdicios proteín-quitinosos suspendidos en agua de la llave (fig. 3), se producen quitinasas, quitobiasas, proteasas, aminoazúcares (NAG), un sólido remanente y biomasa bacteriana. El balance de materiales ha sido establecido en cultivos por lote a nivel de matraz empleando tanto a *Serratia marcescens* WF (45), como a *Bacillus thuringiensis* (79).

En torno al tercer objetivo, se resúmen a continuación algunos estudios encaminados a la búsqueda de usos prácticos para los productos de la fermentación.

a) La N-acetil-D-glucosamina (NAG), es el producto final de la degradación microbiana de la quitina. Este aminoazúcar es parcialmente consumido por el microorganismo y el restante se acumula en el caldo de la fermentación. No tiene usos comerciales establecidos, pero se ha propuesto su empleo como aditivo en alimentos lácteos especiales para personas con intolerancia a la lactosa, dada su capacidad para modificar la flora intestinal, permitiendo la implantación de *Lactobacillus bifidus* y otros microorganismos afines, quienes producen β -galactosidasa que rompe la molécula de lactosa en glucosa y galactosa, las cuales pueden entonces ser absorbidas por la mucosa intestinal (29, 41).

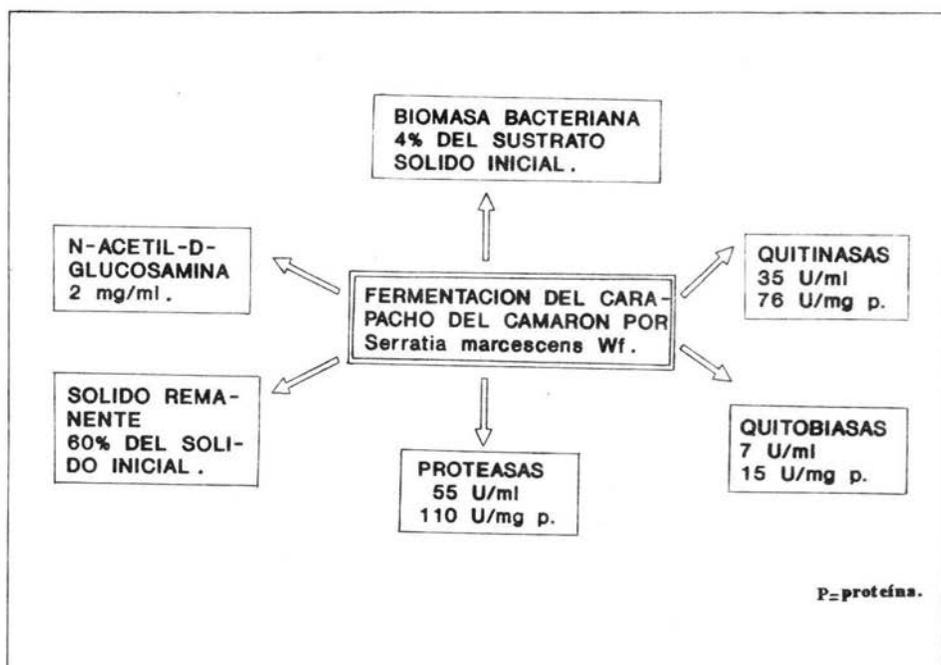


Fig. 3. Balance de materiales de la fermentación del carapacho de camarón por *Serratia marcescens* WF. Condiciones: sustrato al 6%, 48 h, 28°C y cultivo agitado por lote. (45).

Otro enfoque ha sido utilizar la NAG como sustrato de fermentación para producir biomasa levadura (69), cuyas propiedades bromatológicas han sido investigadas recientemente (datos no publicados).

También se han hecho estudios para establecer un proceso enzimático que permita obtener altos rendimientos de NAG a partir de sustratos como quitina y carapacho de camarón, empleando preparaciones crudas de quitinasas (12, 33).

b) Respecto a la biomasa bacteriana, como otro producto de la fermentación, cabe mencionar que en la mayoría de las investigaciones se han hecho con *S. marcescens*, una bacteria altamente quitinolítica y proteolítica, pero también patógena oportunista, por lo que se ha buscado sustituirla por otra bacteria que siendo igualmente hidrolítica, pueda proporcionar una biomasa potencialmente útil. En ese sentido, se han hecho investigaciones con *B. thuringiensis*, cuya biomasa puede ser usada en la formulación de insecticidas biológicos (22).

Dado que *B. thuringiensis* es una bacteria mala productora de quitinasa, se ha buscado incrementar la producción de esta enzima mediante mutación, y además, se han buscado otros microorganismos alternativos del género *Bacillus* (datos no publicados).

c) El sólido insoluble, remanente al término de la fermentación, es una excelente opción para obtener quitina y quitosana (45).

d) Para la degradación de los materiales proteín-quitinosos, los microorganismos secretan no sólo quitinasas, sino también proteasas extracelulares que pueden tener diversas aplicaciones. En la fermentación de los desperdicios de camarón se ha empleado a *S. marcescens* y a *B. thuringiensis*, encontrándose que las proteasas de ambos microorganismos pueden hidrolizar sustratos cárnicos tanto de pescados grasos y magros (31, 70), así como de harinas de origen piscícola y de otras procedencias (72). Este campo, es particularmente promisorio pues puede permitir la obtención de productos de alto nivel agregado a partir de sustratos proteicos poco atractivos.

e) Las enzimas del complejo quitinasas-quitobiasas, que también proceden de la fermentación de los desechos protéin- quitinosos, son de particular importancia por la estrecha relación que tienen con el tema que se aborda en la presente tesis, motivo por el cual se ha colocado como un rubro aparte.

1.8. LAS QUITINASAS DE *Serratia marcescens*.

Las enzimas de esta bacteria fueron estudiadas principalmente por Monreal y Reese (49), quienes llegaron a dos conclusiones importantes. Primero, que *S. marcescens*, resultó ser el microorganismos más quitinolítico de 100 estudiados, entre ellos otras bacterias, hongos y actinomicetos. Segundo, que su sistema quitinolítico es extracelular, con actividades de endoquitinasas, N-acetil-D-glucosaminidasa, de quitobiasa y de un factor descristalinizante semejante al "CH₁" (factor prehidrolítico) de los sistemas celulósicos.

Por otra parte, Young (91), menciona la existencia de sólo dos actividades. Una endoquitinasa que hidroliza la quitina insoluble, originando directamente el dímero de NAG: la quitobiasa; y una quitobiasa que rompe el dímero en dos moléculas de NAG. El proceso es muy eficiente y por lo mismo es difícil detectar el dímero durante la hidrólisis, sugiriendo que la velocidad de degradación total de la quitina está dada por una enzima limitante, la quitobiasa.

Los trabajos previos sobre la purificación y caracterización parcial de las quitinasas y quitobiasas (4, 13, 14, 76), indican que ambas enzimas, anivel de extracto crudo, son estables durante meses a temperatura de refrigeración. Sin embargo, a medida que se intenta su purificación aumenta su inestabilidad. Se sabe también que estas enzimas son fácilmente inactivadas por mercuriales como el HgCl₂ y p-cloromercuribenzoato (PCMB). Los agentes reductores como el β-mercaptoetanol y ditiotreitól, tienen un efecto activador. Las sales de metales divalentes como ZnCl₂, FeSO₄, CoCl₂, y MnCl₂, inhiben hasta en un 60% su actividad. Concluyeron que ambas enzimas son SH-dependientes. Pueden concentrarse por ultrafiltración sin una apreciable inactivación (recuperación del 90%). Una medida aceptable para evitar en lo

posible su inactivación, es añadir sustancias reductoras (β -mercaptoetanol y ditioneitol). Los agentes quelantes (EDTA) ejercen una ligera activación.

Aún cuando resulta dificultosa la caracterización, se han logrado averiguar otras propiedades, las cuales se resumen en la tabla 5. Estos datos sugieren que si se desea dar un uso práctico a quitinasas y quitobiasas, es preferible hacerlo a nivel de extracto crudo.

Dado que no existe un uso biotecnológico establecido para estas enzimas, en el presente trabajo se propone la alternativa de aprovechar la acción hidrolítica de las quitinasas, ya que se sabe pueden atacar a quitina contenida en la pared celular de algunos hongos (5).

En relación a esto, existen antecedentes del empleo de quitinasas que lisaron el micelio de 50 ascomicetos filamentosos (9), de *Fusarium roseum* (51), *A. nidulans* (71), *A. niger* y *A. fumigatus* (81, 82) y de *Rhizopus* (84), lo que sugiere la posibilidad de obtener protoplastos, previa lisis de la pared celular de *A. niger*, usando las quitinasas de *S. marcescens* (obtenida por fermentación del carapacho de camarón) lo cual es el propósito fundamental del presente trabajo.

Por otra parte, cabe decir que en este laboratorio, se realizó un trabajo relacionado (78) en el que se obtuvieron protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* empleando las enzimas líticas del jugo digestivo del caracol de jardín *Helix aspersa* y preparaciones comerciales.

Retomando el tema de la obtención de protoplastos de hongos filamentosos, es pertinente decir que existe información en la que se ha empleado como modelo de trabajo a *A. niger*, planteándose tipos y componentes del medio de cultivo para su crecimiento y obtención del micelio (52, 53, 55), así como la selección y manejo de diferentes enzimas, sus concentraciones, procedimientos y de otros factores que influyen en el aislamiento de protoplastos (18, 30, 32, 40, 54, 55, 83).

1.9. CONDICIONES PARA LA OBTENCION DE PROTOPLASTOS.

TABLA 5. ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS QUITINOLITICAS DE *S. marcescens* A NIVEL DE EXTRACTO CRUDO*.

CARACTERISTICA	QUITINASA	QUITOBIASA
Inducible	+	+
Represión por Glucosa y NAG	+	+
pH óptimo	6.5	7.0
pH de máxima estabilidad	6.5 (Buena entre 6 y 7)	7.0 (Muy marcado)
Temperatura óptima	50°C (Muy definida)	50-60°C
Estabilidad a la temp.	Buena entre 5-37°C Luego decae rápido	Buena entre 5-37°C Luego decae rápido
Estabilidad a 5°C	Varios meses	Varios meses
NAG (10^{-8} - 10^{-5} M)	Sin efecto	Hasta 40% de inhib.
MgCl ₂ (10^{-5} - 10^{-2} M)	Hasta 50% de inhib.	Sin efecto
CoCl ₂ (10^{-5} - 10^{-2} M)	Hasta 70% de inhib.	Sin efecto
MnCl ₂ (10^{-5} - 10^{-2} M)	Hasta 60% de inhib.	Poco efecto
ZnCl ₂ (10^{-5} - 10^{-2} M)	Hasta 90% de inhib.	Hasta 25% de inhib.
FeSO ₄ (10^{-5} - 10^{-2} M)	Hasta 80% de inhib.	Hasta 40% de inhib.
HgCl ₂ (10^{-5} - 10^{-4} M)	80 - 100% de inhib.	80 - 100% de inhib.
PCMB (10^{-5} - 10^{-4} M)	60 - 80% de inhib.	60 - 80% de inhib.
EDTA (10^{-5} - 10^{-3} M)	Hasta 120% de act.	Hasta 120% de act.
Reactivación con β-mercaptoetanol y DTT**	+	+

*Datos tomados de (22).

**Datos tomados de (77).

El arreglo y composición de la pared ejercen un marcado efecto sobre la eficiencia de las enzimas líticas empleadas para la producción de protoplastos en varias especies y cepas (62). A continuación se resumen algunos aspectos relevantes que deben ser considerados en la producción de protoplastos.

1.9.1. LA ENZIMA LITICA.

En muchos casos, las enzimas usadas para la producción de protoplastos de hongos filamentosos están disponibles comercialmente ó se obtienen de microorganismos. Por ejemplo, un complejo enzimático derivado de *Penicillium purpurogenum* crecido en un medio con micelio de *A. niger*, presentó actividad de quitinasa, celulasa, amilasa, proteasa y lipasa, efectivas para producir protoplastos de *A. niger* (54); el complejo enzimático tuvo la misma actividad mostrada por las enzimas digestivas del caracol de jardín *Helix pomatia*.

1.9.2. EL ESTABILIZADOR OSMOTICO.

El estabilizador es esencial, ya que provee el soporte osmótico para los protoplastos en su paulatina salida a través de la pared celular del hongo.

Existe un buen número de estabilizadores osmóticos que son empleados para este propósito. Entre ellos, las sales inorgánicas, azúcares y alcoholes derivados de azúcares (polioles) son los más comunes (63). El tipo y la concentración del estabilizador, pueden influir tanto en la producción como en la estabilidad de los protoplastos, dependiendo también del tipo de organismo, debido a que no existe un estabilizador "universal" para todos los hongos (16).

1.9.3. EL MICELIO.

Dos aspectos del crecimiento micelial son importantes: la naturaleza del medio de cultivo y la fase de desarrollo (horas de crecimiento) del micelio a la cual debe ser cosechado (63), ya que estas características influyen notablemente en el número de protoplastos que se pueden producir.

Como consecuencia de lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos.

1.10. OBJETIVOS.

1.10.1. Demostrar microscópicamente el efecto de las quitinasas de *S. marcescens* sobre la pared celular de *A. niger*.

1. 10.2. Explorar el uso de las quitinasas para la obtención de protoplastos de *A. niger*.

1.10.3. Estudiar diversos procedimientos como: cambios en la absorbancia, liberación de N-aceti-D-glucosamina, incremento de proteína soluble y disminución de la masa micelial, para evaluar cuantitativamente el efecto fungolítico.

1.11. METAS.

1.11.1. Cultivar a *S. marcescens* en medios conteniendo subproductos quitinosos (carapacho de camarón), para la producción de enzimas quitinolíticas extracelulares.

1.11.2. Obtención del extracto crudo de quitinasas y quitobiasas libre de células.

1.11.3. Cultivar a *A. niger* para usarse como blanco en la lisis micelial.

1.11.4. Demostrar mediante observación microscópica y microfotográfica la acción fungolítica.

1.11.5. Evaluar el efecto lítico por técnicas fotométricas, turbidimétricas y gravimétricas
Seleccionar el mejor método.

1.11.6. Adoptado el método, establecer las condiciones óptimas para la lisis de la pared fúngica (temperatura, pH, concentración de sustrato, concentración de enzima y agitación).

1.11.7. Estudiar la participación de las proteasas (presentes en la preparación enzimática cruda) en la acción fungolítica

1.11.8. Explorar el uso de las quitinasas y quitobiasas para la producción de protoplastos, mediante técnicas de fotografía microscópica de contraste de fases.

2.0. MATERIALES Y METODOS.

2.1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS Y SU CONSERVACION.

2.1.1. *Serratia marcescens WF*, la cual es una mutante apigmentada, altamente productora de quitinasas, donada al Laboratorio de Enzimas Microbianas, por el Dr. R. P. Williams, del Baylor College of Medicine, Houston, Tx., en 1973. La cepa se conservó por resiembras mensuales en placa, y tubo inclinado con quitina coloidal y agar nutritivo, incubado durante 48 h a 28°C. Posteriormente se mantuvo en refrigeración (5°C).

2.1.2. *Aspergillus niger*, hongo filamentoso usado como blanco para el ataque de las quitinasas y para la obtención de protoplastos. Esta cepa es productora de algunas enzimas intracelulares para uso industrial como la glucosa-oxidasa, y fue donada en 1992 por el Laboratorio de Fermentaciones de la ENCB. Se conservó en forma esporulada en tubo inclinado en medio de papa dextrosa agar (PDA) bajo condiciones de refrigeración.

2.2. MEDIOS DE CULTIVO.

2.2.1. Medio mineral de sales-nitrato-glucosa (36) para el crecimiento de *A. niger* y obtención de micelio, el cual estuvo conformado por: NaNO_3 , 6.00 g/l; KH_2PO_4 , 1.00 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.52 g/l; KCl, 0.52 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/l; extracto de levadura (Difco) al 0.5% y casaminoácidos (Difco) al 0.2%.

Se ajustó el pH a 6.5 y se esterilizó a 15 lb durante 20 min. Se añadió glucosa asépticamente, previamente esterilizada por filtración, a una concentración final de 10 g/l.

2.2.2. Para *S. marcescens WF*, se empleó un medio basal (14) constituido por: Citrato diamónico, 0.625 g; KH_2PO_4 , 0.375 g; Na_2CO_3 , 0.375 g; NaCl, 0.250 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.275, y Glicerol, 6.25 ml.

Para 1000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 6.5.

El empleo de este medio, complementado con agar bacteriológico al 2.3% y quitina coloidal (peso húmedo) al 14%, sirve para la conservación de la cepa. Si a este medio se le excluye la fuente de carbono (citrato de amonio y glicerol), y en su lugar se agrega quitina comercial (Sigma) al 1.5%, más extracto de levadura (Difco) al 0.05%, sirve para la producción de quitinasas.

2.2.3. PREPARACION DEL CARAPACHO DE CAMARON COMO INGREDIENTE PARA MEDIO DE CULTIVO.

El carapacho de camarón se lavó con agua de la llave, luego se dejó secar al sol. Posteriormente, se trituró finamente en un molino Willey, usando un malla 20 y después una 40, antes de adicionarlo a los medios de cultivo.

2.2.4. PREPARACION DEL MICELIO DE *A. niger* COMO INGREDIENTE PARA MEDIO DE CULTIVO.

En matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio YPG, se inocularon esporas recogidas de un tubo de ensaye inclinado con cultivo de *A. niger* en PDA. Se dejó que germinaran durante 48 h a 28°C y con 180 rpm. El micelio producido se esterilizó a 15 lb durante 30 min, para después ser recogido por filtración usando papel filtro convencional. Se lavó con agua corriente y se secó, para finalmente ser molido con un molino Willey (mallas 20 y 40).

2.2.5. MEDIOS CONTENIENDO SUBPRODUCTOS PROTEIN-QUITINOSOS PARA LA PRODUCCION DE QUITINASAS.

Procedimiento para la preparación del inóculo: en un matraz Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 25 ml del medio líquido, se siembra por azada la cepa de trabajo *S. marcescens* WF, procedente de un vial liofilizado, o de un cultivo conservado en medio de quitina coloidal, se incubó a 28°C durante 24-48 h en condición estacionaria. Después se hicieron 3 o 4 pases

consecutivos en el mismo medio cada 24 h, mantenidos a 28°C y con agitación de 180 rpm, en una agitadora-incubadora (New Brunswick Scientific). Luego del último pase, se tomaron alícuotas convenientes para transferirlos a matraces de 250 ml, conteniendo 50 ml del mismo medio. Estos se mantuvieron en las mismas condiciones durante 120 h, recogiendo pequeñas muestras cada 24 h para la determinación de la actividad quitinolítica.

2.4. OBTENCION DE LA PREPARACION CRUDA DE QUITINASAS.

Después de 120 h de fermentación (tiempo necesario para alcanzar una concentración mínima de 30 UQ/ml), se retiraron los matraces de la agitadora-incubadora. Las células y material insoluble se separaron por centrifugación a 15000 rpm durante 20 min a 5°C, con una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B. El sobrenadante (extracto crudo) se esterilizó por filtración sobre membranas Millipore con tamaño de poro de 0.45 µm primero y luego de 0.22 µm. Se comprobó su condición estéril sembrando una muestra en un medio sólido rico. La enzima se repartió en porciones de 20 ml en botellas de plástico, y como precaución se le añadió ázida de sodio al 0.02% para evitar su contaminación, En seguida se guardó en congelación, ó a 5°C, hasta su uso. Su reactivación se realizó descongelando a temperatura ambiente o en baño de agua de la llave.

2.5. PREPARACION DEL REGULADOR DE FOSFATOS 0.2 M, pH 6.5 (12).

De acuerdo a la necesidades del experimento, se preparó una cantidad conveniente del regulador de la siguiente manera: en un vaso de precipitados, colocado sobre una base magnética, se agregó un volumen adecuado de fosfato dibásico de potasio 0.2 M, se introdujo un agitador magnético y luego el electrodo de un potenciómetro (Bioelec Mod PHDOI) previamente calibrado. Con una pipeta Pasteur se fue adicionando gota a gota, una solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M, hasta obtener el pH deseado.

2.6. PREPARACION DEL ACIDO 3, 5-DINITROSALICILICO (48).

La solución del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) se realizó pesando 5 g de DNS, los cuales se suspendieron en 100 ml de NaOH 2 N. Se agregaron 150 g de tartrato de sodio y potasio en 200 ml de agua destilada. La solución obtenida se aforó a 500 ml de agua destilada, y luego se guardó en frascos ámbar a temperatura ambiente hasta su uso.

2.7. PREPARACION DE SUSTRATOS ENZIMATICOS.

2.7.1. QUITINA COLOIDAL PARA LA DETERMINACION DE QUITINASAS (49).

En un vaso de precipitados de 1000 ml se mezclaron con agitación manual, 10 g de quitina comercial (Sigma) con 100 ml de H₃PO₄ al 85%. Se guardó en refrigeración por 24 h. Al cabo de este tiempo, se agregó agua de la llave en exceso, se filtró a través de gasa, y se continuó lavando hasta eliminar totalmente el ácido.

Posteriormente, 10 g de quitina coloidal (peso húmedo) resultante, fueron suspendidos en 100 ml de regulador de fosfatos 0.2 M, pH 6.5. Luego se esterilizó, y se guardó en refrigeración hasta su uso. Al momento de usarse, se preincubó a 50°C durante unos 5 min, agitando manualmente.

2.7.2. SUSTRATO PARA QUITOBIASAS (14).

Se usó p-nitrofenil-β-N-acetil-D-glucosamina (Sigma) 10 μM en regulador de fosfatos 0.2 M, pH 7.0. Se conservó en congelación en porciones de 2 ml en tubos de plástico herméticamente cerrados y cubiertos con papel aluminio para proteger el sustrato de la luz.

2.8. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

2.8.1. ACTIVIDAD DE QUITINASAS (49).

Está basada en la reducción que sufre el ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS), por la acción de la N-acetil-D-glucosamina, producto de la hidrólisis enzimática de la quitina, misma que puede medirse por absorbancia a 535 nm, gracias al color desarrollado en la reacción.

Procedimiento: en tubos de ensaye, se mezclaron 1 ml de sobrenadante (diluído o no) con 1 ml de sustrato, los cuales se incubaron a 50°C durante 1 h en un baño metabólico (Grant) con ajuste de temperatura. Después, la reacción se detuvo con 1 ml de NaOH al 1%, luego se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min para separar la quitina remanente. Del sobrenadante, se tomó 1 ml para determinar azúcares reductores, mezclándolo con 1 ml de DNS. Se ebulló 5 min en baño maría para desarrollar color. Se enfrió y se diluyó con 2 ml de agua destilada. Se midió la absorbancia a 535 nm con un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, Coleman 55).

Los testigos se prepararon mezclando 1 ml del sobrenadante, más 1 ml de NaOH al 1% y 1 ml de quitina coloidal. Se incubó a 50°C durante 1 h y luego se siguieron los mismos pasos indicados para los problemas.

Sus valores de absorbancia se interpolaron en una curva tipo de N-acetil-D-glucosamina de concentración conocida (0-10 μ M/ml) para determinar las unidades de quitinasas, considerándose que una de éstas es la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ M de NAG en 1 h, bajo las condiciones experimentales mencionadas.

2.8.2. ACTIVIDAD DE QUITOBIASAS (14).

Se basa en la medición de la absorbancia a 410 nm del color desarrollado por la liberación del p-nitrofenol al ser hidrolizado el sustrato p-nitrofenil- β -N-acetil-D-glucosamina por la acción de las quitobiasas.

Procedimiento: se mezclaron 50 μ l de agua, 100 μ l de la muestra enzimática (diluída o sin diluir), 200 μ l de regulador de fosfatos 0.2 M pH 7.0 y 50 μ l de sustrato (10 μ M). Se incubó a 50°C midiendo con exactitud el tiempo hasta la aparición de un color amarillo debido a la liberación del p-nitrofenol. La reacción se detuvo con 100 μ l de ZnSO₄ al 5%, 100 μ l de Ba(OH)₂ al 7.5% y 400 μ l Na₂CO₃ 0.2 M. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se leyó a 410 nm, interpolando la lectura en una curva tipo de p-nitrofenol leída a la misma longitud de onda. Una unidad de quitobiasa es la cantidad de enzima que libera 1 μ M de p-nitrofenol en un min.

2.9. OTRAS DETERMINACIONES.

Se determinó la proteína soluble liberada durante la lisis de la pared celular de *A. niger* por el método de Lowry (44).

2.10. CONDICIONES DEL CRECIMIENTO FUNGICO, PREPARACION DEL SUSTRATO MICELIAL Y LISIS DE SU PARED.

Una azada de esporas de *A. niger*, procedente de un cultivo en PDA en tubo inclinado, fue inoculada en un matraz Erlenmeyer, que contenía 50 ml de un medio mineral de sales-nitrato-glucosa, para dejar germinar durante 48 h a 28°C con agitación de 180 rpm. De este cultivo se tomaron fragmentos del micelio para resembrarlos en varios matraces, con 50 ml cada uno del mismo medio mineral, a 28°C sin agitación durante 18-20 h. En condiciones estériles y con sumo cuidado, se colectó la masa micelial por filtración, usando papel filtro convencional. Se lavó cuidadosamente con regulador de fosfatos 0.2 M pH 6.5. Esta masa micelial se recuperó por centrifugación a 5000 rpm/10min, quitando el exceso de regulador.

2.10.1. PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA LISIS MICELIAL (5).

Se prepararon dos series de tubos de ensaye, conteniendo 50 mg/ml de micelio (peso húmedo) en regulador de fosfatos 0.2 M pH 6.5 y 5 ml de quitinasas (40-50 UQ/ml) para los problemas, ó 5 ml de regulador de fosfatos para los testigos. Se dejó luego en incubación en un baño metabólico a 37°C. Se recogieron un problema y un testigo al inicio, y después cada hora, hasta completar 5 h, y con ellos se midió el efecto lítico, mediante las siguientes técnicas:

2.10.1.1. Observación microscópica directa de la muestra micelial, al natural o teñidas previamente con azul de algodón, auxiliándose de un microscopio binocular de contraste de fases (Reichert-Jung POLYVAR) con cámara fotográfica.

2.10.1.2. Medida fotométrica de la acción lítica evaluada por la diferencia de la turbiedad a 620 nm, entre problemas y testigos en un espectrofotómetro digital (Perkin Elmer, Coleman 55).

2.10.1.3. Estimación de la diferencia del peso micelial húmedo y seco entre problemas y testigos, empleando un procedimiento gravimétrico usando filtros Millipore de peso conocido y un tamaño de poro de 0.45 μm .

2.10.1.4. Diferencia entre problemas y testigos en cuanto a la liberación de N-acetil-D-glucosamina por la acción lítica de las quitinasas sobre la pared fúngica. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva tipo de NAG de concentración conocida (10 $\mu\text{M/ml}$).

2.10.1.5. Evaluación del efecto fungolítico estudiando el incremento de la liberación de proteínas solubles intracelulares.

2.10.2. PARTICIPACION DE LAS PROTEASAS EN LA LISIS MICELIAL.

Dado que en la preparación enzimática cruda utilizada contiene quitinasas, quitobiasas y algunas proteasas, todas de carácter hidrolíticas, fue necesario establecer si la lisis era un proceso concertado en el que participaban todas las enzimas presentes, ó sólo las de tipo quitinolítico. Por lo tanto, se hicieron experimentos en los que las quitinasas y quitobiasas, presentes en el extracto crudo, fueron inactivadas con p-cloromercuribenzoato (PCMB) 10^{-3} M (4, 14), verificando que las proteasas no fueran afectadas. Entonces, los extractos crudos de proteasas libres de quitinasas-quitobiasas (inhibidas) y la preparación cruda sin tratamiento inhibitorio (testigo), fueron ensayadas frente a muestras miceliales de *A. niger* por las técnicas previamente establecidas.

2.11. FORMACION DE PROTOPLASTOS.

El micelio fue cosechado por filtración en la fase exponencial de crecimiento (18-20 h) y lavado dos veces con KCl 0.6 M en regulador de fosfatos 0.2 M pH 6.5, el cual fue usado como estabilizador osmótico.

La técnica empleada para la obtención de protoplastos, fue básicamente la descrita por Muzilková y Fencel (52) e Isaac y Peberdy (36), con algunas modificaciones, según las necesidades del experimento. El método comprendió los siguientes pasos:

a) Se resuspendió el micelio lavado (50 mg/ml, peso húmedo) en KCl 0.6 M con regulador de fosfatos 0.2 M pH 6.5, más 5 ml de quitinasas (40-50 UQ/ml).

b) Incubación de la suspensión en un baño metabólico a 37°C con agitación ligera (110 rpm) hasta 5 h.

c) La formación de protoplastos se siguió por observación microscópica de contraste de fases. La autenticidad de ellos se realizó comprobando su sensibilidad osmótica al bajar la concentración salina del medio o por su permeabilidad al colorante azul de algodón.

d) Los protoplastos fueron separados de los fragmentos de micelio por filtración, en membranas de vidrio poroso grado C (Coarse).

e) Se recuperaron del filtrado por centrifugación a 2000 rpm/5min, para ser lavados con el estabilizador osmótico.

f) Los protoplastos fueron resuspendidos en un pequeño volumen del estabilizador osmótico para las microfotografías.

2.12. ESTIMACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA LISIS MICELIAL.

Una vez que se determinó que la medición de la turbiedad a 620 nm, fue el mejor método para evaluar la acción lítica, se procedió a realizar experimentos para establecer las condiciones óptimas, como temperatura (5, 25, 30, 37 y 45°C); el pH, utilizando regulador de fosfatos 0.2 M, con pHs desde 5.0 a 8.0; la concentración de sustrato desde 20 a 100 mg/ml (micelio, peso húmedo); la concentración más favorable de enzima, variando límites desde 20 a 50 UQ/ml; así como la influencia de la agitación y reposo.

2.0. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. EVIDENCIA MICROSCOPICA DE LA ACCION LITICA DE LAS QUITINASAS DE *S. marcescens* SOBRE LA PARED CELULAR DE *A. niger*.

Dentro de las observaciones microscópicas, es pertinente decir, antes que otra cosa, que las preparaciones miceliales fueron rastreadas y fotografiadas a inmersión (1000X) mediante un microscopio binocular de contraste de fases empleando filtro rojo. Así mismo, cabe mencionar que algunas tomas fueron amplificadas fotográficamente, con el fin de apreciar con más detalle los cambios morfológicos ocasionados por las enzimas quitinolíticas, como consta en las figuras siguientes, en las que se presentan las microfotografías tomadas.

En la figura 4, se muestra la hifa del hongo filamentoso *A. niger* usado como blanco en los ensayos, correspondiendo a preparaciones frescas de 18-20 h de crecimiento (Fig 4A), apreciándose un micelio bien estructurado con septos bien definidos.

En 4B y 4C, se observan las hifas de *A. niger* en preparaciones testigos, suspendidas sólo en regulador de fosfatos e incubados a 37°C durante 1 y 3 h, respectivamente, no habiendo cambios aparentes en su morfología.

Antes de continuar con la descripción, es conveniente indicar que en las observaciones de las preparaciones miceliales bajo el ataque enzimático, se detectaron al menos tres posibles modos de acción lítica sobre la pared celular de *A. niger*. En uno de ellos (Fig. 5), se da una degradación notoria en la parte apical de las hifas. Otro, (Fig. 6) es una acción extensa sobre la parte central y periférica de la hifa, y el tercero (Fig. 7), es un efecto fungolítico sobre puntos particulares de las hifas.

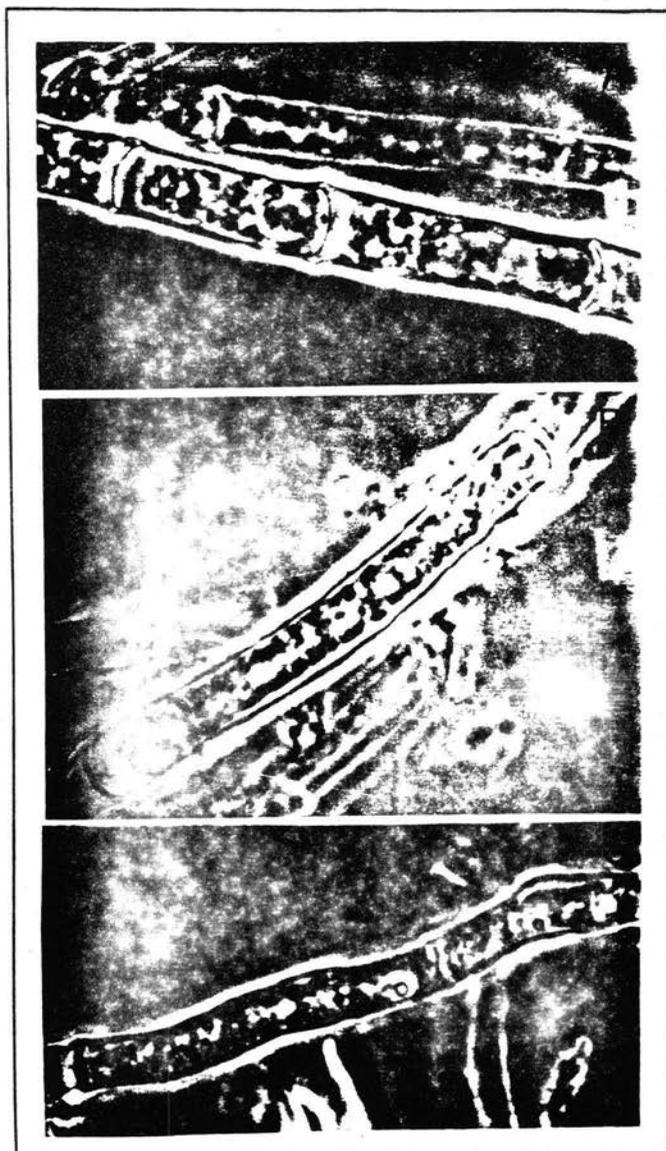


Fig. 4. Microfotografía que muestra el micelio de *A. niger*, de 18 h de crecimiento, usado como control, sin tratamiento enzimático, incubado en regulador de fosfatos a 37°C. (A) micelio a 0 h; después de una 1 h de incubación (B) y luego de 3 h de incubación (C). 1000X.

Las microfotografías de la figura 5, presentan los sucesos producidos en la parte terminal o apical de la hifa por la acción de las quitinasas, incubadas a 37°C. En 5A, se observa el efecto originado después de 1 h de tratamiento enzimático, hay indicios de una degradación parcial en el entorno de la pared, que consiste en un adelgazamiento de la misma. En 5B, el daño se hace más evidente tras 3 h de lisis micelial, apreciándose un daño drástico en toda la periferia de la pared, particularmente en la parte apical de la hifa. Se nota también que ha ocurrido la salida de material intracelular. La microfotografía 5C, es una ampliación fotográfica de 5B, realzando con más detalle el efecto lítico. Cabe decir que, este tipo de daño, es el más comúnmente observado, ya que se sabe que en la fase exponencial de crecimiento, en los extremos apicales de las hifas, se está realizando apenas la síntesis de nuevo material en la pared y por lo mismo su ataque enzimático es más susceptible (8). Es posible que al adicionar el agente degradante, se impida la incorporación de nuevos polisacáridos, haciendo que sea más frágil esa región de la hifa (84).

Cuando se prepararon protoplastos de *A. niger* (53) se demostró que se obtenían mayor número de ellos en las partes más jóvenes de la hifa (Tabla 6), particularmente en la parte apical, la que fue lisada más rápidamente que las partes más distales y viejas de la pared, las cuales resultaron ser más resistentes al efecto de las enzimas líticas.

En la figura 6, se muestra otro tipo de ataque quitinolítico sobre la porción central de las hifas, en que puede apreciarse claramente el adelgazamiento y ruptura de la pared, originando zonas vacías o “fantasmas”, como consecuencia de la salida de material intracelular.

Por otra parte, la figura 7, sirve para mostrar otro posible modo de ataque hidrolítico sobre puntos particulares de la pared celular del hongo, en donde se observa la presencia de varias protuberancias y cuerpos esféricos. Este aspecto marcó la pauta para suponer que era posible liberar el contenido celular, y lograr su consiguiente transformación a protoplasto mediante la

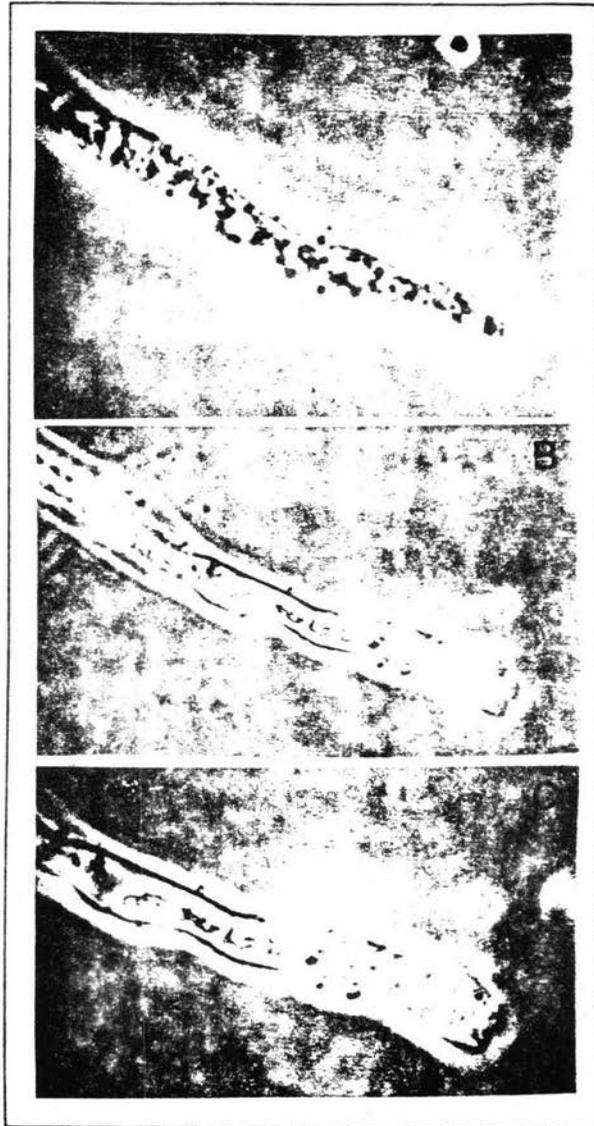


Fig. 5. Microfotografía que muestra el daño quitinolítico de *S. marcescens* WF en la región apical del micelio de *A. niger*, incubado a 37°C hasta 5 h. (A) micelio de 1 h de acción litica. (B) micelio después de 3 h. (C) ampliación fotográfica de B. 1000X.

TABLA 6. RELACION ENTRE LA EDAD DE LAS HIFAS DE *A. niger* Y LA CANTIDAD DE PROTOPLASTOS OBTENIDOS POR ACCION ENZIMATICA*.

Número de protoplastos X 10 ⁵ por mg de micelio peso seco			
Incubación en h			
Edad de la hifa en h	1	2	3
15	14.06	32.50	35.65
18	8.66	21.50	32.65
24	2.27	3.05	6.58
40	0.88	1.75	4.62

Datos tomados de la ref. 53.

* de *Streptomyces*, empleando KCl 0.6 M, incubado a 30°C durante 3 h a pH 6.0.

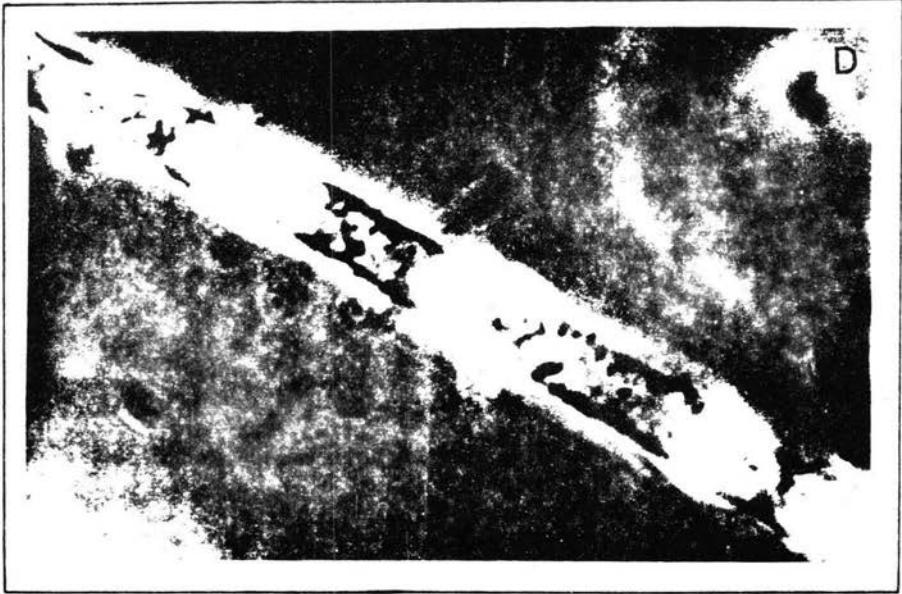


Fig. 6. Fotografía que muestra el efecto lítico de las quitinasas (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens* sobre el micelio de *A. niger* incubado a 37°C durante 3 h. Se observa el adelgazamiento y ruptura de la pared celular. 1000X.

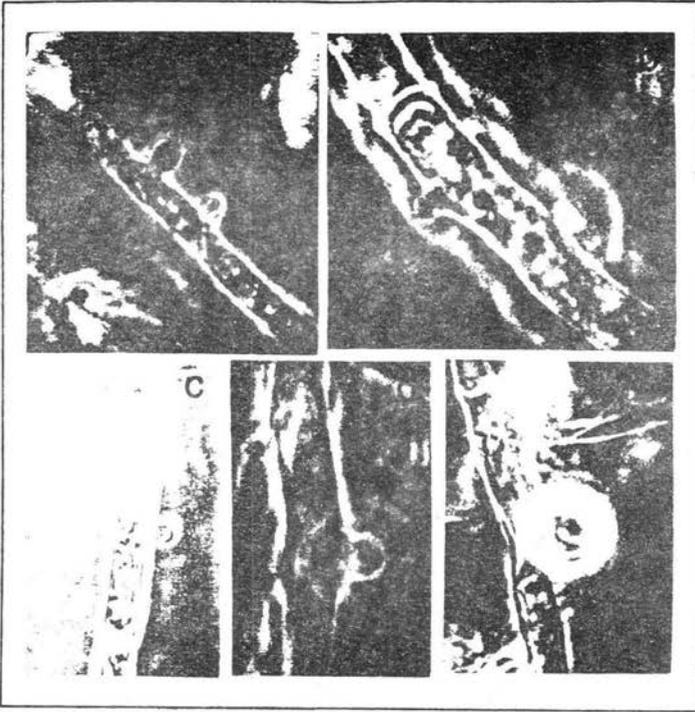


Fig.7. Efecto de las quitinasas (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens* sobre partes puntuales de la pared celular de *A. niger*, incubado a 37°C hasta 5 h. 1000X.

adición de un agente estabilizador que evitara su expansión incontrolada y posterior estallamiento.

Cabe destacar que en las referencias consultadas, no se encontró un caso similar sobre este último tipo de daño hidrolítico. Se sabe, sin embargo, que la estructura y arreglo de la hifa, tiene un marcado efecto sobre su degradación y en la producción de protoplastos, como fue confirmado por los otros dos modos de acción hidrolíticos (daño en la pared apical y daño a lo largo de la pared de las células miceliales) mostrado por las evidencias fotográficas, indicando por un lado, que las quitinasas de *S. marcescens* actúan sobre la quitina contenida en la pared celular de solubilizándola, y que la degradación total o parcial, puede ser efectuada por la acción sinérgica tanto de las quitinasas como de las quitobiasas (14, 81). También es oportuno decir, que podría lograrse una mayor eficacia en la degradación de la pared celular de *A. niger*, si se adicionara alguna otra enzima de carácter lítico. Esto ha sido demostrado por Thomas *et al* (82) quien estudió primero el efecto inmediato de la quitinasa sobre la hidrólisis de la pared celular de *A. niger* y *A. fumigatus*. Sin embargo, mejores resultados se obtuvieron al enriquecer la quitinasa con una enzima comercial, la β -glucuronidasa. Un caso similar fue visto también por Hamlyn *et al* (32), quien usó una preparación constituida principalmente por β -glucuronidasa, β -(1, 3)-glucanasa, α -(1, 3)-glucanasa, y complementada con una pequeña cantidad de quitinasa, elevando considerablemente la degradación de los materiales resistentes de la pared celular, aún cuando se trabajó también con células viejas.

3.2.EVIDENCIA FOTOGRAFICA DE LA FORMACION Y LIBERACION DE PROTOPLASTOS POR LA ACCION DE LAS QUITINASAS DE *S. marcescens*.

La figura 8, muestra microfotografías de la secuencia de formación y liberación de protoplastos de *A. niger* bajo la acción lítica de las quitinasas (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens* en presencia de KCl 0.6 M como estabilizador osmótico y con ligera agitación, seguido a lo largo de 5 h de incubación a 37°C. En 8A, se observa la hifa del micelio de 18-20 h de crecimiento. La flecha señala un punto en que se ha efectuado un daño o ruptura de la pared celular por la acción

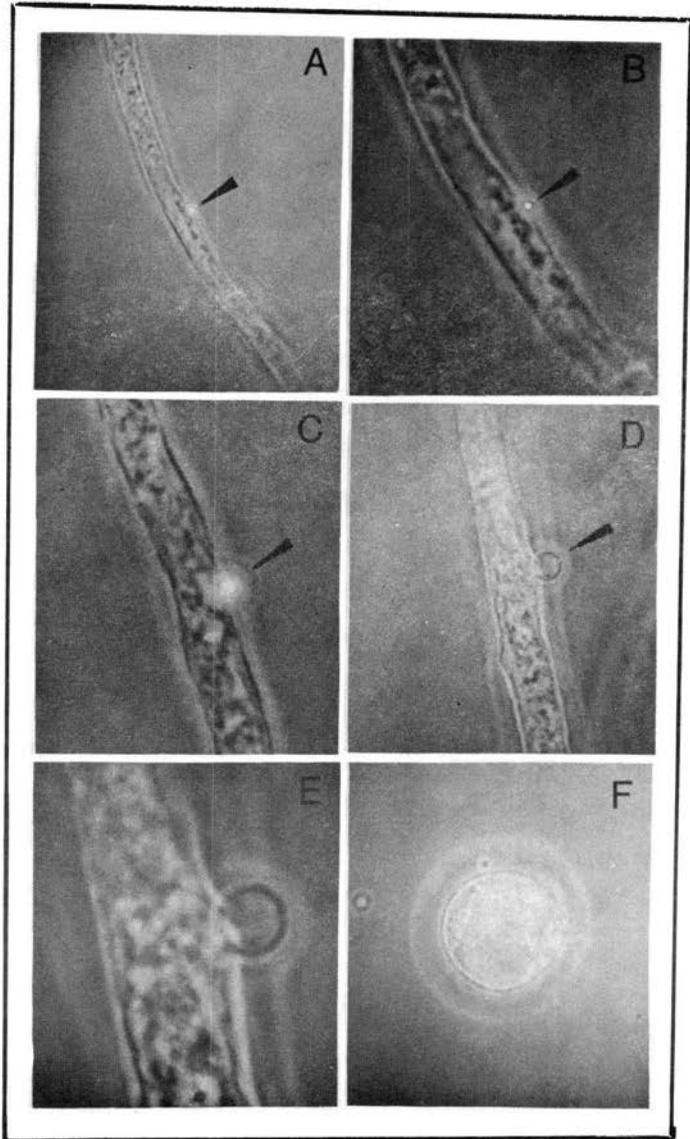


Fig. 8. Secuencia fotográfica (1000X) de la formación y liberación de protoplastos al lisarse la pared celular de *A. niger* por efecto de las quitinasas de *S. marcescens*. Las fotografías A y B corresponden a 1 h; C, D y E a 3 h de incubación, a 37°C con KCl 0.6 M. La producción de protoplastos (F) se inició desde las 3 h y alcanza su mayor velocidad a las 5 h de incubación.

enzimática, tras 1 h de tratamiento. La microfotografía 8B es una ampliación de 8A para mostrar mejor el poro o ruptura. La microfotografía 8C muestra una estructura en forma de burbuja después de 3 h de acción enzimática. En 8D y 8E, se observa el cuerpo emergiendo a través del orificio formado en la pared celular. Finalmente, 8F, muestra un protoplasto totalmente liberado.

La figura 9, incluye microfotografías de protoplastos: en 9A y 9B se observa que estos pueden presentar diferentes tamaños, lo cual fue común en nuestros experimentos. Tanto las fotografías 9C hasta 9G, así como las mostradas en la figura 10, son ampliaciones para mostrar con más detalle la variabilidad no sólo de tamaño, sino también en su aspecto interno y algunas características. Por ejemplo, las fotografías 9E y 9F, muestran el contenido celular teñido de azul, debido a la rápida incorporación del colorante azul de algodón como consecuencia de la ausencia de la pared. La fig. 9E, muestra lo que pudieran ser dos grandes vacuolas, igualmente observables en la fig 10D. Otros protoplastos, en cambio, presentan un alto contenido de granulaciones de diversos tamaños como puede verse en 9C, 10F y 10G. Algunas de estas granulaciones aparecen como partículas de grasa. En otros casos, se ven estructuras adheridas al protoplasto que bien pudieran ser impurezas o remanentes de pared (9G, 10E y 10H).

Cabe mencionar, que en algunos experimentos los protoplastos fueron observados en forma continua hasta por 7 h. Durante este período las células se mostraron metabólicamente activas, algunos protoplastos mostraban organelos como mitocondrias, los cuales tenían un movimiento intenso dentro del citoplasma. No fue posible, en nuestro caso, identificar con seguridad organelos que pudieran ser núcleos, aunque sí se observaron cuerpos oscuros, muy densos que posiblemente corresponden a éstos.

La gran diversidad en forma y tamaño de los protoplastos fúngicos ha sido observada también por otros investigadores. Se sabe entonces, que los protoplastos de hongos filamentosos originados de un micelio multinucleado, como *A. niger* muestran estructuras heterogéneas con una variedad en el número de núcleos y de otros organelos. Esta heterogeneidad puede deberse a una

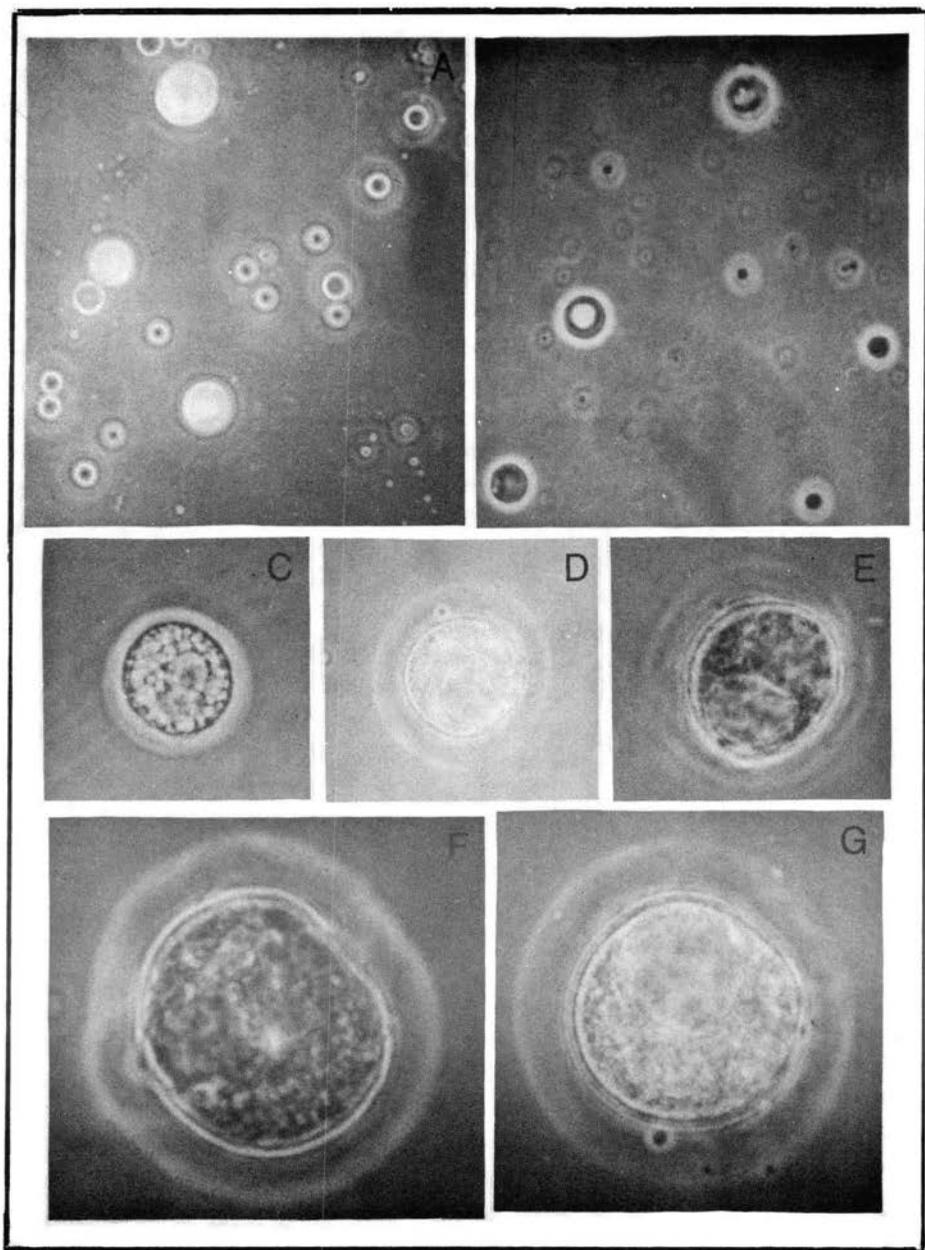


Fig. 9. Protoplastos de *A. niger* liberados por la acción de las quitinasas de *S.marcescens* a 37°C, mantenidos en KCl 0.6 M, mostrando la diversidad en tamaño y forma. 1000X.

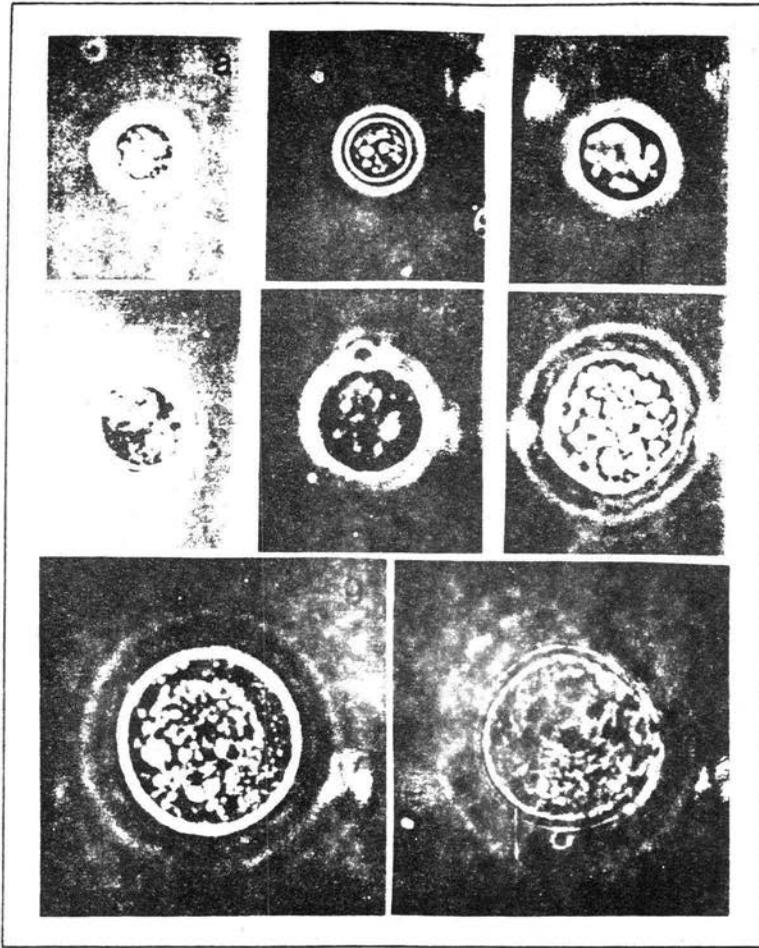


Fig 10. Más protoplastos de *A. niger* producidos por las quitinasas de *S. marcescens*, mantenidos en una solución de KCl 0.6 M, mostrando variabilidad en forma y tamaño. 1000X.

distribución desbalanceada o asimétrica del contenido citoplasmático en la hifa, y como resultado de la liberación de protoplastos de diferentes puntos de la misma (30). Al respecto, y de observaciones ultraestructurales en *A. nidulans* (28), se demostró que los protoplastos producidos durante las primeras cuatro horas de acción lítica, se originaron de las regiones apicales y posteriormente de las partes más distales, características que coinciden con nuestros resultados, ya que como se muestra en la figura 5, el mayor daño quitinolítico se dió también en la parte apical de la hifa de *A. niger* y progresivamente en las regiones subapical y distal, como muestran las figuras 6 y 7, respectivamente. Este trabajo (28) confirmó en *A. nidulans*, la producción secuencial de protoplastos, mostrando diferencias significativas sobre su morfología. Los protoplastos fueron identificados por su contenido vacuolar y vesicular, y por la organización general del citoplasma con los organelos. Así, se sabe que el alto contenido vesicular y densidad ribosomal de los protoplastos liberados durante la digestión lítica, sugieren que éstos se originaron de los ápices de las hifas. Los expulsados después y con un alto contenido vacuolar sugieren que se originaron de las partes más distales, caso muy similar con microfotografías presentadas en las figuras 9 y 10, en las que se observan portoplastos de *A. niger*, mostrando variaciones en su morfología, sugiriendo que se originaron también de diferentes puntos del micelio.

Estos patrones de protoplastos son influenciados también por el sistema enzima-estabilizador empleado (63). Por lo que se sabe, la liberación de los protoplastos de *A. niger* es facilitada por el uso de un estabilizador osmótico adecuado, ya que éste mantiene la forma de la célula liberada, y además si se añaden sustancias adecuadas, producen un efecto estimulador (52, 83) de la actividad lítica.

En el presente trabajo, y dentro de ensayos preliminares, se probaron tres tipos de estabilizadores, los cuales fueron en orden de efectividad, el KCl, $MgSO_4$ y NH_4Cl , todos con una molaridad de 0.6. Por tanto, fue el primero el que se usó en los ensayos subsecuentes. Cuando se trabajó con el NH_4Cl , no se obtuvo el éxito señalado en otros reportes (60). Al usar sulfato de magnesio, sólo se logró observar la formación de vacuolizaciones dentro de las hifas, similares a los reportados en otros trabajos (63, 89). En cambio, cuando se incorporó a la suspensión enzimática el KCl 0.6 M, los resultados fueron más satisfactorios. Similares resultados han sido

reportados por otros autores (32, 36) empleando el mismo estabilizador. Sobre este contexto y de acuerdo a Davis (16), existen varios tipos de estabilizadores osmóticos que pueden ser empleados en el aislamiento de protoplastos de hongos, incluyéndose sales inorgánicas, azúcares y azúcares derivados de alcoholes (Polialcoholes o polioles). También cabe mencionar que, dependiendo del organismo, es bien sabido que el tipo y concentración del estabilizador influye notablemente en la producción y estabilidad de los protoplastos, además de que no existe un estabilizador único o ideal para todas las especies de hongos. Así mismo, se sabe que las sales inorgánicas son idóneas para separar protoplastos en hongos filamentosos, en tanto que para las levaduras, son más recomendables los azúcares y polioles (16). Nuestros resultados coinciden también con otros trabajos (52, 53) en los que se utilizó KCl 0.6 M.

Es pertinente decir que al inicio de este trabajo, en el primer intento por producir protoplastos de *A. niger*, se usó también como estabilizador osmótico al Sorbitol 0.8 M sólo, y en ocasiones acompañado de agentes reductores y/o quelantes, el cual da excelentes resultados con levaduras. En nuestro caso, los resultados no fueron satisfactorios.

Por otra parte, la naturaleza del medio de crecimiento y condiciones de cultivo fueron importantes en la lisis y obtención de protoplastos en el presente trabajo. El primero estuvo constituida por sales-nitrato-glucosa, y las segundas fueron a 28°C durante 18-20 h en condición estacionaria. Sin duda alguna, la adecuada constitución de la pared celular en esta fase de crecimiento es también un factor crítico. Al respecto, pueden mencionarse experiencias con *A. nidulans* en las que se demostró que la producción de protoplastos es más alta cuando el micelio es crecido en un medio con glucosa-sales minerales, que cuando es mantenido en el mismo medio pero complementado con extracto de levadura (59). En otro trabajo se demostró que la producción de protoplastos de *A. niger* (53) es mayor cuando es crecido en un medio de sales minerales-glucosa-asparagina, no siendo así cuando es crecido en el mismo medio pero adicionado con extracto de malta ó sobre extracto de malta únicamente. En un estudio reciente con dos mutantes de *A. niger* (55) se demostró que las condiciones de cultivo influyen significativamente sobre la estructura de la pared celular, lo cual afecta el número de protoplastos liberados. Por lo general, la producción de protoplastos disminuye con el envejecimiento del cultivo, sin embargo,

también ha sido confirmado que el crecimiento de las células miceliales en un fermentador produce un tipo de estrés que afecta la producción de protoplastos (55).

La influencia de la edad del cultivo queda de manifiesto en este trabajo, en el que se logró constatar que la lisis y producción de protoplastos por las quitinasas, se favorece más en la fase exponencial de crecimiento (18-20 h). Resultados similares fueron reportados en otros trabajos (53, 62). Las razones precisas de esto no han sido confirmadas, pero tales autores enfatizan que la pared de la hifa es más susceptible a la lisis en esta etapa de crecimiento (exponencial), dado que algunos constituyentes no están del todo bien estructurados, por ejemplo, se ha sugerido (16) que ciertos componentes, como la melanina, está ausente, ó pudiera estar, pero a bajas concentraciones, lo que permite poca resistencia a la acción enzimática. Otra alternativa para explicar esta susceptibilidad es que la concentración de enzimas endógenas, constructores de la pared durante la fase exponencial de crecimiento pudiera ser alta, y que estas pueden complementar el efecto de las enzimas líticas exógenas sobre la pared celular, facilitando así la liberación de los protoplastos (8).

Continuando con nuestros resultados sobre evidencias fotográficas, la figura 11, muestra una toma no esperada, vista al cabo de 5 h de incubación a 37°C, en la que se aprecia varios tipos de aglomeraciones al azar de protoplastos, muy similares a fotografías dadas a conocer por otros autores (59, 64). Esto posiblemente refleja un proceso de regeneración y reversión. Sobre este fenómeno, se sabe que cuando los protoplastos son suspendidos en un medio de crecimiento estabilizado osmóticamente, parte de la población tienden a retornar a su forma de hifa (63), proceso en que hay una reconstrucción de una nueva pared celular. Esto es comúnmente llamado regeneración (89), aunque otros autores (60, 88) dividen el proceso de reconstrucción en fases separadas al describir primero una regeneración y luego una reversión. La diferencia en terminología está fundamentalmente en los patrones de eventos que se suceden en ambas fases y son observados en diferentes hongos. Se dice entonces que el término reversión indica el desarrollo de una hifa completa, cuando los protoplastos son llevados y crecidos en un medio líquido adecuado. Cabe decir que en muchos casos, ya no presentan una conformación normal,

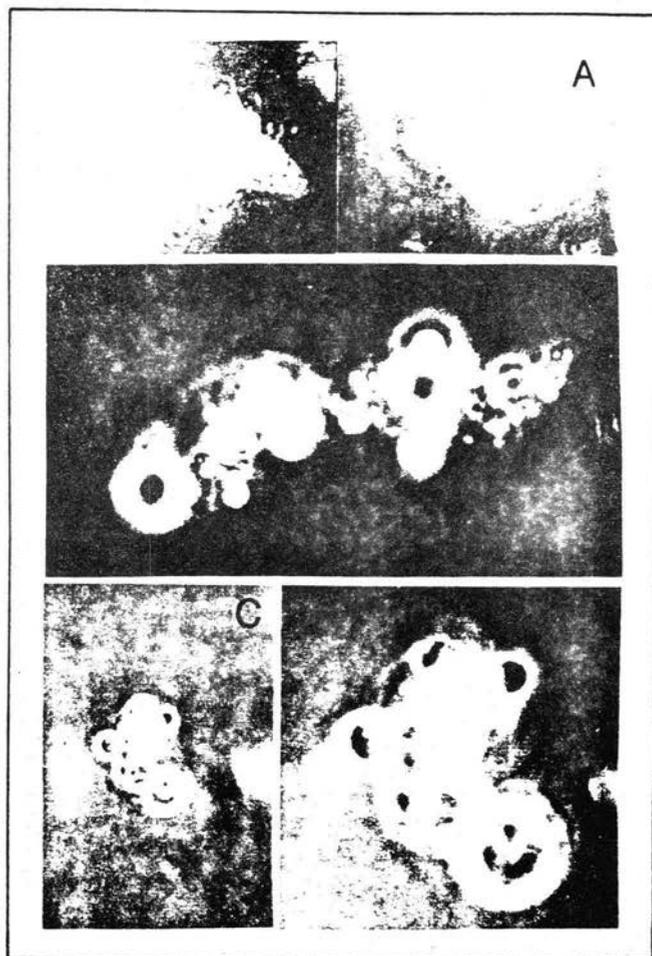


Fig. 11. Agregación de protoplastos de *A. niger* que pudiera indicar una posible regeneración micelial, observado después de 5 h de incubación a 37°C con tratamiento enzimático y $KCl\ 0.6\ M$ 1000X.

sino que se observan como tubos o hifas aberrantes (64). Se sabe también que el poder de regeneración y reversión de los protoplastos varía en las distintas especies de hongos, como fue constatado en un estudio con *Schizophyllum commune* (89) en el que la regeneración de pared de los protoplastos fue casi del 100%, pero la frecuencia de reversión fue tan sólo del 50%. En otro caso, con *A. nidulans* (36), el porcentaje de reversión fue de tan sólo 10 a 30%, aún cuando fue crecido en un medio complejo y definido.

Otro evento observado de manera esporádica en nuestra investigación y tampoco esperado, es el mostrado en la figura 12, que sugiere una fusión de protoplastos. En 12A, se ven dos cuerpos esféricos, con una estructura superficial del tipo laminar, con una envoltura bien definida. No logramos determinar si el tabique intermedio desaparecía con el tiempo de incubación, debido a que el evento no fue estudiado posteriormente. En 12B, se da una ampliación fotográfica de 12A.

En relación a estas observaciones, las cuales suponemos son consecuencia de una fusión de protoplastos de *A. niger*, no encontramos algún trabajo similar en el que se dé una fusión sin proporcionar las condiciones adecuadas, ya que de acuerdo con la literatura sobre este proceso, la fusión sólo puede ser inducida por varios agentes químicos, de los cuales el Polietilenglicol (PEG) es el más eficiente entre los comúnmente usados (66). La importancia de la fusión se basa fundamentalmente en la posibilidad de la hibridación interespecífica de hongos (15). Al respecto, se han obtenido híbridos entre especies de *A. nidulans* y *A. rugulosus*. Las cepas producidas por este proceso permiten un nuevo estudio de su morfogénesis, y de las interrelaciones entre cepas emparentadas y de otros híbridos resultantes (63).

Con esto concluye la descripción de la primera parte de esta tesis, referente al aspecto cualitativo del efecto fungolítico ejercido por las quitinasas de *S. marcescens* sobre la pared celular de *A. niger*, basada fundamentalmente en aspectos microscópicos. Lo que sigue, es un estudio cuantitativo del efecto lítico.

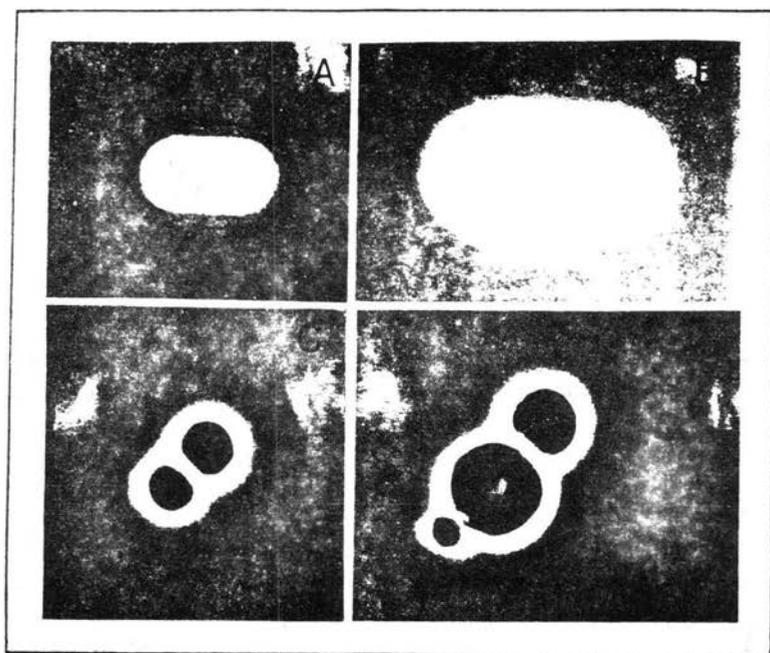


Fig. 12. Fotografías que muestran una posible fusión de protoplastos, después de 5 h a 37°C y con tratamiento enzimático en presencia de un estabilizador osmótico. 1000X

3.3. EVALUACION CUANTITATIVA DE LA LISIS MICELIAL DE *A. niger* POR LAS QUITINASAS DE *S. marcescens*.

En la parte precedente de esta tesis se dieron claras evidencias del daño micelial, originado por las quitinasas sobre la pared celular. Sin embargo, las técnicas microscópicas tardadas y laboriosas, no son apropiadas para evaluar cuantitativamente y de manera rutinaria el proceso lítico. Por ello, en la siguiente etapa del presente trabajo se describirán los resultados obtenidos al aplicar diferentes métodos para la evaluación cuantitativa del fenómeno lítico.

3.3.1. EVALUACION FOTOMETRICA (TURBIDIMETRICA) DEL EFECTO LITICO.

En la figura 13, se muestra el efecto lítico a lo largo de 5 h, expresado como disminución en la turbiedad ($AS_{620\text{ nm}}$) de las suspensiones miceliales tratadas con quitinasas (40-50 UQ/mg de micelio), a dos temperaturas (30 y 37°C). Los datos en todas las gráficas se refieren a la diferencia de lecturas entre testigos y problemas. El resultado muestra que la lisis de la pared celular, no obstante su complejidad, se lleva a cabo como una reacción enzimática del tipo ordinario, en la cual la velocidad de reacción es función del tiempo y la temperatura.

Pueden verse que los trazos obtenidos a las dos temperaturas son lineales y paralelos, es decir, muestran la misma pendiente y por lo tanto involucran la misma energía de activación, aún cuando los valores absolutos de absorbancia son mayores a 37 que a 30°C. En un experimento que será referido posteriormente, se mostrará que la temperatura óptima para la lisis micelial es 37°C (Fig. 17), por esta razón se adoptó ésta, para la continuación del trabajo.

Cabe reiterar que en esta parte de la investigación, el objetivo es comparar la eficacia de diferentes métodos para la evaluación de la fungólisis.

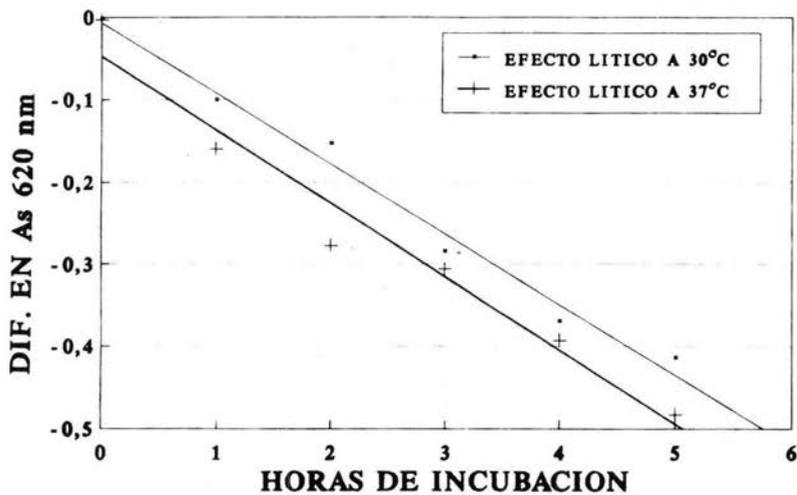


Fig. 13. Evaluación turbidimétrica a 620 nm de la acción litica de las quitinasas de *S. marcescens* (40-50 UQ/ml) sobre suspensiones miceliales (50 mg/ml) de *A. niger*, incubado a 30 y 37°C.

Al respecto, la técnica turbidimétrica fue la que mostró mejores características de sencillez, reproducibilidad y rapidez, y por ello fue adoptada en forma rutinaria para el resto de la investigación.

3.3.2. EVALUACION DEL EFECTO LITICO DE LAS QUITINASAS POR LA ACUMULACION DE N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA (NAG).

Este método se basa en la especificidad de las quitinasas, que al hidrolizar únicamente a la quitina presente en la pared celular, liberan al monosacárido N-acetil-D-glucosamina, el cual puede determinarse por la técnica de Miller (48). Los datos obtenidos se muestran en la figura 14, e indican que la hidrólisis del polisacárido se efectúa rápidamente y de manera lineal. La acumulación del aminoazúcar en el medio de reacción, al menos a los niveles mostrados, parece no inhibir la actividad de las quitinasas y quitobiasas, de ahí que la velocidad de reacción se mantenga constante durante las cinco horas de tratamiento enzimático. Estos datos confirman que la lisis micelial, no obstante su complejidad, se comporta como una reacción enzimática común descrita en la cinética tipo Michaelis-Menten.

Aunque esta técnica es sencilla y da evidencias claras del efecto lítico, es algo más laboriosa que el método turbidimétrico adoptado, pues requiere centrifugar y realizar la evaluación espectrofotométrica mediante una reacción colorida, de los azúcares reductores liberados.

3.3.3. METODO GRAVIMETRICO BASADOS EN LA DISMINUCION DE LA MASA MICELIAL POR ACCION DE LAS QUITINASAS DE *S. marcescens*.

Como en los casos anteriores, se hicieron evaluaciones tanto a 30 como a 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15, en donde se expresa gráficamente la disminución porcentual del peso húmedo de micelio (considerando como cien por ciento el peso inicial) a lo largo de 5 h de incubación. Como puede verse, los valores obtenidos tienden a sujetarse a una relación lineal. En términos generales, los datos son similares a 30 y 37°C, excepto para la primera hora de incubación, donde son significativamente mayores a la última temperatura (37°C).

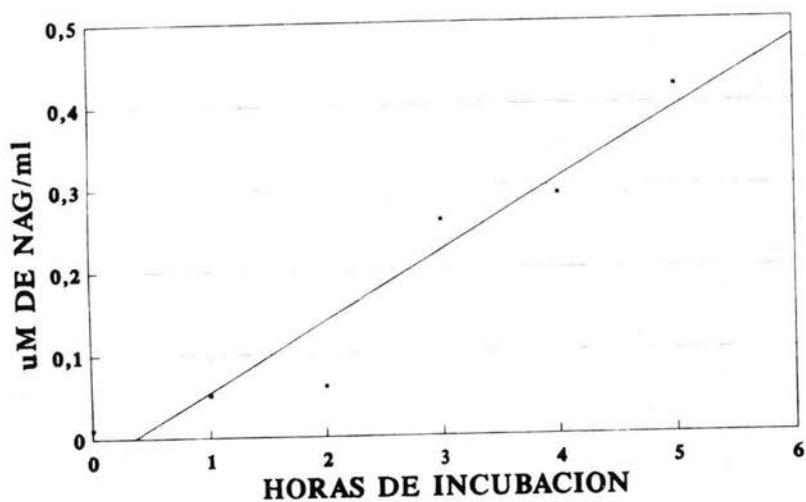


Fig.14. Evaluación de la acción lítica de las quitinasas de *S.marcescens* sobre suspensiones miceliales, expresado como liberación de N-acetil-D-glucosamina (NAG) proveniente de la hidrólisis de la quitina presente en la pared celular de *A. niger*, incubado a 37°C durante 5 h.

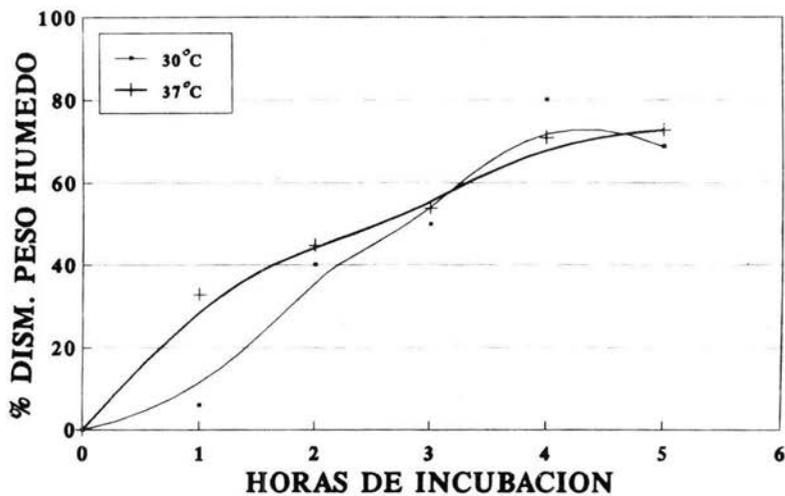


Fig. 15. Evaluación gravimétrica de la acción lítica de las quitinasas (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens* sobre suspensiones miceliales de *A. niger* (50 mg/ml), reportado como disminución en peso húmedo.

En general, el método gravimétrico empleado es laborioso, tardado y poco reproducible debido a la precisión que requieren las pesadas, ya que las muestras empleadas para los problemas y testigos, fueron de apenas 50 mg de micelio peso húmedo y los filtros (Millipore 0.45 μm) puestas a peso constante, con un peso promedio de tan sólo 6.0 mg.

Más complicado resultó montar una técnica gravimétrica para evaluar la lisis micelial en base seca, debido a que las muestras tenían un peso aún más pequeño, y por lo tanto se requerían pesadas muy precisas, lo que daba mayor variación a los resultados.

Aún cuando hubiera sido posible incrementar técnicas gravimétricas más confiables aumentando el tamaño de las muestras, esto representa mayor gasto de micelio y no reduce los tiempos necesarios para secar las muestras hasta peso constante. Por todo ello, este método fue descartado.

3.3.4. EFECTO LITICO EVALUADO POR LA LIBERACION DE PROTEINAS SOLUBLES INTRACELULARES.

Cabe mencionar que además de los métodos mencionados, también se intentó valorar la proteína soluble liberada. Teóricamente, ésta debería ser una de las técnicas más sencillas y confiables, pues se supone que al ser dañada la pared celular por la acción de las quitinasas, el contenido celular liberado y presente en el lisado podría determinarse fácilmente por el método de Lowry (44). Sin embargo, los datos (no incluidos) mostraron una gran variación, sin una tendencia clara.

Una posible causa a esto, es que en la preparación enzimática contiene, además de quitinasas, algunas proteasas, de manera que aún cuando la lisis se efectúa liberando proteínas al medio, éstas son rápidamente degradadas, haciendo que no sean detectadas. Esta técnica fue también desechada.

3.4. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES PARA LA LISIS DE LA PARED CELULAR POR LAS QUITINASAS DE *S. marcescens*.

De acuerdo a lo descrito, el método turbidimétrico por lectura de la absorbancia a 620 nm de las suspensiones miceliales, resultó adecuado para evaluar la fungólisis. Con esta herramienta fue posible estudiar el efecto de diferentes variables en el proceso, según se indican a continuación.

3.4.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

En la figura 16, se puede apreciar que la lisis no procede a 5°C. A temperaturas mayores el efecto lítico es claro, observándose trazos lineales en todos los casos. En orden creciente por el efecto observado, pueden mencionarse las temperaturas de 45, 25, 30, y 37°C.

Como complemento se anexa la figura 17, que resume los datos de la figura anterior, correspondientes a la hora 5 de acción enzimática. El trazo resultante es el de una campana invertida cuyo valor más bajo ocurre a 37°C, que es la temperatura óptima del proceso.

Cabría mencionar que las quitinasas de *S. marcescens* tienen una temperatura óptima de 50°C cuando se ensayan frente a su sustrato (quitina coloidal), a pesar de que por sí solas tienen un carácter termolábil y se inactivan arriba de 37°C. La quitobiasa por su parte, tienen un óptimo entre 50 y 60°C frente al compuesto sintético p-nitrofenil-β-N-acetil-D-glucosaminidina, y también pierden actividad rápidamente arriba de 37°C en ausencia del mencionado sustrato. Los datos encontrados en nuestro trabajo sugieren que el micelio usado como sustrato, no protege a ambas enzimas del efecto térmico. Esto es comprensible si se considera que el micelio no es un compuesto puro, y seguramente ofrece espacios limitados y escasos para la integración de un complejo enzima-sustrato.

3.4.2. EFECTO DEL pH.

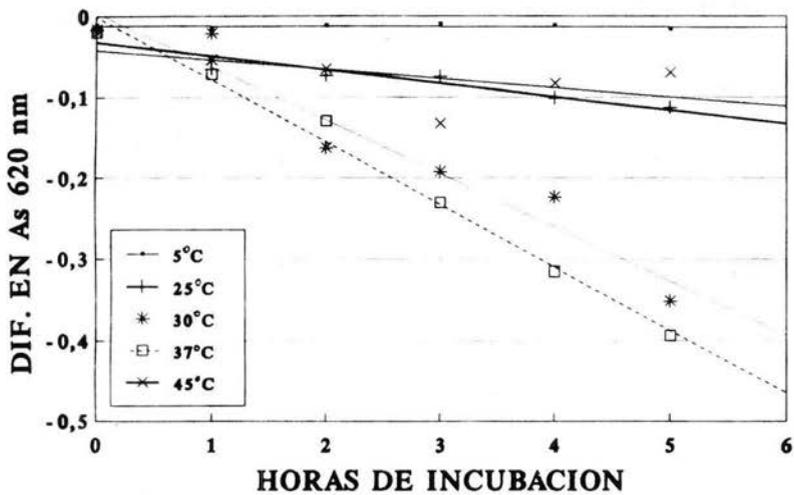


Fig. 16. Efecto de la temperatura sobre la zimólisis micelial (50 mg/ml) de *A. niger* por la acción enzimática (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens*.

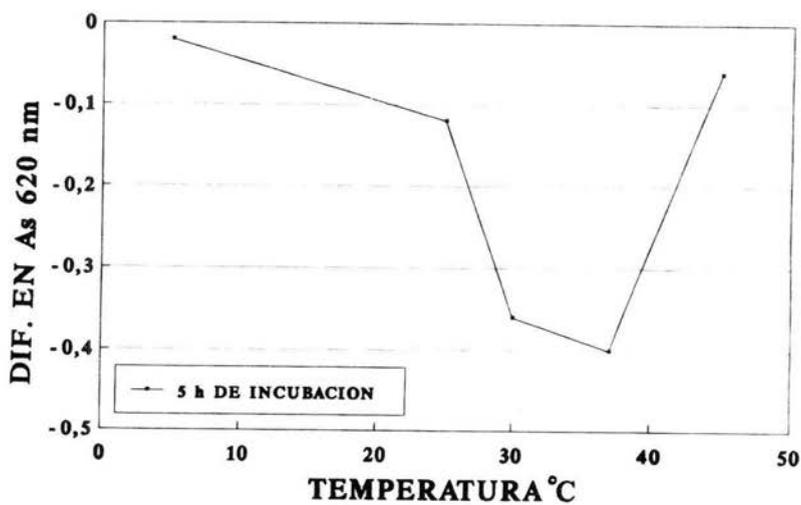


Fig. 17. Efecto de la temperatura sobre la lisis micelial de *A. niger* por las quitinasas de *S. marcescens*. Los datos corresponden a la hora 5 de incubación, y los datos fueron tomados de la fig. 16.

La figura 18 muestra con claridad que la lisis es influenciada por el pH del medio de reacción. Se ensayaron intervalos desde 5 hasta 8. Se nota que el mayor efecto y con valores semejantes, corresponde a los pHs 6 y 7. Esto es congruente con datos obtenidos en otros trabajos previos, e indican que tanto las quitinasas como las quitobiasas tienen un pH óptimo cercano a 6.5 (5, 14).

Para tener una evidencia más precisa, se repitió el experimento, pero ensayando intervalos de pH más estrechos que fueron desde 6.1 a 6.9. Los datos obtenidos se incluyen en la figura 19, en la que puede verse que los trazos son lineales, y mencionándolos de menor a mayor efecto corresponden a los pHs 6.9, 6.7, 6.1 y 6.5. Para el pH 6.3, obtuvo un trazo no lineal, con un efecto evidente al inicio, aunque luego tendió a hacerse asintótico. Al final del experimento, los valores fueron semejantes para todos los casos. Sin embargo, adoptamos el pH 6.5 como el óptimo para el proceso.

Estos datos confirman que las quitinasas y quitobiasas son las responsables de la lisis micelial, pues como se mencionó, su pH óptimo es muy cercano a 6.5. Para precisar, las quitinasas tienen su óptimo en 6.5 y las quitobiasas en 7.0 cuando se ensayan con sus sustratos específicos (14).

3.4.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO (MICELIO, PESO HUMEDO).

La figura 20 muestra claramente que la velocidad de reacción (efecto fungolítico) aumenta a medida que se adicionan cantidades crecientes de micelio. La forma de los trazos es acampanada hasta las 4 h de incubación, observándose un óptimo de concentración de sustrato de 50 mg. A las 5 h, tiende a hacerse hiperbólico. Este último comportamiento se asemeja al que se reporta generalmente para este tipo de estudios y se explica por la ecuación de Michaelis-Menten, aplicable a sistemas sencillos, donde tanto la enzima como el sustrato se encuentran en forma soluble. El sistema estudiado en este caso, es más complejo, ya que el sustrato es de naturaleza

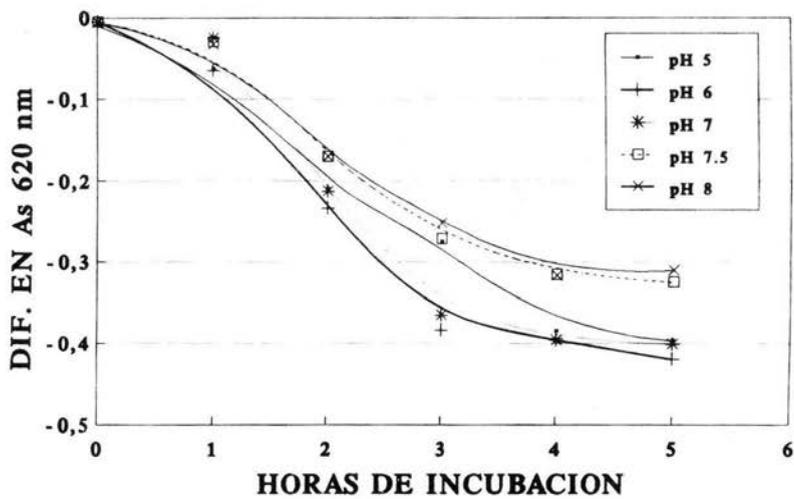


Fig. 18. Efecto del pH sobre la lisis micelial (50 mg/ml) de *A. niger* por las quitinasas (40-50 UQ/ml) extracelulares de *S. marcescens* en un intervalo de 5 a 8 mantenidos a 37°C.

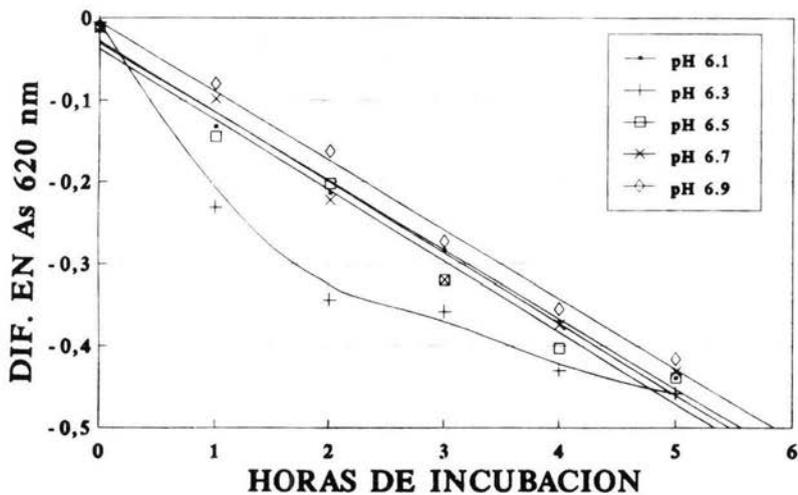


Fig. 19. Efecto del pH sobre la lisis micelial de *A. niger*, por las quitinasas y quitobiasas (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens*, en intervalos estrechos de 6.1 y 6.9, con 50 mg/ml de micelio.

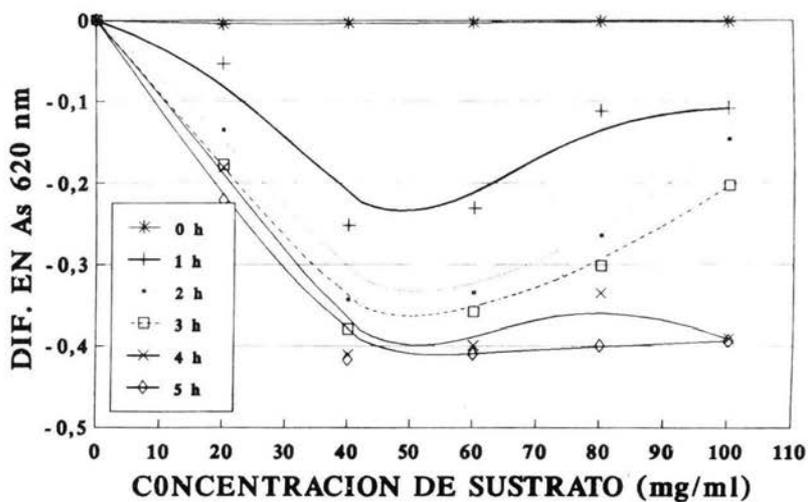


Fig. 20. Efecto de la concentración de micelio de *A. niger*, sobre la velocidad de reacción (fungólisis) producida por las preparaciones crudas de *S. marcescens* a 37°C con 40-50 UQ/ml.

insoluble, de composición heterogénea y una estructura molecular tan complicado como puede serlo la pared en células miceliales viables y metabólicamente activas.

Es de llamar la atención la forma de las gráficas, que van pasando poco a poco de una forma acampanada a una hiperbólica conforme transcurre el tiempo de incubación, aparentemente a tiempos cortos se presenta un fenómeno inhibitorio si se usan más de 50 mg de micelio como sustrato, esta inhibición tiende a desaparecer y se mantiene a una velocidad máxima constante cuando el tiempo de incubación es de 5 h.

3.4.4. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA.

Según la cinética Michaeliana convencional, la velocidad de reacción debe aumentar proporcionalmente conforme se incrementa la concentración de enzima en el medio. Los datos son plasmados en la figura 21, la que sugiere una tendencia a esta predicción. De cualquier modo, es evidente que el sistema no ha sido saturado por la enzima y que podría incrementarse la velocidad de reacción agregando cantidades de enzima mayores a la 40 UQ/ml, la limitante es obtener tales concentraciones de enzima, debido a que en los extractos, generalmente contienen cantidades de entre 30 a 40 UQ/ml. Para lograr incrementar el contenido de enzima debe recurrirse a procesos de ultrafiltración. Para propósitos prácticos, esto resulta inadecuado y además costoso.

3.4.5. EFECTO DE LA AGITACION.

En vista de que el micelio es un sustrato insoluble, y que con el tiempo tiende a sedimentarse, se propuso estudiar si una agitación favorecía de manera significativa la acción hidrolítica. Los resultados obtenidos se manifiestan en la figura 22 y muestran que la lisis aumenta ligeramente en condiciones de agitación. Sin embargo, se nota que en condiciones de reposo también procede. Los trazos en nuestro caso son paralelos. El poco incremento en la lisis podría atribuirse a que la agitación empleada, por un lado favorece la no sedimentación, pero por otro,

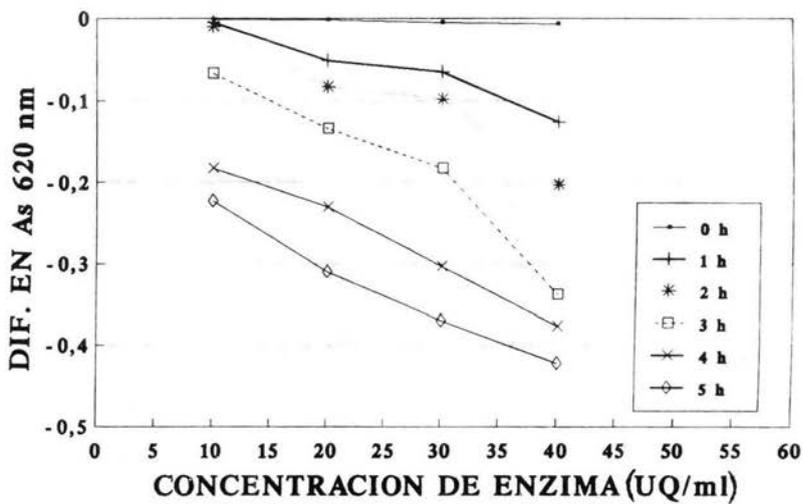


Fig. 21. Efecto de la concentración de quitinasas sobre la velocidad de lisis micelial (50 mg/ml) de *A. niger* a 37°C, durante 5 h.

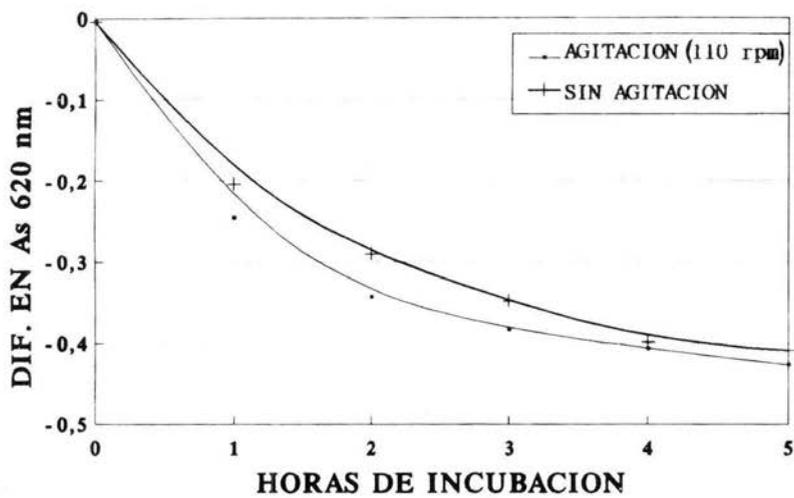


Fig. 22. Influencia de la agitación (orbital 110 rpm) y reposo sobre la lisis micelial (50 mg/ml) de *A. niger* por las quitinasas y quitobiasas (40-50 UQ/ml) de *S. marcescens*, a 37°C.

puede dificultar la adsorción de la enzima sobre el sustrato. Es posible que con agitaciones más moderadas, pudiesen por un lado impedir la sedimentación del micelio y por otro favorecer el efecto lítico.

3.5. PARTICIPACION DE LAS PROTEASAS EN LA LISIS MICELIAL.

Se sabe que en la pared, pero sobre todo en la membrana citoplasmática, se encuentran una gran diversidad de proteínas en elevada proporción, por lo tanto, no debe descartarse la posibilidad de que en la lisis estén actuando las tres enzimas presentes en el extracto crudo empleado, es decir, las proteasas, quitinasas y quitobiasas.

En trabajos previos (13), quedó establecido que las quitinasas y quitobiasas de *S. marcescens* son tiol-dependientes, es decir, que son fácilmente inactivadas por mercuriales tales como el p-cloromercuribenzoato (PCMB). Por el contrario, las proteasas, son sumamente resistentes a la acción de una gran diversidad de sustancias.

Gracias a estos antecedentes, se realizó un experimento que consistió en inactivar previamente a las quitinasas y quitobiasas con PCMB, con una diálisis posterior para eliminar el exceso del inhibidor. La muestra resultante se hizo actuar sobre el micelio de *A. niger*, y como testigo se hizo actuar la misma muestra enzimática sin ningún tratamiento.

Los datos obtenidos quedan presentados en la figura 23, donde puede verse que cuando sólo actúan las proteasas casi no hay efecto lítico, dado como $As_{620\text{ nm}}$ hasta las 4 h de incubación, luego ocurre una ligera insinuación de efecto, pero que de ninguna manera tiene significancia al cabo de 5 h, tiempo máximo de experimentación.

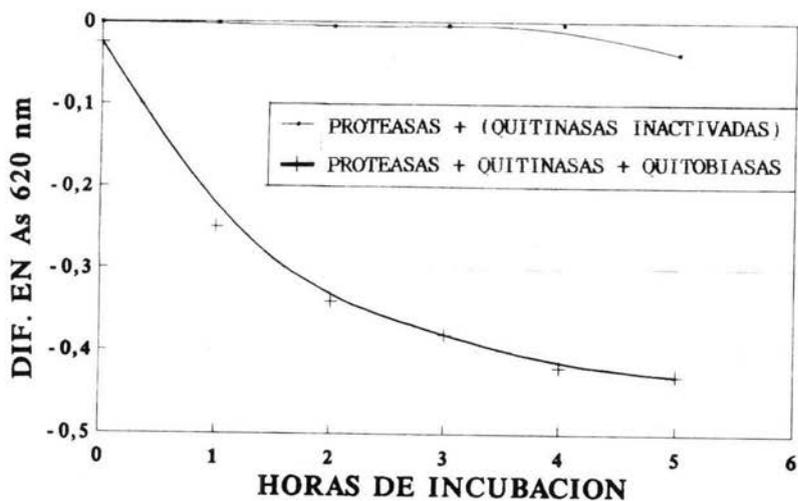


Fig. 23. Lisis micelial de *A. niger* (50 mg/ml) en presencia de una preparación de proteasas, quitinasas y quitobiasas (testigo), y el efecto lítico cuando sólo están actuando las proteasas más el sistema quitinolítico inactivado, a 37°C.

Así mismo, se muestra que en el testigo, en el cual las enzimas están activas, la lisis ocurre rápidamente. Ello permite concluir que son las quitinasas y quitobiasas las principales responsables del daño lítico, al menos en las primeras 5 h de acción enzimática.

El hecho de que las proteasas no provoquen un efecto lítico puede deberse al menos a las siguientes causas: las proteínas, en el caso de *A. niger*, se encuentren en baja proporción en su pared celular y/o no son importantes en el mantenimiento de la integridad estructural de la pared. O también puede ser que aún cuando las proteínas realicen un rol importante en la composición y estructuración de la pared, las proteasas de *S. marcescens* no las ataquen en grado significativo, al menos en las 5 h que dura el experimento, porque el pH del ensayo fue de 6.5 y no 10, que es el pH óptimo de estas proteasas.

4.0 CONCLUSIONES

4.1. De la fermentación por *S. marcescens* de subproductos proteín-quitinosos, tales como el carapacho de camarón, puede obtenerse un extracto crudo que contiene: proteasas, quitinasas y quitobiasas.

4.2. Las quitinasas digieren la pared micelial de *A. niger* en presencia o ausencia de estabilizadores osmóticos. En el primer caso, pueden obtenerse protoplastos, y en el segundo, células lisadas.

4.3. Las condiciones óptimas para la producción de protoplastos son: 40-50 UQ/ml; concentración micelial de 50 mg/ml; pH 6.5; 37°C; edad micelial 18-20 h; y con KCl 0.6 M como estabilizador osmótico. Los protoplastos se forman desde las 3 h y alcanzan su máximo al cabo de 5 h de incubación.

4.4. Durante la producción de protoplastos, las quitinasas actúan posiblemente en esta secuencia: primero, se observa un daño sobre la región apical, luego sobre zonas puntuales de la pared y al final un ataque lítico extensivo a lo largo del micelio.

4.5. Los protoplastos obtenidos varían en tamaño, aspecto, y poco en forma, debido a que provienen de diferentes porciones de la pared celular. Esto implica, que de una sola célula micelial pueden formarse uno o más protoplastos, y que el contenido intracelular y organelos están asimétricamente distribuidos en la célula micelial.

4.6. Los protoplastos obtenidos en el presente trabajo mostraron la clásica fragilidad osmótica al disminuir la concentración salina del medio, eran permeables a colorantes, mostraron gran actividad metabólica y permanecían viables hasta por 24 h.

4.7. En la lisis y producción de protoplastos no participan las proteasas presentes en el extracto crudo utilizado.

4.8. El mejor método para evaluar la lisis celular producida por las quitinasas de *S. marcescens*, en ausencia de un estabilizador osmótico, es medir la disminución de la turbiedad micelial a 620 nm.

4.9. Las condiciones óptimas para la lisis micelial son: temperatura de 37°C; pH de 6.5; concentración de sustrato de 50 mg/ml (micelio, peso húmedo); concentración de enzima de 40-50 UQ/ml, con o sin agitación.

4.10. El empleo de extractos crudos de las enzimas quitinolíticas de *S. marcescens* es adecuado porque son fáciles de obtener, baratas y más estables que si fueran preparaciones puras.

5.0. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Aguayo Roussell, B. (1976). Estudios preliminares sobre la producción de quitinasas por *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.
2. Allan, G., Atman, L. C., Besinger, R. E., Gosh, D. K. y Ncogi, S. (1984). Biomedical Applications of Chitin and Chitosan. En: *Chitin, Chitosan and related enzymes*. J. P. Zikakis (Ed.). Academic Press, Inc. Orlando, San Diego, New York, p. 19.
3. Anderson, M. S. y Dutton, M. F. (1979). The use of cell free extracts derived from fungal protoplasts in the study of aflatoxin biosynthesis. *Experientia* 35: 21-22.
4. Arredondo Martínez, D. (1989). Nuevos aportes a la purificación de la quitinasa de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.
5. Arreola Mendoza, J. E. (1992). Datos no publicados.
6. Bachmann, B. J. y Bonner, D. M. (1959). Protoplasts from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 78: 550-556.
7. Badr-Eldin, S. M., El-Tayeb, O. M., Rasmy, S. A. y El-Shafei, H. A. (1992). Mycolytic activity of a *Micrococcus sp.* *J. Ferment and Bioeng.* 74(5): 271-273.
8. Bartnicki-García, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
9. Beyer, M. y Diekmann, H. (1985). The chitinase system of *Streptomyces sp* and its significance for fungal wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 140-146.
10. Blackwell, J. R. y Weith, R. A. (1984). The structure of chitin-protein complexes. En: *Chitin, Chitosan and related enzymes*. J. P. Zikakis (Ed.). Academic Press, Inc. Orlando, San Diego, New York. Pp. 257-272.

11. Brine, Ch. J. (1984). Chitin: accomplishment and perspectives. En: *Chitin, Chitosan and related enzymes*. J. P. Zikakis (Ed.). Academic Press, Inc. Orlando, San Diego, New York. pp.7-24.

12. Camacho Velásquez, M. (1992). Separación de la N-acetil-D-glucosamina proveniente de la sacarificación *in vitro* de subproductos proteín-quitosos. Tesis Profesional, ENCB.

13. Chávez Camarillo, G. M. (1984). Estudios cinéticos y caracterización parcial del sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.

14. Chávez Camarillo, G. M. y Cruz Camarillo, R. (1984). El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. *Rev. Lat.amer. Microbiol.* 26: 203-215.

15. Das, A., Gokhale, D. V. y Peberdy, J. F. (1989). Protoplasts fusion and genetic recombination in intra- and interstrain crossing in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 2-5.

16. Davis, B. (1985). Factors influencing protoplasts isolation. En: *Fungal Protoplasts - applications in Biochemistry and Genetics*. J. F. Peberdy y L. Frenczy (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 45-71.

17. Davis, B. y Eveleigh, E. (1984). Chitosanases: ocurrence, production and inmovilization. En: *Chitin, Chitosan and related enzymes*. J. P. Zikakis (De.). Academic Press, Inc. Pp. 161-179.

18. Davis, B., d' Avillez Paixao, M. T., Deans, S. G. y Smith, J. E. (1977). Protoplasts formation from giant cell of *Aspergillus niger*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69: 207-212.

19. Davies, D. A. L. y Pope, A. M. S. (1978). Mycolase, a new kind of systemic antimycotic. *Nature* 273: 235-236.

20. Escudero Abarca, B. I. (1986). Quitinasas Microbianas. Ejercicio escrito de exámen Predoctoral, ENCB.

21. Emerson, S. y Emerson, M. R. (1958). Production, reproduction and reversion of protoplasts- like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 44: 668-671.
22. Esquivel Esquivel, I. E. (1992). Perfil enzimático extracelular de *Bacillus thuringiensis*, y búsqueda de cepas de esta bacteria con capacidad quitinolítica similar a *Serratia marcescens* WF. Tesis Profesional, ENEP-Iztacala (Realizada en la ENCB).
23. Farkas, V. (1979). Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiol. Rev.* 43: 117-144.
24. Farkas, V. (1985). Fungal cell walls. En: *Fungal Protoplasts -Applications in Biochemistry and Genetics*. J. F. Peberdy y L. Ferenczy (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 3-29.
25. Farkas, V. (1990). Fungal cell walls: their structure, biosynthesis and biotechnology aspects. *Acta Biotechnol.* 10: 225-238.
26. García Mendoza, C. y Villanueva, J. R. (1962). Production of yeast protoplasts by an enzyme preparation of *Streptomyces* sp. *Nature* 195: 1326-1327.
27. Gascón, S., Ochoa, A. G. y Villanueva, J. R. (1965). Production of yeast and mold protoplasts by treatment with the strepzyme of *Micromonospora AS*. *Can. J. Microbiol.* 11: 573-580.
28. Gibson, R. K. y Peberdy, J. F. (1972). Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 529-538.
29. Gilliland, S. E. (1979). Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans. *J. Food Protection* 42: 164-167.
30. Goldman, G. H., Queiroz, M. V., Costa, C. y Azevedo, J. L. (1989). Isolation, regeneration and nuclear conditions in protoplasts of a cellulolytic strain of *Aspergillus niger*. *Rev. Microbiol.* 20:501-506.

31. Gutierrez Garcia, A. (1989). Utilización del carapacho de camarón para la producción de proteasa extracelular de *Serratia marcescens*, y su posible uso para la producción de hidrolizados de carne de pescado de especies no grasosas. Tesis Profesional, ENCB.
32. Hamlyn, P. F., Bradshaw, R. E., Mellon, F. M., Santiago, C. M., Wilson, J. M. y Peberdy, J. F. (1981). Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 321-326.
33. Hernández Carmona, L. A. (1990). Producción de N-acetil-D-glucosamina por sacarificación enzimática de residuos quitinosos. Tesis Profesional, ENCB.
34. Hirano, S., Senda, H., Yamamoto, Y. y Watanabe, A. (1984). Several novel attempts for use the potential of chitin and chitosan. En: *Chitin, Chitosan and related enzymes*. J. R. Zikakis (Ed.). Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, New York. p. 77.
35. Hoh, Y. K., Tan, T. K. y Yeo, H. H. (1992). Protoplasts fusion of β -Glucosidase-producing *Aspergillus niger* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 81-88.
36. Isaac, S. y Peberdy, J. F. (1979). Production of mycolytic enzymes, isolation and ultrastructure of protoplasts from fungi. En: *Protoplasts -Applications in Microbial Genetics*. J. F. Peberdy (Ed.). University of Nottingham Press, Nottingham. pp. 12-22.
37. Jeuniaux, C. y Ruiz-Herrera, J. (1978). Distribution and quantitative importance of chitin in animals. En: *Proceedings of the First International Conference of Chitin/Chitosan*. Boston, Mass. R. A.A. Muzzarelli y E. R. Parizer. pp. 5-21.
38. Jhonston, I. R. (1965). The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochem.J.* 96: 651-658.
39. Kirimura, K., Itohiya, Y., Matsuo, Y., Zhang, M. y Usami, S. (1990). Production of cellulase and citric acid by the intergeneric fusants obtained via protoplasts fusion between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viridae*. *Agric. Biol.Chem.* 54: 1281-1283.

40. Kuboye, A. O., Anderson, J. G. y Smith, J. E. (1976). Control and autolysis of a spherical cell forms of *Aspergillus niger*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67(1): 27-31.
41. Lisker, R. (1981). Deficiencias de lactasa: frecuencia, modo de herencia e implicaciones prácticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 31: 223-234.
42. Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R., Tronsmo, A., Wood, S. Y. y Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
43. Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K. y Harman, G. E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140: 623-629.
44. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall. L. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
45. Mejía López, A. (1990). Fermentación del carapacho de camarón suspendido en agua de la llave, dirigida a la producción de quitinasas y al estudio del sólido remanente. Tesis Profesional, ENCB.
46. Mehta, A., Chopra, S. y Metha, P. (1993). Production of cell wall-degrading enzymes by three isolates of *Aspergillus niger* under different cultivation conditions. *J. Basic. Microbiol.* 33: 193-199.
47. Mérit, X., Frot-Coutaz, J., Got, R. y Létoublon, R. (1992). *Aspergillus niger* G proteins: subcellular localization. *FEMS Microbiol. Letters* 92: 259-264.
48. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 3: 426-428.
49. Monreal, J. y Reese, E. T. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.

50. Moreira Avila, G. N. (1979). Aprovechamiento por vía microbiológica de los materiales quitinosos utilizando *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.
51. Morrissey, R. E., Dugan, E. P. y Koths, J. S. (1976). Chitinase production of *Arthrobacter sp* lysing cell of *Fusarium roseum*. *Soil Biol. Biochem.* 8: 23-28.
52. Musilková, M. y Fencl, Z. (1966). Formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 11: 472-474.
53. Muzilková, M. y Fencl, Z. (1968). Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 13: 235-239.
54. Muzilková, M., Fencl, Z. y Seichertova, O. (1969). Release of *Aspergillus niger* protoplasts by *Penicillium purpurugenum* enzymes. *Folia Microbiol.* 14: 47-50.
55. Muzilková, M., Ujeová, E., Placek, J., Fencl, Z. y Seichert, L. (1981). Release of protoplasts from a fungus as a criterion of mechanical interactions in the fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 441-446.
56. Muzzarelli, R. A. A. (1977). *Chitin: Industrial production and applications*. Pergamon Press, New York. pp. 207-213.
57. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C. y Gooday, G. W. (1986). *Chitin in Nature and Technology*. Pergamon Press, New York. p. 435.
58. Peberdy, J. F. (1972). Protoplasts from fungi. *Sci. Prog. Oxford* 60: 73-86.
59. Peberdy, J. F. (1976). Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. En: *Microbial and Plant Protoplasts*. J. F. Peberdy, A. H. Rose, H. J. Rogers y E. C. Cocking (Eds.). Academic Press, New York. pp. 39-50.
60. Peberdy, J. F., Buckley, C. E., Daltrey, D. C. y Moore, P. M. (1976). Factors affecting protoplasts release in some filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67: 23-26.

61. Peberdy, J. F. e Isaac, S. (1976). An improved procedure for protoplast isolation from *Aspergillus nidulans*. *Microbios Lett.* 3: 7-9.
62. Peberdy, J. F. (1978). Protoplasts and their development. En: *The Filamentous Fungi* Vol. 3. J. E. Smith y D. R. Berry (Eds.). Edward Arnold, London. pp. 119-131.
63. Peberdy, J. F. (1979). Fungal Protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annu. Rev. Microbiol.* 33: 21-29.
64. Peberdy, J. F. (1979). Wall biogenesis by protoplasts. En: *Fungal wall and hyphal growth*. J. H. Burnett y A. P. Trinci (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 49-70.
65. Peberdy, J. F. (1980). Vegetative growth of filamentous fungi. En: *Development Microbiology*. J. F. Peberdy (De.). pp. 44-68.
66. Peberdy, J. F. (1980). Protoplasts fusion -a tool for genetic manipulations and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 23-29.
67. Peberdy, J. F. (1985). Mycolytic enzymes. En: *Fungal Protoplasts -Applications in Biochemistry and Genetic*. J. F. Peberdy y L. Ferenczy (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York. p. 31.
68. Peberdy, J. F. (1989). Presidential address: Fungi without coats-protoplasts as tool for mycological research. *Mycol. Res.* 93: 1-20.
69. Pérez Martínez, M. E. (1986). Selección de una levadura capaz de crecer en un hidrolizado enzimático de subproductos quitinosos (caparazón de camarón). Tesis Profesional, ENCB.
70. Rabadán López, A. (1991). Utilización del carapacho de camarón para la producción de proteasa extracelular de *Serratia marcescens*, y su posible uso para la producción de hidrolizado de carne de pescado de especies grasosas. Tesis Profesional, ENCB.

71. Reyes, F., Calatayud, F. y Martínez, M. J. (1988). Chitinolytic activity in the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Letters* 49: 239-243.
72. Rojas Avelizapa, L. I. (1994). Producción de proteasas por *Bacillus thuringiensis* crecido en medios a base de materiales protein-quitinosos. Posible uso de estas enzimas en la obtención de hidrolizados a partir de carnes y harina de pescados. Tesis Profesional de Maestría en Biotecnología, ITV-ENCB.
73. Rokem, J. S., Klein, D., Toder, H. y Zomer, E. (1986). Degradation of fungal cell wall taking into consideration the polysaccharide composition. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8: 588-592.
74. Rosenberger, R. F. (1976). The cell wall. En: *The Filamentous Fungi* Vol. 2. J. F. Smith y D. R. Berry (Eds.). Edward Arnold, London. pp. 328-344.
75. Ruiz-Herrera, J. (1967). Chemical components of the cell wall of *Aspergillus* species. *Arch. Biochem Biophys.* 122: 118-125.
76. Ruiz Romero, A. M. (1977). Purificación y caracterización de la quitinasa extracelular de *Serratia marcescens*. Tesis Profesional, ENCB.
77. Sánchez Sandoval, E. A., Chávez Camarillo, G. M., Santiago Baños, A. y Cruz Camarillo, R. (1986). Algunos aspectos sobre la purificación de enzimas del sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. *Resúmenes del XVII Congreso Nacional de Microbiología*. Puebla, Pue., Abril 27-30. p. 10.
78. Santiago Baños, A. (1986). Estudio comparativo entre enzimas líticas comerciales y extractos crudos del tracto digestivo de *Helix aspersa* para la obtención de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Profesional, ENCB.
79. Santos Segura, A. (1993). Síntesis y caracterización de las proteasas de *Bacillus thuringiensis* (extracto crudo) secretadas durante la fermentación de subproductos protein-quitinosos. Tesis Profesional, ENCB.

80. Stagg, C. M. y Feather, M. S. (1973). The characterization of chitin-associated D-glucan from the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Acta* 320: 64-72
81. Tagawa, K. y Okasaki, K. (1991). Isolation and some cultural conditions of *Streptomyces* species which produce enzymes lysing *Aspergillus niger* cell wall. *J. Ferment. Bioeng.* 71: 230-236.
82. Thomas, K. R., Davis, B. y Mills, J. (1979). The effect of β -glucuronidase and chitinase on the cell wall of *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbios* 25: 111-123.
83. Thomas, K. R. y Davis, B. (1980). The effect of calcium on protoplasts release from species of *Aspergillus*. *Microbios* 28: 69-80.
84. Tominga, Y. y Tsujisaka, Y. (1976). Purification and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. *Agric. Biol. Chem.* 40: 2325-2333.
85. Tung, K. K., Rosenthal, A. y Nordin, J. H. (1971). Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. II. Purification and properties of mycodextranase, an endo- α -D-(1, 4)- glucanase from *Penicillium melinii*. *J. Biol. Chem.* 246: 6722-6736.
86. Uchida, Y., Izume, M. y Ohtakara, A. (1989). Preparation of chitin oligomers with purified chitosanase and its applications. En: *Chitin and Chitosan*. G. Skjak-Brack, T. Anthonsen y P. Sanford (Eds.). Elsevier Applied Science Ltd., London y New York. pp. 373-382.
87. Villanueva, J. R. (1966). Protoplasts of fungi. En: *The Fungi* Vol. 2. G. C. Ainsworth y A. S. Sussman (Eds.). Academic Press, New York. pp. 3-62.
88. Villanueva, J. R. y García Acha, Y. (1971). Production and use of fungal protoplasts. En: *Methods in Microbiol.* Vol. 4. C. Booth (Ed.). Academic Press, New York. pp. 665-718.
89. de Vries, O. M. H. y Wessels, J. G. H. (1972). Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic preparation from *Trichoderma viridae*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 13-22.

90. Watanabe, J., Ogasawara, N., Tanaka, H. y Uchiyama, T. (1988). Effect of fungal lytic enzymes and non-ionic detergents on the action of some fungicides against *Pyricularia oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 895-901.
91. Young, M. E. (1983). Relación entre la degradación de sustratos insolubles y producción de enzima. En: *Biotecnología de enzimas*. C. Huitrón (Ed.). UNAM. pp. 139-152.
92. Zonneveld, B. J. M. (1971). Biochemical analysis of the cell wall of *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Acta* **249**: 506-514.