



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“Obtención, semipurificación y caracterización de la enzima quitina desacetilasa del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* para la conversión de quitina a quitosán por medio de desacetilación enzimática”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

KRISOL ZAVALA CAMACHO

ASESORAS: DRA. S. PATRICIA MIRANDA CASTRO.  
DRA. MARÍA CRISTINA PÉREZ REYES.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

## AGRADECIMIENTOS:

*Dios, tu bien sabes lo que he vivido, cada una de mis penas y alegrías, sin ti nada de lo que he logrado hubiera sido posible, mi vida es tuya, gracias por toda la felicidad y amor con la que has llenado mi camino*

### A MIS PADRES:

*Gracias por ser mi más grande ejemplo de superación, fuerza, ternura, amor y por educarme en un ambiente de respeto y libertad, los amo!*

### A MI HERMANA:

*Gracias por ser la mejor consejera y amiga, nunca olvides nuestra promesa y este logro también es para ti.*

---

*A MI TÍA Y PRIMA:*

*Gracias por estar presentes en los momentos más importantes de mi vida y por apoyarme en cada decisión que he tomado.*

*A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN*

*UNAM*

*Agradezco la oportunidad de haber estudiado en esta magnífica institución, me siento orgullosa de los conocimientos que adquirí aquí, que con esfuerzo y deseos de superación he logrado concluir para poder representarte con dignidad.*

---

*A MIS ASESORAS:*

*A la Dra. Susana P. Miranda C. por el apoyo incondicional que me brindó en la realización de este proyecto y por su bella amistad.*

*A la Dra. Cristina Pérez por su dedicación en los cimientos de este proyecto, por su amabilidad y buena disposición para ayudarme a identificar el hongo *Colletotricum lindemuthianum*.*

*A TODOS MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE CARRERA:*

*Gracias por su compañía agradable y divertida, por todas las experiencias de vida que me llevo con su recuerdo, pero sobre todo gracias por enseñarme que podemos llegar muy lejos si trabajamos en equipo.*

*¡Adelante 27's!*

---

## RESUMEN

Este proyecto se realizó con el objetivo de llevar a cabo la desacetilación vía enzimática de la quitina para su conversión a quitosan, debido a que el proceso vigente es químico y altamente contaminante lo cual se atribuye al uso de ácido clorhídrico.

La enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) puede ser obtenida de distintos hongos, tales como; *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* (ATCC 56676), *Colletotrichum lindemuthianum* (DSM 63144), pero las características de la enzima obtenida de estos hongos es distinta, las condiciones bajo las que se llevó a cabo la elección de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) fueron: la localización de la enzima (intracelular o extracelular), el peso molecular, el punto isoeléctrico, el pH óptimo, la temperatura óptima y si se presentaba inhibición con el grupo acetato (5). Bajo estas premisas se eligió la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) producida por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, aunque en cuanto a su subclasificación no se fue muy estricto, debido a la dificultad de encontrar este hongo.

Se utilizaron 4 cepas de distintos orígenes de *Colletotrichum lindemuthianum* a las que se llamaron 1.b aislado de la raíz de una planta de frijol que resultó manifestar Antracnósis, la 1.d originaria del tallo de una planta de frijol con antracnósis, PM3 aislado de aguacate y *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 el cual fue donado por el Dr. Raúl Rodríguez Guerra del INIFAP.

La quitina se desacetiló por medio de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) producida extracelularmente por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* para su conversión a quitosan.

Durante la realización de este proyecto se manejaron distintas condiciones de pH en unas pruebas preliminares las cuales fueron de 3.09 (pH natural del medio de cultivo líquido con la enzima) y 8.5 (ajustado con solución de NaOH al 13%), después todos los experimentos se llevaron a cabo a un pH de 8.5 con el medio de cultivo y la enzima, incubando a 50°C durante 7 días, y por último

---

se mantuvieron las condiciones antes mencionadas para el proceso de desacetilación, pero realizando un previo tratamiento a la quitina con la enzima lisozima, ya que esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces N-acetamido.

Después de llevar a cabo la desacetilación enzimática a diversas condiciones se obtuvo un complejo quitina-quitosan al que se le determinó el grado de desacetilación por medio del método de titulación potenciométrica y con espectro infrarrojo, para la detección de cambios en la quitina original, donde se manifiestan las modificaciones por las que pasó la quitina al ser desacetilada con distintas condiciones, dando como resultado un %máximo de desacetilación de 69.52%.

---

## INDICE GENERAL

INTRODUCCION.	12
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
CAPITULO I. ANTECEDENTES.	16
1.1. Generalidades.	17
1.2. Biocompuestos o polímeros biosintéticos.	19
1.2.1. Quitina.	21
1.2.2. Quitosán.	22
1.2.3. Diferencia entre quitano y quitosán.	23
1.3. Aplicaciones en la industria alimentaria.	23
1.3.1. Aplicaciones específicas del quitosán.	25
1.3.1. Perspectivas futuras del quitosán.	27
1.4. Vías de producción del quitosán.	28
1.5. Desacetilación.	29
1.5.1. Proceso químico de desacetilación	29
1.5.2. Desventajas del método químico.	29
1.5.3. Proceso enzimático de desacetilación	30
1.6. Papel biológico.	31
1.7. Antracnosis o mielilla.	34
1.7.1. Condiciones que favorecen su desarrollo y medios de transmisión	35
1.8. Generalidades de los hongos.	35



---

1.8.1. Generalidades de los hongos que producen quitina desacetilasa	36
1.8.2. Conidios presentados en el <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .	39
1.8.3. Micelio.	40
1.8.4. Apresorios.	41
1.8.5. Haustorios.	41
CAPITULO II. METODOLOGIA.	43
Cuadro Metodologico.	44
Objetivo Particular 1.	46
Actividad 1.1. Origen de la cepas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> aisladas experimentalmente.	46
Actividad 1.2. Acondicionamiento de la muestras para su aislamiento.	47
Actividad 1.3. Siembra del material sospechoso de la antracnósis	47
Actividad 1.4. Identificación del hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .	48
Objetivo particular 2.	48
Actividad 2.1. Cosechas de esporas.	48
Actividad 2.2. Inoculación en medio nutritivo estéril de la cepa.	49
Objetivo particular 3.	50
Actividad 3.1. Hidrólisis enzimática con lisozima	50
Actividad 3.2. Desacetilación enzimática.	50
Objetivo particular 4.	51
Actividad 4.1. Procedimiento para llevar a cabo la desacetilasa enzimática.	52
Objetivo particular 5.	55
Actividad 5.1. Preparación de los geles de poliacrilamida.	55
Actividad 5.2. Preparación de gel de resolución.	56

---

Actividad 5.3. Preparación de gel de empacamiento.	56
Actividad 5.4. Preparación de la muestra biológica.	57
Actividad 5.5. Electroforesis de proteínas en gel de archilamida	57
Actividad 5.6. Coloración y visualización de proteínas.	59
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	60
Resultados correspondientes a objetivo particular 1.	61
Resultados correspondientes a objetivo particular 2.	69
Resultados correspondientes a objetivo particular 4.	76
Resultados correspondientes a objetivo particular 5.	78
<i>CONCLUSIONES</i>	85
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	87
<i>Anexo A</i>	92
<i>Anexo B</i>	93

---

## LISTA DE FIGURAS

Número		Página
1	Estructura química de la quitina	21
2	Estructura química del quitosán	22
3	Diferencia entre estructura química de quitano y quitosán	23
4	Estructura de la enzima quitina desacetilasa	33
5	Reacción catalizada por la enzima quitina desacetilasa	34
6	Constitución general del hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	38
7	Vista microscópica de un frijol con antracnosis.	38
8	Forma de una hifa vista microscópicamente.	39
9	Conidios que presentan el <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> visto microscópicamente	39
10	Forma general de un micelio	40
11	Vista microscópica de un apresorio de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .	41
12	Vista microscópica de un Haustorio. Ejemplificación del gráfico que se obtiene por medio de relación PH vs volumen de Na	42
13	OH	53
14	Forma correcta en que se deben encontrar un sistema para electroforesis	59
15	Muestras con las que se trabajó debido a la sospecha de antracnosis en frijol y vaina.	61
16	Enfermedad provocada por el hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en vainas de frijol	63
17	Enfermedad provocada por el hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en frijol	64
18	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en un medio de agar papa dextrosa y papa zanahoria. Competencia del crecimiento entre los hongos <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> y	64
19	<i>Fusarium</i>	65
20	Cepa raza 467	66
21	Cepa 1.b obtenida a partir de una herida de tallo que manifestó una planta de frijol con antracnosis.	66
22	Cepa 1.d. obtenida de un fragmento de raíz dañada por la antracnosis	67
23	Cepa PM3 obtenida de una herida de aguacate causada por daño por antracnosis	67
24	Conidios y micelio del hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> raza 467.	68
25	Fotografías de los apresorios del hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> raza 467	69
26	Crecimiento y desarrollo de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> raza 467	70
27	Cepa de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 1.b en medio líquido	72
28	Cepa de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> raza 467 en medio líquido	73
29	Cepa de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> 1.d en medio líquido	73
30	Cepa de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> PM3 en medio líquido a diferentes tiempos de incubación	74
31	Gel de poliacrilamida obtenido experimentalmente	79

---

## LISTA DE CUADROS

Número		Página
1	Características del quitosan obtenido químicamente	17
2	Características fisicoquímicas del quitosan obtenido químicamente	18
3	Características de la enzima quitina desacetilasa de diferentes orígenes	32
4	Composición de la pared celular de los hongos	36
5	Seguimiento experimental del desarrollo del hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en medio de cultivo líquido	70
6	Seguimiento experimental en el medio de cultivo conteniendo tween 80 con las distintas Cepas del hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	71
7	Prueba preliminar para revisión de posibilidad de desacetilación de quitina.	75
8	Porcentaje resultante de la determinación de grado de desacetilación en distintas muestras de quitina-quitosán por titulación potenciométrica.	77
9	Distancia recorrida durante la electroforesis por el marcador molecular Cat-161 Bio Rad en un gel de poliacrilamida al 10%	81
10	Distancia recorrida durante la electroforesis en el gel de poliacrilamida al 10%, por los extractos enzimáticos de quitina desacetilasa, y su peso molecular.	82

---

## LISTA DE DIAGRAMAS

Número		Página
1	Vías de producción de quitosan	27
2	Cuadro Metodológico	44
3	Obtención de la enzima quitina desacetilasa	48

## GRÁFICO

Número		Página
1	Relación existente entre la distancia recorrida por el marcador de peso molecular y el log. De peso molecular	81

---

## INTRODUCCIÓN

El laboratorio de Biotecnología de la FESC-1 trabaja con biopolímeros, en especial con quitina y quitosan que son polisacáridos notables debido a que poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas excepcionales lo cual contribuye a diversas aplicaciones en la industria. Las fuentes comerciales potenciales de quitina son los caparazones de jaiba, camarón, langosta, krill y calamar, aunque es importante señalar a la industria de la fermentación basada en hongos como otra fuente de quitina. <sup>(9, 14)</sup>

Este trabajo presenta las bases fundamentales para llevar a cabo la desacetilación de la quitina vía enzimática, lo cual beneficiaría a la industria alimentaria y médica debido a su múltiple y continuo uso en el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en el uso de un polímero tan importante como lo es la quitina y su forma desacetilada el quitosan. <sup>(8, 32)</sup>

Algunos autores han estudiado la hidrólisis enzimática de derivados solubles de quitinas, y han concluido sobre el uso de lisozima para hidrolizar quitina y algunos derivados <sup>(8)</sup>, como en el caso de la carboximetil quitina y la carboximetilquitosana por esta razón, se realizó un tratamiento previo con esta enzima para proceder con la desacetilación de la quitina vía enzimática. <sup>(24)</sup>

En este trabajo, se propone el uso del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* para la obtención de la enzima quitina desacetilasa (CDA, EC. 3.5.1.41) <sup>(5)</sup>, ya que en este hongo la enzima se produce extracelularmente, a su estabilidad al calor, pero sobre todo por su actividad en presencia de acetato (el cual inhibe la actividad de varios hongos) que es un compuesto que se genera en la desacetilación enzimática <sup>7</sup>, debido a que cuando se pierde el acetilo del grupo acetilamino, la quitina se convierte en quitosan <sup>6</sup>. Uno de los hongos más importantes que es inhibido por esta causa es el *Mucor rouxii*, el cual presenta una actividad únicamente del 57%, contra 96% de actividad del *Colletotrichum lindemuthianum*. <sup>(18, 28)</sup>

---

Es importante señalar que para la realización de este proyecto durante un lapso de 4 meses se trabajó en la búsqueda del hongo *Colletotricum lindemuthianum* en ceparios de la UNAM, Instituto Politécnico Nacional, Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo, INDRE, e INIFAP - Campo Experimental Bajío, la última institución aquí mencionada donó una cepa de *Colletotricum lindemuthianum* raza 467 ; por otra parte durante tres meses se sembraron en medios de papa dextrosa y papa zanahoria varios frijoles y vainas dañadas o con indicios de antracnosis, logrando aislar e identificar tres cepas de distintos orígenes de *Colletotricum lindemuthianum*; una de ellas se obtuvo de aguacate, la segunda del tallo de una planta germinada de frijoles con antracnosis, y de la raíz de una planta de frijol con antracnosis. <sup>(19)</sup>

Es importante mencionar que el hongo *Colletotricum lindemuthianum* es patógeno para las plantas de frijol, aguacate, oleaginosas y frutos, es por esta razón que experimentalmente el frijol y aguacate son el origen del cual se aisló este hongo. <sup>(19)</sup>

Esta tesis muestra los objetivos y las ventajas que traería desacetilar enzimáticamente a la quitina, y se realizó una comparación con la desacetilación química, finalmente se concluye sobre la funcionalidad de la desacetilación enzimática.

---

## JUSTIFICACIÓN

Mediante este proyecto se plantea la desacetilación enzimática de la quitina para la obtención de quitosán, la importancia de este proyecto radica en que ofrece una propuesta novedosa que no produce contaminación para el medio ambiente.

## OBJETIVO GENERAL

Obtener, semipurificar y caracterizar la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* obtenida de diversas fuentes vegetales, para la conversión de quitina a quitosán y su comparación con la desacetilación química.

## OBJETIVOS PARTICULARES

### OBJETIVO PARTICULAR 1

Aislar e identificar el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de diferentes fuentes vegetales (de distintos tipos de frijoles, vainas de frijoles y fragmentos de cáscara aguacate con sospechas de antracnósis) como fuente de obtención de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).

### OBJETIVO PARTICULAR 2

Extraer y semipurificar la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) a partir del cultivo del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en medio líquido, para separarla y concentrarla mediante una filtración con Amberlita.

.



---

### **OBJETIVO PARTICULAR 3**

Establecer las condiciones experimentales de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) para la desacetilación de quitina.

### **OBJETIVO PARTICULAR 4**

Evaluar el grado de desacetilación de la quitina, por medio de titulación potenciométrica e infrarrojo usando la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* para concluir sobre el grado de desacetilación que se produce por vía enzimática.

### **OBJETIVO PARTICULAR 5**

Determinar el peso molecular de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) obtenida, mediante electroforesis para proteínas con la finalidad de confirmar en base a la expresión de bandas en el gel de poliacrilamida que se trabajó con la enzima quitina-desacetilasa.

# **CAPÍTULO I:**

## **ANTECEDENTES**

---

### 1.1 GENERALIDADES

La desacetilación de la quitina es un proceso que generalmente se lleva a cabo mediante el uso de químicos tales como ácido clorhídrico (HCl), produciendo la N-desacetilación de quitina, generando quitosan. Desafortunadamente la desacetilación química consume grandes cantidades de energía, y son muy agresivos para el medio ambiente. <sup>(8)</sup>

Por estas razones varios autores han propuesto distintos modos de desacetilación, ya sea por medio de desacetilación termoalcalina homogénea y heterogénea que son las más comunes, la preparación enzimática de quitosan partiendo del micelio del hongo *Aspergillus Niger* <sup>(14)</sup> y la desacetilación enzimática por medio de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) originaria de diversos hongos, entre los cuales lo más destacados son el *Mucor Rouxii*, *Absidia Coeruela*, *Aspergillus Nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Escherichia Coli*. <sup>(5, 8, 9)</sup>

Según el artículo de la Dra. S. Patricia Miranda “Comportamiento de películas de quitosan compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate”, después de la desacetilación química se obtiene lo siguiente:

Cuadro 1. Características del quitosan obtenido químicamente.

Peso molecular del quitosan	Grado de desacetilación	Solubilidad en ácido acético al 1%
130,000 g/mol	85%	completamente

Estos valores constituyen las bases fundamentales y punto de comparación del quitosan obtenido vía química. <sup>(19)</sup>

En el artículo “Las nanopartículas poliméricas: nuevos sistemas para mejorar la biodisponibilidad ocular de fármacos” <sup>(2)</sup>, llevó a cabo la obtención de quitosan a diferentes condiciones experimentales a las del trabajo de la Dra. Miranda, las cuales se determinaron mediante la caracterización fisicoquímica del quitosan. <sup>(2)</sup>

La caracterización fisicoquímica en este artículo se realizó mediante la determinación de:

- Grupos acetilos
- Grupos aminos
- Viscosidad intrínseca
- Masa molecular promedio de quitina y quitosan obtenidos

En base a estos parámetros, se hizo un análisis de los productos que mejores propiedades presentaron, y se encontró que las mejores condiciones de extracción fueron: tratamiento con HCl 3N durante 48 horas a temperatura ambiente; tratamiento con NaOH 1N durante 36 horas a 100 grados centígrados. Bajo estas condiciones experimentales se obtuvieron los siguientes valores de masa molecular, grado de desacetilación y porcentaje de grupos amino. <sup>(2)</sup>

Cuadro 2.- Características fisicoquímicas del quitosan obtenidas químicamente.

Masa molecular promedio del quitosan	Porcentaje de grupos amino	Porcentaje de desacetilación
907,789 D	4.83%	54.37%

### 1.2 BIOCOPUESTOS O POLÍMEROS SEMI-SINTÉTICOS

La obtención de materiales formados por la combinación de polímeros naturales y sintéticos, es de gran interés en diversas áreas tecnológicas, porque en ellos se combinan las ventajas de los polímeros de origen natural, como así también las ya conocidas de los polímeros sintéticos. Por lo tanto, estos materiales, pueden ser diagramados con nuevas propiedades e interesantes usos. <sup>(12)</sup>

Los polímeros de origen natural poseen propiedades muy importantes: higroscopicidad, biocompatibilidad, biodegradación, diversidad de interacciones biológicas y presentar grupos funcionales reactivos polares por lo que actualmente son utilizados para la composición de diversos productos; pero tienen las desventajas de que poseen pobres propiedades mecánicas y pérdida de sus propiedades biológicas durante el proceso de formulación, ya que son sensibles a los cambios de temperatura. Por ejemplo el colágeno, es uno de los biomateriales más populares usado para la reparación y reconstrucción de la piel, pero resulta difícil realizar su aplicación y formulación de manera reproducible. <sup>(15)</sup>

Con respecto a los polímeros sintéticos, ellos tienen las siguientes ventajas: son económicos, versátiles, con excelentes propiedades mecánicas y de muy buena resistencia química. Estos, poseen las desventajas de ser no compatibles, no biodegradables y ser costoso su reciclado. Debido a estas ventajas y desventajas, es que en los últimos años, se ha estado trabajando en la obtención de materiales biocompuestos o semi-sintéticos, en los cuales se reúnen las ventajas de ambos tipos de polímeros y se disminuyen algunas de las desventajas de ambos. Este tipo de materiales se benefician fundamentalmente por tener un amplio rango de propiedades físico-químicas y aceptar diversas técnicas de procesamiento aplicables a los polímeros sintéticos. Un ejemplo clásico de este tipo de sistemas es una mezcla de un

poli (HEMA) con gelatina, en el cual se ha mitigado la baja adhesión del poli (HEMA) combinándolo con una proteína multifuncional como la gelatina. Otros ejemplos, son los materiales compuestos de polivinilalcohol (PVA) y fibrinógeno o PVA-colágeno o la modificación de una serie de proteínas activas biológicamente con polietilenglicol (PEG), que resulta en un aumento de la persistencia del biomaterial en el torrente sanguíneo con un decrecimiento de su inmunogenicidad y aumento de su resistencia proteolítica. Esta combinación facilita el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos más eficientes para aplicaciones en diversas áreas, como medicina, farmacia, etc. <sup>(12)</sup>

Otro factor importante a tener en cuenta, es que los polímeros sintéticos, por problemas de índole ecológica, están siendo gradualmente reemplazados por materiales biodegradables, especialmente por aquellos derivados de fuentes naturales renovables. Dichas fuentes son principalmente provenientes de desechos de la agricultura o marinos, por lo tanto, es importante que este tipo de desarrollo sea realizado conjuntamente con centros de investigación cercanos a lugares en los cuales se acumulan este tipo de materiales. Esto capitaliza la conservación de la fuente natural y ayuda al cuidado del medio ambiente, con la ventaja adicional de dar materiales que por acción de una biodegradación o desintegración den origen a otros compuestos que pueden actuar como fertilizantes o acondicionadores del suelo. Esto último, es particularmente interesante y atractivo para la industria del envase y en especial para aquellos envases usados en la industria alimenticia. Algunos de los polímeros de origen natural que cumplen con las características mencionadas anteriormente son el quitosán, diferentes tipos de almidones, celulosa, alginatos, carragenanos, etc. <sup>(12)</sup>

### 1.2.1 QUITINA

El término quitina deriva de la palabra griega, que significa túnica, haciendo referencia a su dureza. La quitina es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, del resistente exoesqueleto que tienen la mayoría de los insectos y otros artrópodos, y algunos otros animales.

Es un polisacárido, compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Éstas están unidas entre sí con enlaces  $\beta$ -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. Así, puede pensarse en la quitina como en celulosa con el grupo hidróxilo de cada monómero reemplazado por un grupo de acetilamina. Esto permite un incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes, dándole al material una mayor resistencia.<sup>(1)</sup>

Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula. La quitina se vuelve soluble en ácidos minerales diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosan.

#### ESTRUCTURA QUIMICA DE LA QUITINA

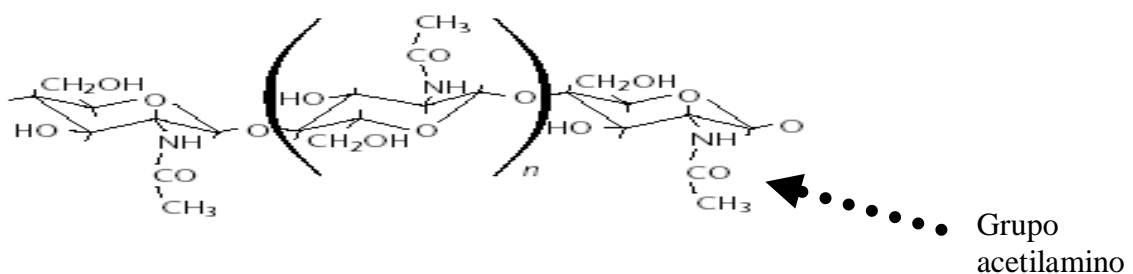


Figura 1: En esta figura se muestra la estructura química de la quitina.

Fuente: <sup>(24)</sup>

### 1.2.2 QUITOSAN

El quitosán, el derivado más importante de la quitina, es un biopolímero lineal formado por unidades de 2-desoxi 2-amino glucosa, obtenido de la desacetilación de ésta. <sup>(8)</sup>

Presenta una gran aplicabilidad comercial, debido a varios factores entre los que se cuentan su solubilidad en ácidos diluidos y la presencia de grupos hidroxilos y aminos libres en la cadena polimérica, lo cual le confiere una gran capacidad para atrapar iones metales pesados; no es tóxico, es biodegradable y biocompatible. <sup>(8)</sup>

#### ESTRUCTURA QUIMICA DEL QUITOSAN

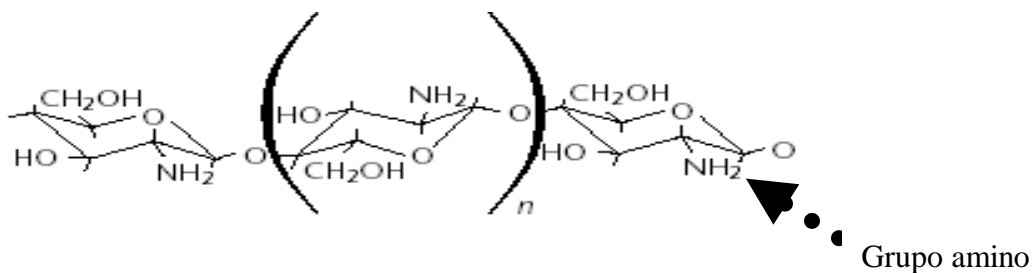


Figura 2: En esta figura se muestra la estructura química del quitosán.

Fuente: <sup>(1)</sup>



## 1.2.3 DIFERENCIA ENTRE QUITANO Y QUITOSAN

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano; sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades  $\alpha(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y  $\alpha(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable, como por ejemplo la distinta solubilidad en medio acuoso que pueden llegar a tener. Las estructuras químicas del quitano y el quitosano se muestran a continuación: <sup>(13)</sup>

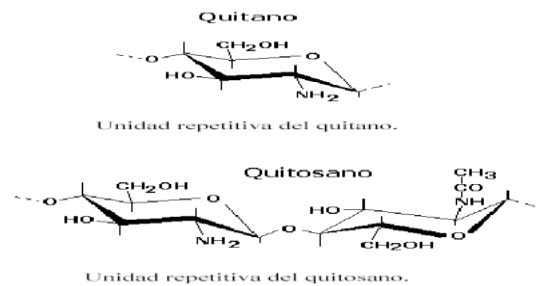


Figura 3. Diferencia entre la estructura química del quitano y quitosano

Fuente: (13)

## 1.3 APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Debido a las propiedades que presenta la quitina y quitosano, a la composición y conformación de estos polímeros se han encontrado múltiples aplicaciones, entre las más importantes se enlistan las siguientes:

- La quitina ofrece consistencia a alimentos procesados, atrapa grasa, es antibacterial y sirve como envoltura biodegradable, entre otros beneficios, la quitina está involucrada en la protección de varias especies.<sup>(15)</sup>
- Pueden servir como acarreadores no absorbibles de ingredientes altamente concentrados (colorantes, saborizantes y nutrientes), cuya descarga puede ser controlada por la lisozima.<sup>(15)</sup>
- El quitosano no es digerible por los humanos y por consiguiente, actúa como fibra dietética. Además, inhibe la absorción de colesterol y otros lípidos.<sup>(15)</sup>
- Otras posibles aplicaciones del quitosan en alimentos para consumo humano son como agente espesante, estabilizante, espumante, ligante, emulsificante, quelante, humectante.<sup>(8)</sup>
- Como ayudante en la fabricación y texturización de proteínas solubles, como coadyuvante en la extensión de la vida de anaquel de encurtidos y como material de empaque biodegradable.<sup>(8)</sup>
- Debido a sus características funcionales y a su inocuidad se ha utilizado en la industria de alimentos y bebidas.<sup>(15)</sup>
- Una de sus más prometedoras aplicaciones podría ser como plástico biodegradable.<sup>(14)</sup>

### 1.3.1 APLICACIONES ESPECÍFICAS DEL QUITOSÁN

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como la reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc., de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc. <sup>(13)</sup>

El quitosán es soluble en agua acidificada. Esta solubilidad y su viscosidad (que puede hacerse más espesa o más ligera, según se requiera) son características que lo hacen aplicable a usos variados, así como su acción de "imán bioquímico", capaz de detectar sustancias nocivas. Por ejemplo, en el estómago humano, atrapa grasas como el colesterol y los triglicéridos, a los que conduce por el intestino capturados hasta evacuarlos. Así que una aplicación farmacéutica lo utiliza como regulador del peso corporal, mientras que también sirve como regulador de la presión arterial, consecuente a la disminución de grasas. <sup>(15)</sup>

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil material es conveniente realizar una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le han ido dando. A continuación se presentan algunas de ellas, aunque la lista no pretende ser exhaustiva.

#### **a) Química analítica**

Aplicaciones cromatográficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc. <sup>(15)</sup>

#### **b) Biomedicina**

Membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc. <sup>(15)</sup>

### **c) Agricultura y ganadería**

Recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, en formulación de pesticidas, etc.

### **d) Cosméticos**

Espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo. <sup>(15)</sup>

### **e) Dietéticos**

Adelgazantes, existe una amplia variedad de productos comerciales que ofrecen el polímero como atrapador de grasas en el estomago. <sup>(15)</sup>

### **f) Industria cosmética y papelera**

En la industria ha jugado varios papeles importantes y diversos como los que se menciona a continuación:

En la **industria de los cosméticos**, el quitosán se introduce en cremas humectantes, pues es una molécula que absorbe el agua. Algunos fabricantes de shampoo lo utilizan como ingrediente, ya que desarrolla una película que da protección y brillo al cabello. <sup>(15)</sup>

En la **industria papelera**, donde el principal insumo es la celulosa, el quitosán sirve para fijar y dar resistencia al papel, mientras que una de sus más prometedoras aplicaciones podría ser como plástico biodegradable, sustituyendo al plástico tradicional derivado del petróleo, uno de los materiales

más utilizados en el mundo y más difíciles de degradarse, lo que genera mucha contaminación. <sup>(15)</sup>

### **g) Tratamiento de agua**

El quitosan es utilizado como agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas y spas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc. <sup>(15)</sup>

### **h) Biotecnología**

En Biotecnología el quitosan se utiliza como material plástico alternativo, se desarrolló una especie de celofán a partir de esta sustancia natural. <sup>(19)</sup>

Las suspensiones coloidales de nanopartículas poliméricas son, sin duda, los sistemas que muestran en la actualidad un mayor grado de innovación y versatilidad. Estos sistemas se pueden presentar en forma de nanopartículas sólidas elaboradas a partir de un polímero biodegradable o bien, en forma de nanocápsulas consistentes en nanogotículas de aceite envueltas de una cubierta polimérica. Precisamente, en virtud a esa distinta composición interna, estos sistemas coloidales permiten incluir en su estructura fármacos con características fisicoquímicas bien diferenciadas, desde moléculas altamente hidrofílicas y polares como son los antibióticos aminoglucósidos hasta fármacos muy hidrofóbicos, como es la ciclosporina A. <sup>(19)</sup>

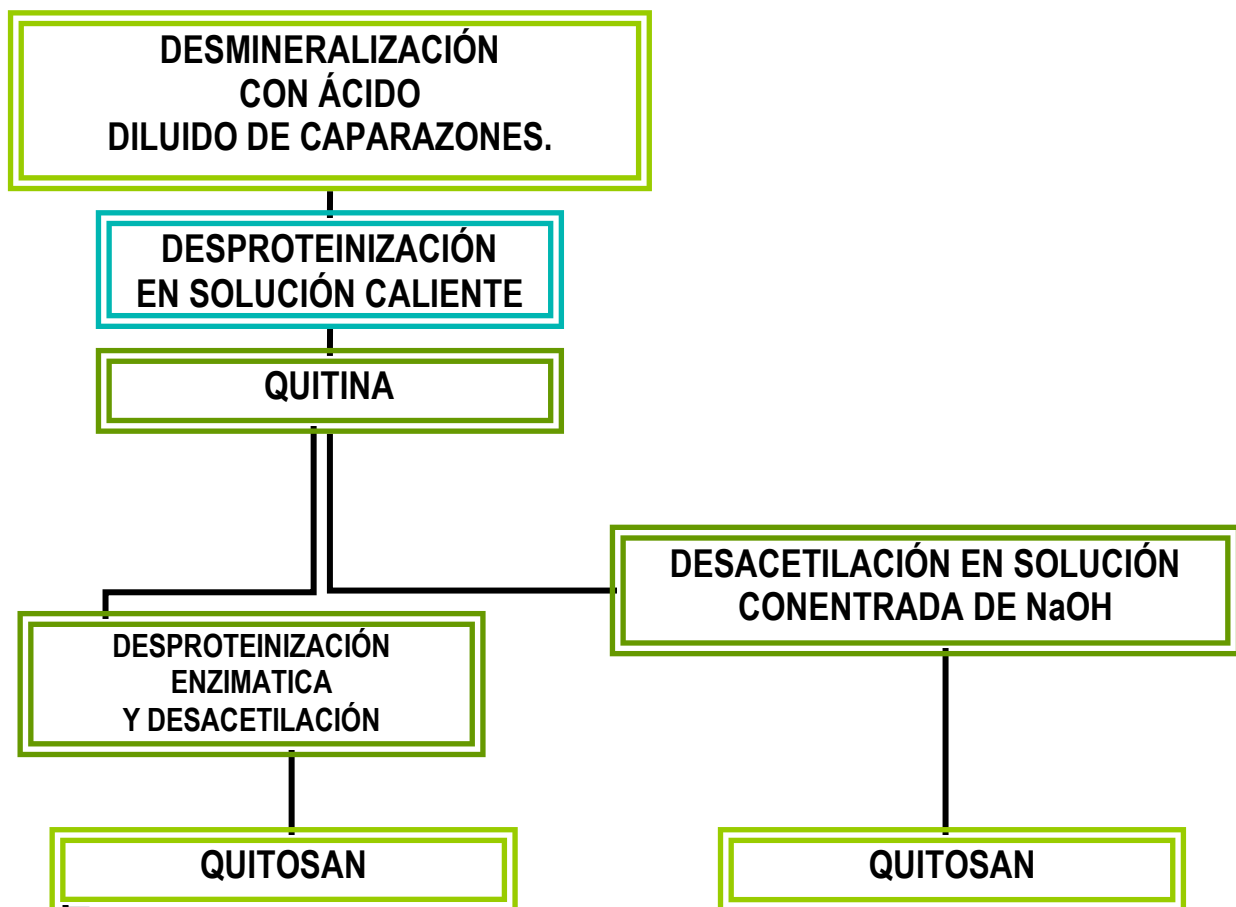
### **1.3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS DEL QUITOSAN**

A pesar del gran número de aplicaciones potenciales existentes y el considerable progreso realizado en la investigación de quitina y quitosan, es necesario potencializar su utilización en diversos sectores industriales que, con excepción del campo de la salud humana, se han mostrado hasta ahora con ciertas reservas. Ello ha sido debido por un lado a la falta de confianza en la capacidad de las industrias proveedoras para suministrar materia prima, y por otro lado al papel negativo que han jugado las patentes ralentizando el desarrollo del mercado. En la actualidad, la tendencia del mercado de los

productos de quitina y quitosano se dirige a su aplicación dietética y biomédica pero en un futuro próximo deberíamos considerar la posibilidad de su utilización para el empaquetado de alimentos y otros productos reduciendo de esta manera el volumen de desechos procedentes de envoltorios y favoreciendo la protección de la vida salvaje. Dentro de la dinámica actual de reutilización y minimización de residuos la obtención de compuestos de alto valor como la quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos representa una interesante oportunidad. <sup>(15)</sup>

### 1.4 VIAS DE PRODUCCIÓN DE QUITOSÁN

Diagrama 1. En este diagrama de bloques se presentan las vías de producción de quitosán (vía química y vía enzimática).



### 1.5 DESACETILACIÓN

#### 1.5.1 PROCESO QUÍMICO DE DESACETILACIÓN.

Primero los camarones son desproteinizados bajo condiciones alcalinas, el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) es removido por ácido clorhídrico (HCl), la concentración a utilizar de este ácido depende del peso molecular del producto final que se quiera, y así se produce la quitina pura. La N-desacetilación de quitina de una de las formas de obtenerla heterogénea y homogéneamente. <sup>(32)</sup>

En el método heterogéneo, la quitina es tratada con altas temperaturas (aprox.  $50^\circ\text{C}$ ), solución concentrada de NaOH y el quitosán producido es un precipitado insoluble; el quitosán preparado por este método es 85-95% desacetilado.

De acuerdo al método homogéneo la quitina además de ser tratada con NaOH, es tratada bajo condiciones más suaves. Este método propicia que el quitosán sea soluble en agua con un grado de desacetilación entre 48 y 55 % <sup>(32)</sup>

#### 1.5.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO QUÍMICO EN SU FORMA HOMOGÉNEA O HETEROGÉNEA:

- 1.- La desacetilación química consume considerables cantidades de energía.
- 2.- Estos métodos desperdician la solución concentrada alcalina, resultando un incremento en el nivel de la contaminación al medio ambiente.
- 3.- Estos guían los productos con un ancho rango de peso molecular y heteromaterial exento de desacetilación.

### 1.5.3 PROCESO ENZIMÁTICO DE DESACETILACIÓN CON LA ENZIMA QUITINA DESACETILASA (CDA, EC. 3.5.1.41).

La quitina desacetilasa (CDA, EC. 3.5.1.41) es una enzima que ha sido identificada en diversos hongos e insectos; estas enzimas catalizan la hidrólisis del grupo N-acetamido vinculado con la quitina, convirtiéndola en quitosan. Cuando el quitosan ha sido producido por un proceso termoquímico complejo, tiene diversas aplicaciones en áreas semejantes tales como la biomedicina, ingredientes alimenticios, cosméticos y productos farmacéuticos.<sup>(32)</sup>

El uso de quitina desacetilasa en la conversión de quitina en quitosan en contraste con los químicos utilizables en este proceso, ofrece la posibilidad de controlar un proceso no degradable, resultando una nueva producción bien definida de quitosan, oligómeros y polímeros.<sup>(32)</sup>

La quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) a sido encontrada caracterizada y purificada en varios hongos, tales como el *Mucor rouxii*, *Absidia coruela*, *Aspergillus nidulans* y dos tipos de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Estas enzimas tienen una temperatura óptima de 50°C y exigen una especificidad al enlace B-(1,4)- unido con N-acetyl-D-glucosamine de polimeros en solución acuosa; sin embargo estas varían en gran medida en cuanto a su peso molecular y contenido de carbohidratos, y se diferencian también en cuanto a su ph óptimo.<sup>(32)</sup>

Una propiedad interesante con una aplicación biotecnológicamente potencial por la enzima obtenida de *C. lindemuthianum* y *A. nidulans*, que son estables a cambios térmicos, esto no es inhibido por el acetato un producto de la reacción de polimerización.<sup>(32)</sup>



Similarmente los oligómeros de quitosan son preparados por hidrólisis ácida de polímeros de quitosán. Un método quimo-enzimático utiliza lisozima y tri-N-acetilquitobiosa derivada de sustratos reportados en la preparación específica de oligómeros de quitosan. De cualquier modo el resultado en cuanto a los productos de los dos métodos y sus mezclas hechas al azar desacetilaron oligómeros de quitosan con varios grados de polimerización. <sup>(32)</sup>

El uso de quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) para la preparación de polímeros de quitosan y sus oligómeros ofrece la posibilidad de desarrollar un proceso enzimático que puede superar potencialmente al químico. <sup>(32)</sup>

### 1.6 PAPEL BIOLÓGICO

Se ha revelado que en el caso del *M. rouxii* la síntesis de quitina con quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) se lleva a cabo por polimerización de N-acetil-D-glucosamina (UDPGlcNaC), e hidrólisis de quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41), el lazo N-acetamida en cadenas de quitina, actúa más eficientemente con quitina micro fibrilar. Resultados similares donde además los productos obtenidos por medio del hongo *Absidia coerulea*, donde se ha encontrado que CDA sea localizado cerca de la cara interior de la pared celular (región periplásmica). Este arreglo espacial de CDA es donde se encontró la presencia de actividad de quitina sintetasa y biosíntesis de quitina en la fracción de membrana plasmática del hongo. Un papel biológico similar a sido reportado para dos CDAs (CDA 1y y CDA 2p) para *S. Cerevisiae*. Esto fue llevado a cabo por enzimas requeridas para las correctas condiciones para su formación. <sup>(5)</sup>

*Colletotrichum lindemuthianum* es considerado un hongo patógeno únicamente para la planta de frijol o aguacate, la producción de su enzima es extracelular y actúa sobre oligómeros de quitina.

Cuadro 3: Características de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de diferentes orígenes.

<b>ORIGEN</b>	<i>Mucor rouxii</i>	<i>Absidia coerulea</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Colletotrichum Lindemuthianum</i> (ATCC 56676)	<i>Colletotrichum Lindemuthianum</i> (DSM 63144)
<b>Localización</b>	Periplasma	Periplasma	Medio de cultivo	Medio de cultivo	Medio de cultivo
<b>Peso molecular (kDa)</b>	75	75	27	24	150
<b>Punto isoélectrico</b>	3	NA	2.75	NA	03-may
<b>pH óptimo</b>	4.5	5	7	11.5	8.5
<b>°T óptima (°C)</b>	50	50	50	50	50
<b>Inhibición de acetato</b>	Si	Si	No	No	No
<b>Min. DP</b>	3	3	2	2	2

**Abreviaciones:** Min. DP, mínima degradación de polimerización en oligómeros de quitina que requieren catálisis, NA, no útil.

En este cuadro se muestran las características de la enzima quitina desacetilasa (CDA, EC. 3.5.1.41) obtenida de distintas especies de hongos, mostrando las principales ventajas y desventajas de cada enzima. Para empezar con el análisis de esta información se nota que dos hongos de la

especie *Colletotrichum* y un *Aspergillus* son capaces de producir esta enzima extracelularmente, por lo que es mas sencilla su posterior separación; por otra parte también es importante contemplar si se inactivan en presencia de acetato, debido a que si esto sucede serian de baja utilidad debido a que este componente es el que define la transformación de quitina a quitosan, por lo tanto el *Colletotrichum lindemuthianum*, es la mejor opción para la obtención de la quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41), descartando a la enzima producida por el *M. rouxii* por su inactivación en presencia de acetato.<sup>(32)</sup>

Todas las enzimas aquí analizadas son glucoproteínas las cuales poseen diferentes características entre unas y otras y se localizan dentro de la región del periplasma o dentro del medio de cultivo.

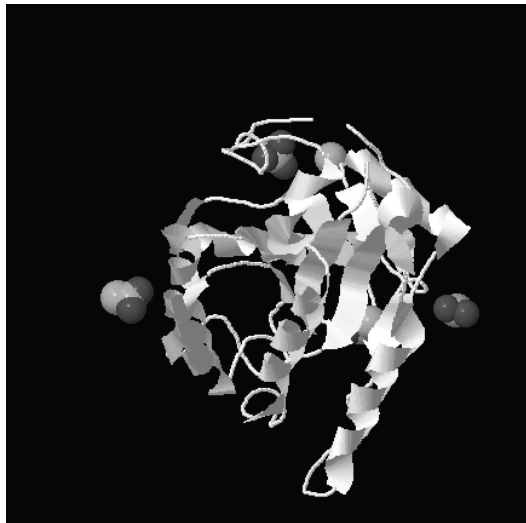
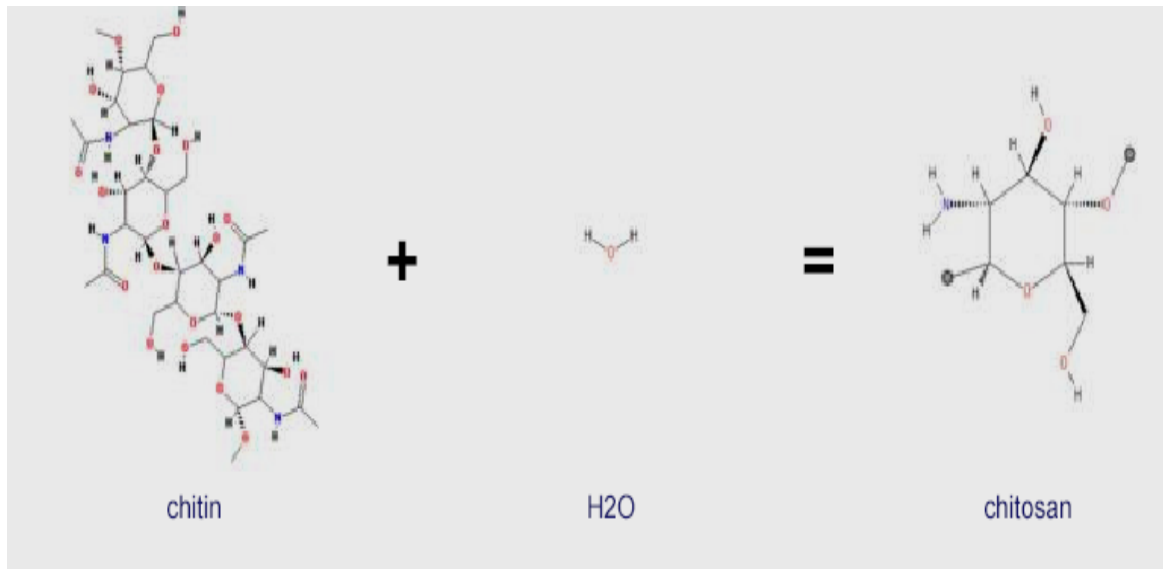


Figura 4.-Estructura de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).<sup>(5)</sup>

El modo en que actúa la quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de *M. Rouxii* en oligosacáridos de quitina ha sido estudiada; la secuencia de oligómeros de quitina siguen la desacetilación enzimática que ha sido identificada como una alternativa en el uso de dos exoglicosidasas específicas en conjunto con altas presiones de líquido cromatográfico (HPLC) y los resultados donde se verifica el futuro uso de H-NMR espectroscópico.<sup>(5)</sup>

Oligosacáridos de quitina han sido usados en el modelo de sustrato en el estudio del modo de acción de CDA d *C. lindemuthianum*. Utilizando HPLC y bombardeando átomos de masa espectroscómicamente (FAB-MS), se ha encontrado un modo similar al de la enzima de *M. Rouxii*, y la de *C. lindemuthianum*.<sup>(1)</sup>



Quitina amidohidrolasa

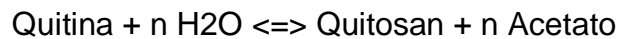


Figura 5.- Reacción catalizada por la enzima quitina desacetilasa.<sup>(30)</sup>

### 1.7 ANTRACNOSIS O MIELILLA (*Colletotrichum lindemuthianum*)

La Antracnósis es una enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, patogénico únicamente para el fruto portador de esta enfermedad, la cual se presenta en duraznos, uvas, fríjol y aguacate, aunque se han encontrado indicios de esta en otras oleaginosas y frutos, los síntomas de esta enfermedad aparecen inicialmente en el envés de las hojas y las lesiones son de un color que varía desde rojo hasta negro, y se localizan a lo largo de las venas y venillas de las hojas.

Estas lesiones también pueden mostrarse en las ramas, tallos y vainas. Generalmente la infección en las vainas aparece en forma de manchas rosadas con borde negro, dando el aspecto como si hubiesen sido quemadas con un cigarrillo y aquí es donde alcanzan a infectarse las semillas en formación. Las vainas son las partes de la planta donde es más notoria esta enfermedad y donde causa los daños más graves, ya que disminuye la calidad del grano. <sup>(22)</sup>

### 1.7.1 Condiciones que favorecen su desarrollo y medios de transmisión.

- Temperatura de 13 °C a 22 °C y humedad relativa mayor al 85 %.
- Etapa de desarrollo del cultivo (1er. Hoja trifoliada).
- Siembra en terrenos con antecedentes de daño por la enfermedad.
- Semilla es la principal fuente de diseminación además de las lluvias y viento.
- Sobrevive de uno año a otro en residuos de cosecha y en plantas fuera de tiempo y en semilla.

### 1.8 GENERALIDADES DE LOS HONGOS

La pared celular de los hongos posee diferentes constituyentes químicos como:

- Polisacáridos
- Proteínas
- Lípidos y otras sustancias.

La constitución varía entre las diferentes especies. También varía con la edad del hongo, ya que sustancias que pueden estar presentes en las hifas jóvenes, desaparecen en las más viejas o depositar otros materiales y enmascarar la presencia de constituyentes iniciales, también la composición del medio, el pH y la temperatura, influyen en la composición de las paredes de los hongos. <sup>(18, 23)</sup>

Cuadro 4. Composición de la pared celular de los hongos.

<b>Tipo de pared celular</b>	<b>Grupo taxonómico</b>	<b>Géneros representativos</b>
Celulosa-glucógeno	Acrasiomicetes	<i>Polysphondylium, Dictyostelium</i>
Celulosa-Glucana	Oomicetes <sup>a</sup>	<i>Phytophthora, Pythium, Saprolegnia</i>
Celulosa-quitina	Hifoquitridiomicetes	<i>Rhizidiomyces</i>
Quitina-Quitosa	Zygomycetes	<i>Mucor, Phycomyces, Migorhynchus</i>
Quitina -Glucana	Quitridiomicetes, Ascomycetes, Deuteromicetes y Basidiomicetes	<i>Allomyces, Blastocladiella Neurospora, Ajellomyces Aspergillus Schizophyllum, Fomes, Polyporus</i>
Manana -Glucana	Ascomycetes	<i>Saccharomyces<sup>b</sup>, Candida</i>
Quitina-Glucana	Basidiomicetes	<i>Sporobolomyces, Rhodotorula</i>
Galactosamina-Polímeros de galactosa	tricomycetes	<i>Amoebidium</i>

### 1.8.1 GENERALIDADES DE LOS PRINCIPALES HONGOS QUE PRODUCEN LA ENZIMA QUITINA DESACETILASA (CDA, EC. 3.5.1.41)

***Mucor rouxii* y *Colletotrichum lindemuthianum*.**

Pertenece a la Familia *Mucoraceae*, el género *Mucor* se caracteriza por no formar estolones ni rizoides, por estos motivos, sus especies invaden lentamente los medios de cultivo. <sup>(16)</sup>

Hidroliza el almidón y posteriormente fermenta los azúcares formados en la hidrólisis anterior produciendo etanol en forma lenta, por lo cual es conveniente sembrar una levadura a las 24 horas de desarrollo de *Mucor* para facilitar la fermentación alcohólica. Esto es en síntesis lo que se conoce con el nombre de proceso amilo. La forma típica se emplea para la fabricación de amilasas. <sup>(16)</sup>

La actividad de la enzima de *M. rouxii* ha sido fuertemente inhibida en presencia de acetato (57% inhibida por 20 mM acetato), industrialmente es una limitante esta inhibición. Por esta razón Gauss y Bauch han purificado parcialmente la quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de *Colletotrichum Lindemuthianum*. <sup>(29)</sup>

Esta enzima difiere de la de *M. rouxii* en algunos aspectos pero el más significativo es que la enzima de *C. lindemuthianum* tiene mayor actividad en presencia de acetato (96% de actividad que permanece en presencia de 100mM de acetato de sodio). <sup>(29)</sup>

La quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de *Colletotrichum lindemuthianum* puede desacetilar residuos de amino azúcares libres dentro de formas N-acetiladas en presencia de 3.0 M acetato de sodio. El resultado ha sido analizado utilizando a  $\beta$ -n-acetyl-hexosaminidasa uniendo el sistema con p-nitrofenil 2-amino-deoxi- $\beta$ -d-glucopyranosyl- (14)-2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -d-glucopiranosido es el sustrato y la liberación de p-nitrofenol ha sido observada a consecuencia de N-acetilación enzimática de glucosalina residual que no reduce el final del sustrato.

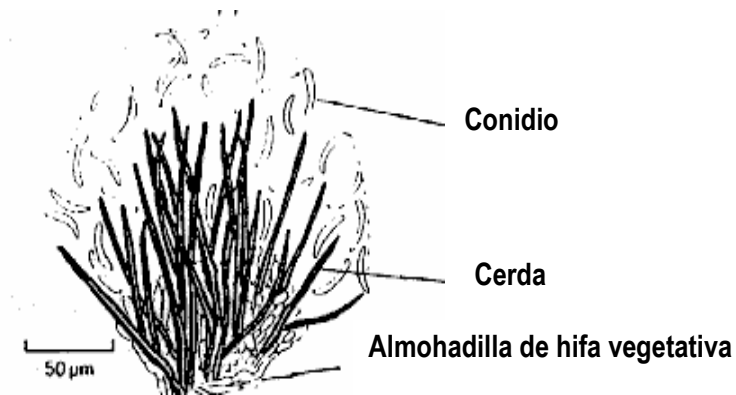


Figura 6. Constitución general del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*.<sup>(31)</sup>

Las estructuras que aquí se muestran son específicas de la especie *Deuteromicete*, y mas específicamente del *Colletotrichum lindemuthianum*

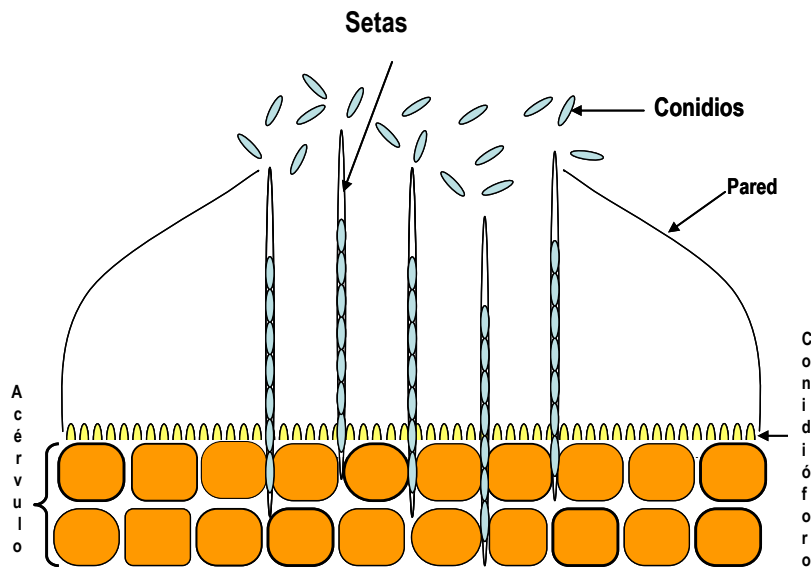


Figura 7. Vista microscópica de un frijol con Antracnosis provocada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*.

Las estructuras que se muestran en la figura 8 son específicas de la especie *Deuteromicete*, y mas específicamente del *Colletotrichum lindemuthianum*



En la siguiente figura se muestra con claridad como se vería un frijol con antracnosis seccionado lateralmente, en microscopio, mostrando las estructuras características que forma el hongo *C. lindemuthianum*, y la manifestación de la enfermedad propiciada por el mismo: Antracnosis.

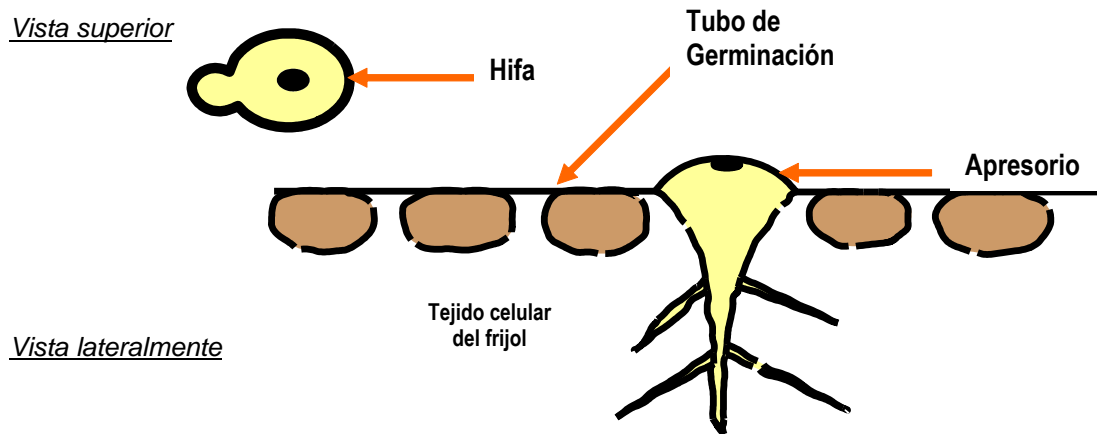


Figura 8. Forma de una hifa vista microscópicamente parte superior y lateral, apresorio y tubo de germinación en conjunto.

### 1.8.2 CONIDIOS PRESENTADOS EN EL *Colletotrichum lindemuthianum*.

Como se muestra en esta fotografía los conidios son estructuras en forma ovalada para el *Colletotrichum lindemuthianum*, con las cuales se identificó este hongo, un conidio es una espóra asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena. Aparecen en Ascomycotina, Deuteromycotina y algunos Basidiomycotina; cabe mencionar que el *Colletotrichum* pertenece al género Deuteromycotina, y por lo tanto presenta esta estructura.

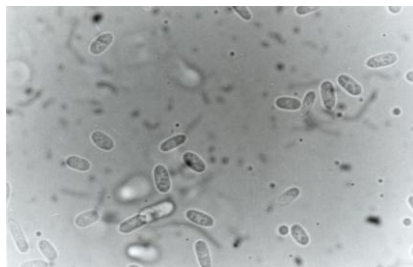


Figura 9. Conidios que presenta el *Colletotrichum lindemuthianum*, vistos microscópicamente.

Fuente: [http://www.inta.gov.ar/imyza/info/gal/colletotrichum\\_conidios.htm](http://www.inta.gov.ar/imyza/info/gal/colletotrichum_conidios.htm)

### 1.8.3 MICELIO

El tipo unicelular es típico de las levaduras. Pero algunos hongos, especialmente algunos patógenos de animales, pueden existir tanto como filamentosos o como unicelulares.

Estos filamentos vegetativos de los hongos son denominados hifas y el conjunto de hifas se llama micelio. El micelio está constituido por una masa de hifas y que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Dependiendo de su crecimiento se clasifican en reproductores (aéreos) o vegetativos. Los micelios reproductores crecen hacia la superficie externa del medio y son los encargados de formar los órganos reproductores (endosporios) para la formación de nuevos micelios. Los micelios vegetativos se encargan de la absorción de nutrientes, crecen hacia abajo, para cumplir su función.

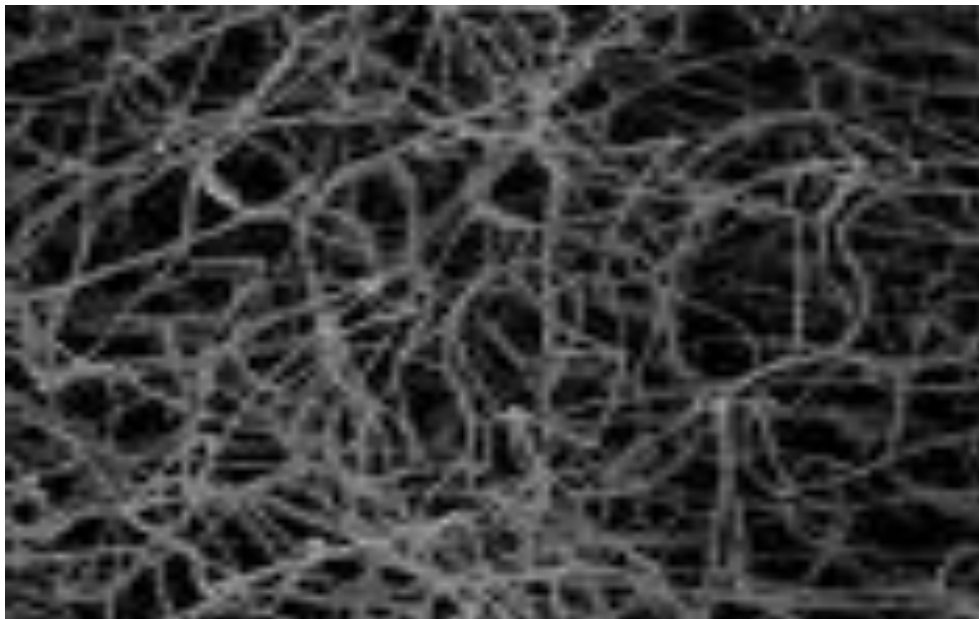


Figura 10. Forma general de un Micelio.

Fuente: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/fungi/fungi.htm>

### 1.8.4 APRESORIOS

Los apresorios son de las estructuras más importantes para la identificación del *Colletotrichum lindemuthianum*, porque son órganos de fijación, hifas unicelulares laterales cortas y especializadas que se caracterizan porque parten de los tubos germinativos o hifas más largas, se adhieren a la cutícula del hospedante, tras la formación de apresorios sigue la perforación de la cutícula e infección mediante una hifa infectante que puede formar un haustorio.



Figura 11. Vista microscópica de un apresorio de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Fuente: <http://www.inta.gov.ar/imyza/info/gal/colletotrichum>

### 1.8.5 HAUSTORIOS

Son estructuras que los hongos biótrofos introducen en las células de sus hospedantes para alimentarse, las cuales realizan esta actividad sin romper la membrana plasmática.

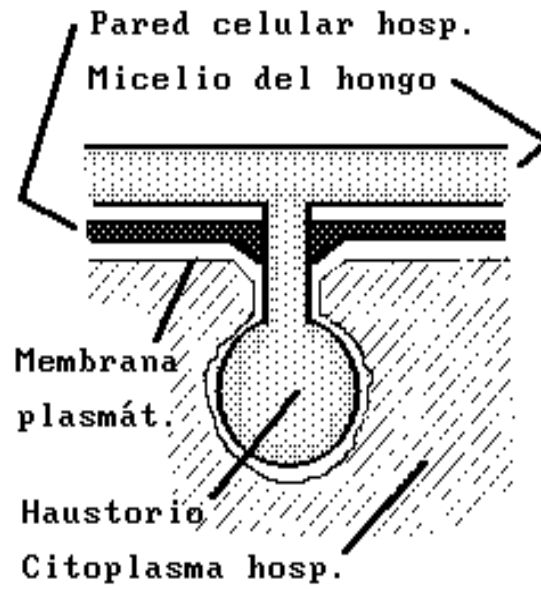


Figura 12. Vista microscópica de un haustorio *Colletotrichum lindemuthianum*.

Fuente: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/fungi/fungi.htm>

**CAPITULO II:**

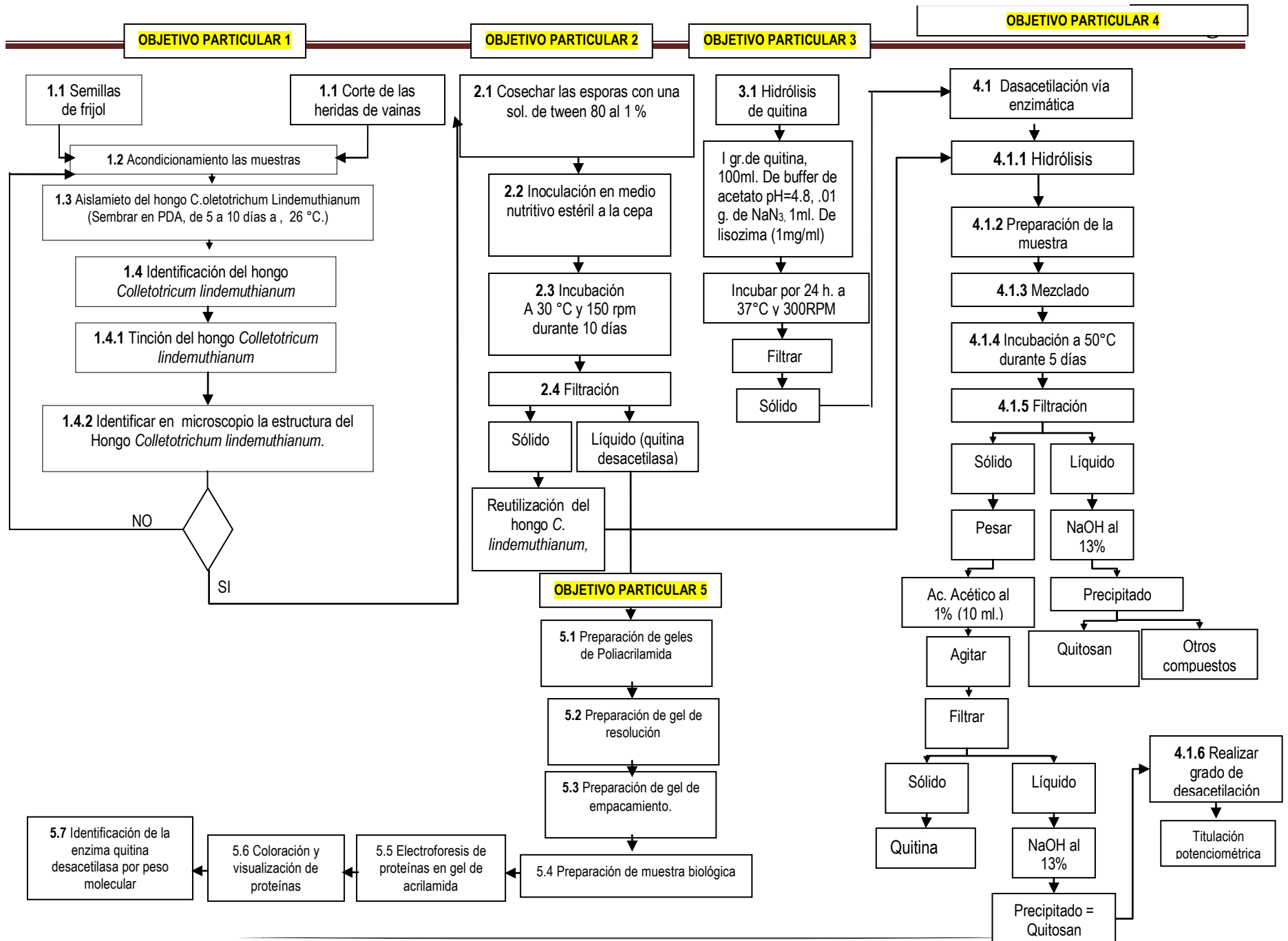
**METODOLOGÍA**

**EXPERIMENTAL**

### **Cuadro Metodológico**

El cuadro Metodológico se encuentra dividido en cinco secciones de acuerdo a las actividades planeadas para la realización de los cinco objetivos particulares de este proyecto.

## Diagrama 2: Cuadro Metodológico



### **OBJETIVO PARTICULAR 1**

Aislar e identificar el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de diferentes fuentes vegetales (de distintos tipos de frijoles, vainas de frijoles y fragmentos de cáscara aguacate con sospechas de antracnósis como fuente de obtención de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).

### **METODOLOGIA PARA LLEVAR A CABO EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL HONGO *Colletotrichum lindemuthianum*.**

A continuación se presenta la metodología para llevar a cabo el aislamiento e identificación del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* y las condiciones bajo las que se llevó a cabo esta etapa experimental.

#### **Actividad 1.1.**

#### **ORIGEN DE LAS CEPAS DE *Colletotrichum lindemuthianum* AISLADAS EXPERIMENTALMENTE.**

Se sembraron en Agar papa dextrosa (PDA) y Agar papa zanahoria (PZA), fracciones de cáscara de aguacate con indicios de Antracnósis, semillas dañadas recabadas del mercado del Carmen ubicado en Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, y semillas de un cultivo que se encuentra en Villa del Carbón, en donde los dueños suponían que esa cosecha no se había logrado debido a problemas con hongos, las cuales se incubaron a 26 °C, de 5 a 10 días.

Por otra parte se experimentó con una cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 que donó el Dr. Raúl Rodríguez Guerra del INIFAP Campo Experimental Bajío.



### **Actividad 1.2.**

#### **ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA SU AISLAMIENTO.**

Es importante que las semillas con indicios de Antracnósis se desinfecten de bacterias durante un minuto en una solución de cloro al 6 %. En el caso de las vainas, se cortan con un bisturí estéril las partes donde se notan las heridas causadas por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, mismas que se desinfectan con cloro al 6%.

### **Actividad 1.3.**

#### **SIEMBRA DEL MATERIAL SOSPECHOSO DE ANTRACNOSIS EN UN MEDIO DE CULTIVO DE AGAR DE PAPA DEXTROSA (PDA) Y AGAR DE PAPA ZANAHORIA (PZA)**

Una vez llevada a cabo la desinfección superficial, se secan las semillas de frijol y trozos de vaina con papel estéril bajo una campana de flujo laminar, donde se procede a sembrar los trozos infectados de la vaina, las semillas y la cáscara de aguacate en PDA y PZA, con el fin de que el hongo se desarrolle y crezca, esto se realiza en condiciones asépticas entre dos mecheros y con pinzas estériles.

#### **GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE FRIJOL POR MEDIO DE SIEMBRA EN PAPEL ANCHOR.**

Para lograr el desarrollo de una planta bajo condiciones controladas de las semillas con indicios de Antracnósis, éstas se siembran en papel tipo Anchor, a 3 cm. de distancia entre semilla y semilla. En las orillas del papel se hacen dos dobleces y se envuelve en forma de rollo, este rollo se riega continuamente con agua destilada durante 10 días a una temperatura de 25 °C. Durante este tiempo, la planta germina y conforme pasan los días, a la planta se le manifestarán daños causados por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*. Las lesiones pueden ser aisladas para obtener al hongo de acuerdo a lo descrito anteriormente.

### **Actividad 1.4.**

#### **IDENTIFICACIÓN DEL HONGO *Colletotrichum lindemuthianum***

El hongo *Colletotrichum lindemuthianum* desarrollados en medios ordinarios (PDA y PZA) son pardo doradas, y cuentan con estructuras específicas tales como sus conidios y apresorios, con las cuales por medio de la forma que estos adoptan se puede distinguir e identificar en microscopio.

Primero se toma una muestra del cultivo y se coloca en un portaobjetos el cual ya contiene una gota de fucsina ethel para teñir al hongo y posteriormente se coloca encima un cubreobjetos.

Se observa la preparación al microscopio y se fotografían las estructuras.

### **OBJETIVO PARTICULAR 2**

Extraer y semipurificar la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) a partir del cultivo del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en medio líquido, para separarla y concentrarla mediante una filtración con Amberlita.

### **Actividad 2.1.**

#### **COSECHA DE ESPORAS.**

Una vez identificada la cepa de *Colletotrichum lindemuthianum*, el hongo se separó del agar de PDA y PZA con una solución de tween 80 en concentraciones de 0.01 y 5% con la ayuda de una espátula y se vertió directamente en un matraz conteniendo medio de cultivo enriquecido para el crecimiento del hongo y producción de la enzima. Posteriormente se incubó en un matr az a 30°C y 150 rpm. por 5 días en una incubadora rotatoria marca New Brunswick.

**Actividad 2.2.**

**INOCULACIÓN EN MEDIO NUTRITIVO ESTÉRIL DE LA CEPA**

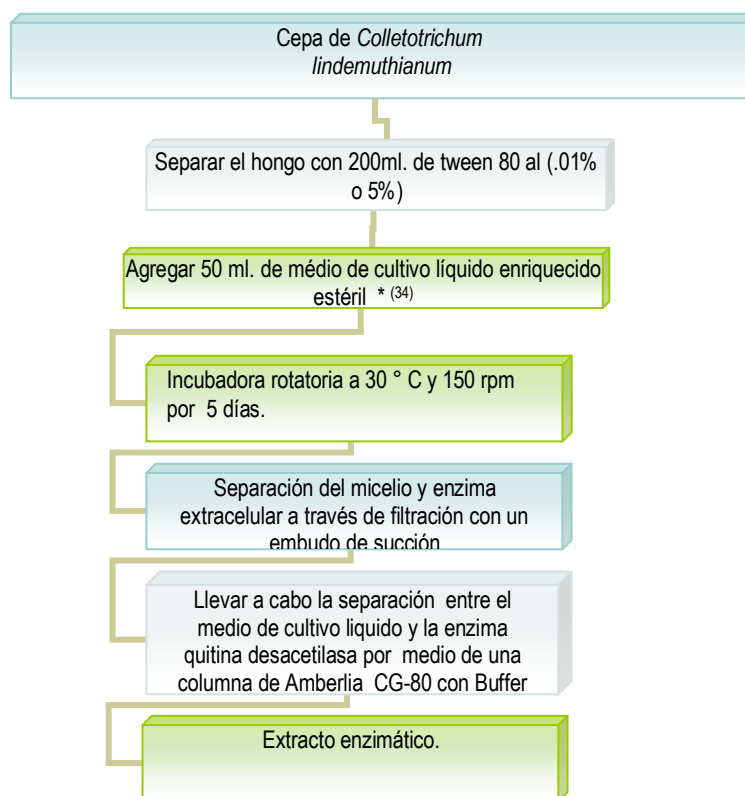
Transcurridos los 5 días de incubación, se llevó a cabo la separación del micelio del hongo del medio de cultivo y la enzima que se produjo extracelularmente.

Esta separación se hizo por medio de filtración con un embudo de succión.

Posteriormente el filtrado se sometió a una segunda filtración en una columna de Amberlita CG-80 preparada con Buffer de fosfato 20mM a pH 7 (34).

Finalmente se obtuvo un extracto enzimático el cual se utilizó para llevar a cabo electroforesis para proteínas

Diagrama 3. Obtención de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).



\*NOTA: El medio de cultivo enriquecido estéril consta de los siguientes elementos (Win N. N, 2001): 1.5 % de glucosa, 66% de ácido glutámico, 0.1% de  $K_2HPO_4$ , 0.05% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.18%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.03%  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.04%  $Cu SO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.1% de tiamina, 0.1% de ácido

nicotínico; en agua destilada; en el apéndice A se presentan las proporciones de estas sustancias en el medio de cultivo <sup>(34)</sup> .

### **OBJETIVO PARTICULAR 3**

Establecer las condiciones experimentales de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) para la desacetilación de quitina.

Para llevar acabo el cumplimiento de este objetivo fue necesario establecer algunas condiciones para trabajar con la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41), así como el estudio y análisis de las diversas metodologías de desacetilación.

### **DESACETILACIÓN VÍA ENZIMÁTICA**

En contraste con la metodología experimental que comúnmente propone Win N.N 2001, Jun Cai 2006 y Tokuyasu Ken 1999, en esta etapa experimental se realizó el proceso de desacetilación enzimática partiendo de una quitina obtenida de desperdicios de camarón mediante una técnica patentada sin desacetilar <sup>(19)</sup> y bajo una metodología similar a la bibliográfica, pero con el uso de las enzimas lisozima debido a que esta hidroliza a la quitina <sup>(7)</sup> y quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de *Colletotrichum lindemuthianum*.

#### **Actividad 3.1.**

##### **HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON LISOZIMA.**

Se trabajó experimentalmente con 1gr. De quitina de camarón al cual se le agregó 100 ml. de buffer de acetato con un pH=4.8, además de 0.01 g. de NaN<sub>3</sub>, 1ml. de lisozima (1mg/ml) para llevar a cabo la hidrólisis enzimática incubando durante 24 hrs. a 37°C y 50 RPM. Pasado este lapso de tiempo se llevó a cabo una filtración, donde los sólidos se utilizaron para la siguiente etapa que fue la desacetilación.

### Actividad 3.2.

#### DESACETILACIÓN ENZIMÁTICA

A la quitina hidrolizada enzimáticamente se le agregó el extracto enzimático obtenido previamente (**mediante la actividad 2.4**), se realizó un mezclado durante 5 min. a 50 RPM y se incubó a 50°C en un lapso de 5 días. Después de este proceso se llevó a cabo una filtración. A la fase líquida se le agregó hidróxido de sodio hasta llegar a un pH de 6.5 con la finalidad de precipitar el quitosán.

La fase sólida se le disolvió en una solución de ácido acético al 1% con agitación vigorosa durante 30 minutos, lo cual se realizó con un agitador magnético. Posteriormente se filtró y a la fase líquida se le agregó hidróxido de sodio hasta llegar a un pH de 6.5 con la finalidad de precipitar el quitosán, el sólido era quitina que no se desacetiló.

#### OBJETIVO PARTICULAR 4

Evaluar el grado de desacetilación de la quitina, por medio de titulación potenciométrica e infrarrojo usando la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* para concluir sobre el grado de desacetilación que se produce por vía enzimática.

#### DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN

Debido a que muchas de las propiedades físico-químicas del quitosán, así como sus aplicaciones están estrechamente relacionadas al grado de desacetilación, es fundamental determinar este parámetro de forma precisa.

Existen varios métodos para determinar el contenido de N-acetilo. Algunos de ellos son:

- Por espectroscopia UV
- Espectroscopia IR
- Espectroscopia de masa

- Titulación potenciométrica.

De los métodos antes presentados uno de los más sencillos y funcionales de obtener el grado de desacetilación es por medio de una titulación potenciométrica, por lo que se propone la realización de esta prueba por medio de este método.

### FUNDAMENTO DE LA TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA

En la determinación lo que ocurre es la titulación ácido-base de los grupos  $-N^+H_3$  de el quitosán disuelto en un exceso conocido de ácido (medición de pH), utilizando como ácido el HCl de concentración 0.2 N y como base NaOH 0.1 N y a través de un potenciómetro determinar el cambio de pH que ocurre en la muestra. Se puede obtener un gráfico potenciométrico, del cual, se sacan los datos necesarios para determinar el grado de desacetilación y por medio de expresiones matemáticas, se puede llegar a obtener resultados confiables.<sup>(1, 10 y 20)</sup>

#### Actividad 4.1.

#### PROCEDIMIENTO PARA LLEVAR A CABO LA DESACETILACIÓN ENZIMÁTICA.

Se pesa aproximadamente 0.3 g de quitosán secado a 105°C, se ponen en un vaso de precipitado y se agrega 45 ml de HCl 0.2N dejando en agitación magnética hasta disolución del quitosán.

Se calibra el potenciómetro y en la bureta se pone la solución de NaOH 0.1N para valorar potenciométricamente la solución de quitosán.

Se agregan volúmenes pequeños de la solución de NaOH 0.1N (1mL) anotando los valores de pH de cada volumen agregado, se titula hasta pH 11 y los datos se grafican (pH vs V) para encontrar los puntos de equivalencia y

posteriormente se realizan los cálculos para determinar el grado de desacetilación <sup>(1, 10 y 20)</sup>.

Para llevar a cabo la prueba de grado de desacetilación es necesario el uso de un potenciómetro WIW pH 531 con electrodo de vidrio combinado, según Patricia Miranda <sup>(19)</sup>. El porcentaje de desacetilación se determina por titulación potenciométrica. Normalmente los estudios de caracterización del quitosan se centran en la determinación de su grado de desacetilación. <sup>(19)</sup>

En la figura 13 se muestra el tipo de grafico que resulta de la relación pH vs. Volumen de hidróxido de sodio 0.1 N gastado.

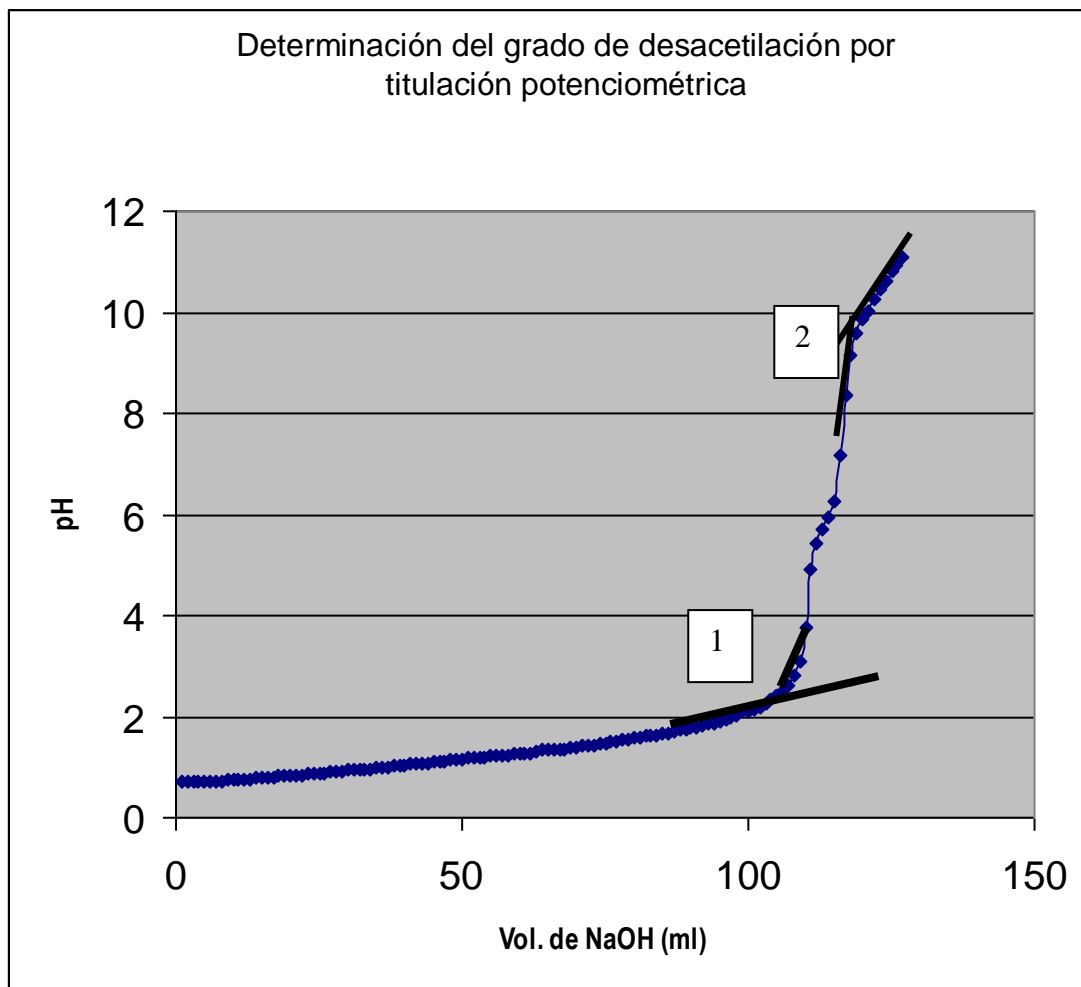


Figura 13. Ejemplificación del gráfico que se obtiene por medio de la relación pH vs. Volumen de Hidróxido de Sodio 0.1 N para la obtención del grado de desacetilación por titulación potenciométrica.

En esta figura se muestra de donde se obtienen los puntos de inflexión (1 y 2), estos puntos se obtienen justo en el valor crítico anterior a los cambios notorios de pH; es importante mencionar que los valores tomados como puntos de inflexión corresponden al volumen de Hidróxido de Sodio 0.1N en mililitros.

En ocasiones es necesario prolongar las líneas para obtener los puntos de inflexión de la forma más precisa posible; después de obtener los puntos de inflexión es necesario el uso de ecuaciones para poder determinar el porcentaje de grado de desacetilación. (1, 10 y 20)

Las expresiones matemáticas utilizadas para determinar el porcentaje de grado de desacetilación se presentan a continuación:

$$V(L) = \frac{V_2(mL) - V_1(mL)}{1000}$$

En donde:

$V_1$ : Volumen de base utilizado para titular el HCl en la muestra.

$V_2$ : Volumen de base utilizado para titular el  $\text{NH}_3^+$  en la muestra.

V (L): Volumen final en litros.

$$Meq = \frac{m(g)}{C(N) * V(L)}$$

En donde:

M: Gramos de quitina pesados (peso total-peso del vidrio de reloj).

C: Concentración de la base utilizada

V: Volumen final en litros.

Meq: Masa de quitina en equivalentes.

$$\% \text{desac} = \frac{203}{Meq + 42} \times 100$$

En donde:



% desac: Porcentaje o grado de desacetilación.

Meq: Masa de quitina en equivalentes.

Se comparó el porcentaje de desacetilación que resultó con el uso de cada una de las muestras de quitinas desacetiladas obtenidas contra el método químico para concluir sobre la funcionalidad de la desacetilación enzimática.

### **OBJETIVO PARTICULAR 5**

Determinar el peso molecular de la enzima quitina desacetilasa obtenida, mediante electroforesis para proteínas con la finalidad de confirmar en base a la expresión de bandas en el gel de poliacrilamida que se trabajó con la enzima quitina-desacetilasa.

#### **Actividad 5.1.**

#### **PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA**

La electroforesis de proteínas aquí descrito es discontinuo porque está conformado por dos geles de poliacrilamida de resolución y empacamiento que presentan diferente concentración, composición y pH. Ambos geles se encuentran unidos pero limitados por una fase de separación visible al trasluz. Debido a que en estado líquido ambos geles pueden mezclarse fácilmente, deben ser preparados por separado esperando la total polimerización del primero para continuar con la polimerización del otro. El gel de empacamiento generalmente se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras. El gel de resolución por su parte forma el cuerpo del gel por donde migrarán y se separarán las proteínas. <sup>(35)</sup>

#### **Actividad 5.2.**

#### **PREPARACIÓN DEL GEL DE RESOLUCIÓN**

#### **Fundamento teórico**

El gel de resolución es la matriz de poliacrilamida donde las moléculas de proteínas, van a migrar generando un perfil de bandas o patrón electroforético.

Dicho patrón varía de acuerdo al peso molecular de cada una de las moléculas y a la concentración del gel mismo.

### **Procedimiento**

Para llevar a cabo la preparación y manejo de las soluciones para electroforesis de proteínas, se usaron guantes durante la manipulación de las soluciones, posteriormente se marcó el límite hasta donde la matriz de acrilamida será vertida, trazando una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea, se colocó el peine entre ambos vidrios y se midió entre uno y cinco centímetros (dependiendo del tamaño de la cámara) por debajo de los dientes del peine.

Se realizó la preparación del gel de resolución a una concentración de 6, 10 y 15% debido a que el peso molecular teórico de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) puede ser de 150 KDa y 24 KDa, según sea su subclasificación.

(35)

### **Actividad 5.3.**

#### **PREPARACIÓN DEL GEL DE EMPACAMIENTO**

##### **Fundamento teórico**

El gel de empacamiento es la matriz de poliacrilamida que tiene como característica retener a las proteínas manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel de resolución. Este proceso permite mejorar la resolución de las proteínas en la electroforesis.

##### **Procedimiento**

Para llevar a cabo la preparación del gel de empacamiento se mezclaron todas las sustancias indicadas en el ANEXO B.

Una vez finalizada la preparación de la solución, se agitó moderadamente sin hacer burbujas a fin de asegurar que la Tetrametiletilendiamina [TEMED ( $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )] y la Adenosin 5' fosfosulfato (APS) se distribuyeran

uniformemente en todo el volumen de la solución. Agregar la poliacrilamida entre los vidrios de la cámara y sobre el gel de resolución ya polimerizado. Inmediatamente después, se colocó el peine entre ambos vidrios secando con papel toalla los restos de poliacrilamida que llegaron a derramarse. Se dejó polimerizar la poliacrilamida a temperatura ambiente por 15 a 30 minutos usando como control de la polimerización la solución de poliacrilamida que quedó remanente en el tubo. Una vez formado el gel, se retiró el peine cuidadosamente. <sup>(35)</sup>

### **Actividad 5.4.**

#### **PREPARACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA**

##### **Principio del procedimiento**

La preparación de la proteína consiste en un proceso químico, en el cual se desnaturaliza sin afectar la estructura primaria (no se rompen enlaces peptídicos, se rompen los puentes disulfuro), mediante la acción de detergentes iónicos, reactivos reductores y altas temperaturas, los que en conjunto consiguen desnaturalizar la proteína hasta su estructura primaria.

##### **Procedimiento**

Se mezcló el extracto de la enzima quitina desacetilada obtenida experimentalmente con el buffer de la muestra en proporción 3:1 (tres partes de la muestra y una de buffer), después se sometió la muestra a una temperatura de 100° C durante 5 minutos. Finalizado el procedimiento, se retiraron los tubos del vaso de precipitación y fueron centrifugarlos por diez segundos a 12 000 rpm. <sup>(35)</sup>

### Actividad 5.5.

#### ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE ACRILAMIDA

##### Principio del procedimiento

En el proceso de la electroforesis se realiza la separación de las proteínas a analizar, de acuerdo a su peso molecular. Dicha distribución dependerá de la concentración del gel de resolución con el que se esté trabajando.

##### Procedimiento

Se sumergió el sistema con los geles polimerizados en un tanque conteniendo buffer de electroforesis o de resolución para proteínas 1X. Mediante el uso de puntas de hasta 20  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de capacidad proceder a depositar cuidadosamente la muestra de quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) con el buffer de la muestra en los pocillos evitando la contaminación del pocillo contiguo, fue de suma importancia considerar el uso de un marcador estándar de proteínas para la medición del peso molecular de la muestra, en este experimento se utilizó el “Cat 161-0318-Bio Rad”, dicho marcador fue sometido a los mismos tratamientos de la enzima, una vez finalizada la colocación de las proteínas en cada pocito del gel, se cubrió el tanque con la tapa y se conectaron los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder trabajando a 30 miliamperios. Se realizó la electroforesis hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó a los límites de la parte inferior del gel. <sup>(35)</sup>

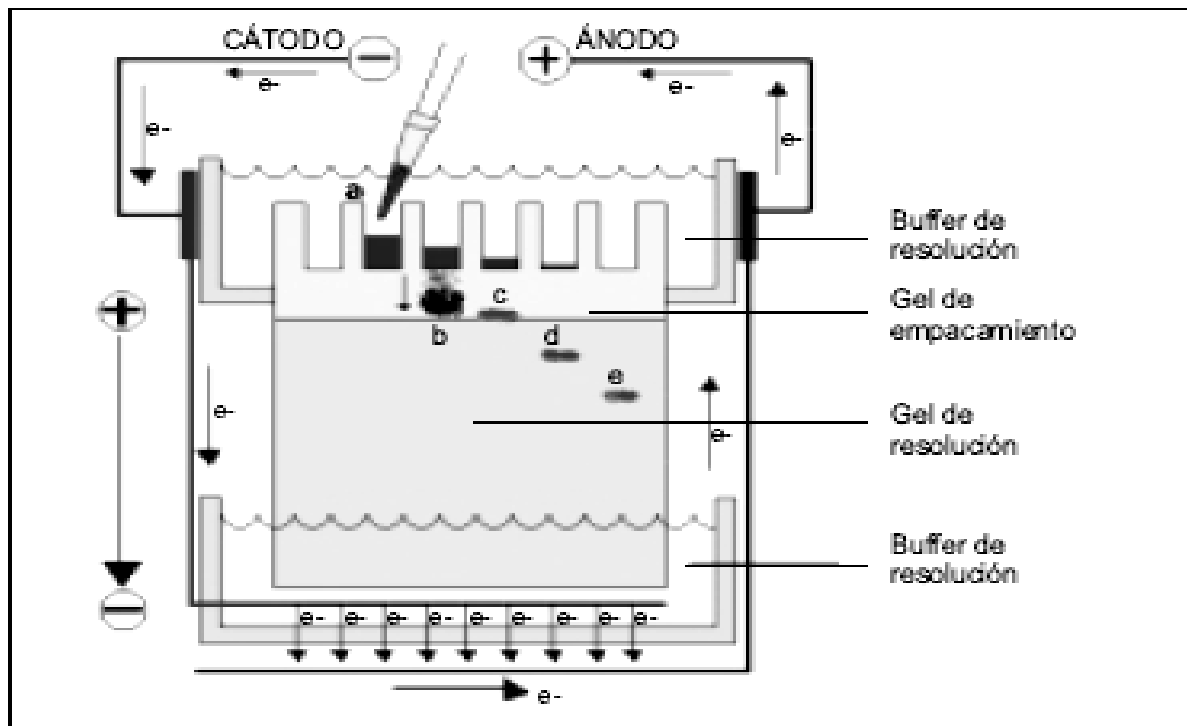


Figura 14. Forma correcta en que se debe encontrar un sistema para electroforesis.

### Actividad 5.6.

## COLORACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS USANDO AZUL BRILLANTE DE COOMASIE

### Principio del procedimiento

El proceso de coloración se basa en la atracción electrostática del enlace peptídico de las proteínas sobre grupos de ácido sulfónico que son los que tiñen la proteína de color azul. Asimismo, las fuerzas de Van Der Waals y las interacciones hidrofóbicas participan en este proceso de unión mecánica. Este paso permite la visualización de proteínas en un rango de sensibilidad entre 0,5  $\mu\text{g}$  y 2  $\mu\text{g}$ .

### Procedimiento

Se sumergió el gel de poliacrilamida en una charola plástica, conteniendo solución de trabajo de azul brillante de coomasie en un volumen que permitió

cubrir completamente el gel. Se dejó incubando con un suave movimiento rotatorio de 20 a 30 minutos.<sup>(35)</sup>

### **Secado manual de geles de poliacrilamida**

Se remojó el gel teñido en el reactivo glicerol-metanol por 2 horas con un movimiento de rotación suave, posteriormente se remojó una lámina de celofán de aproximadamente 15 x 15 cm en agua y se colocó encima de un bastidor cuyo tamaño era un poco mas grande que el del gel. Seguidamente, se colocó el gel sobre el celofán y se observó que no se formaran burbujas, y se cubrió el gel con un segundo celofán previamente remojado en agua y se presionó el sistema tipo "sándwich" con grapas en todos los lados. Se dejó secar por 2 días.

**CAPITULO III:**

**RESULTADOS**

**Y**

**DISCUSIÓN**

**Resultados correspondientes a la actividad 1.1.**

**Aislamiento e identificación del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*.**

En la figura 15 se muestra el tipo de frijoles recolectados para la búsqueda del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* manifestando algunos síntomas físicos de *Antracnosis*.

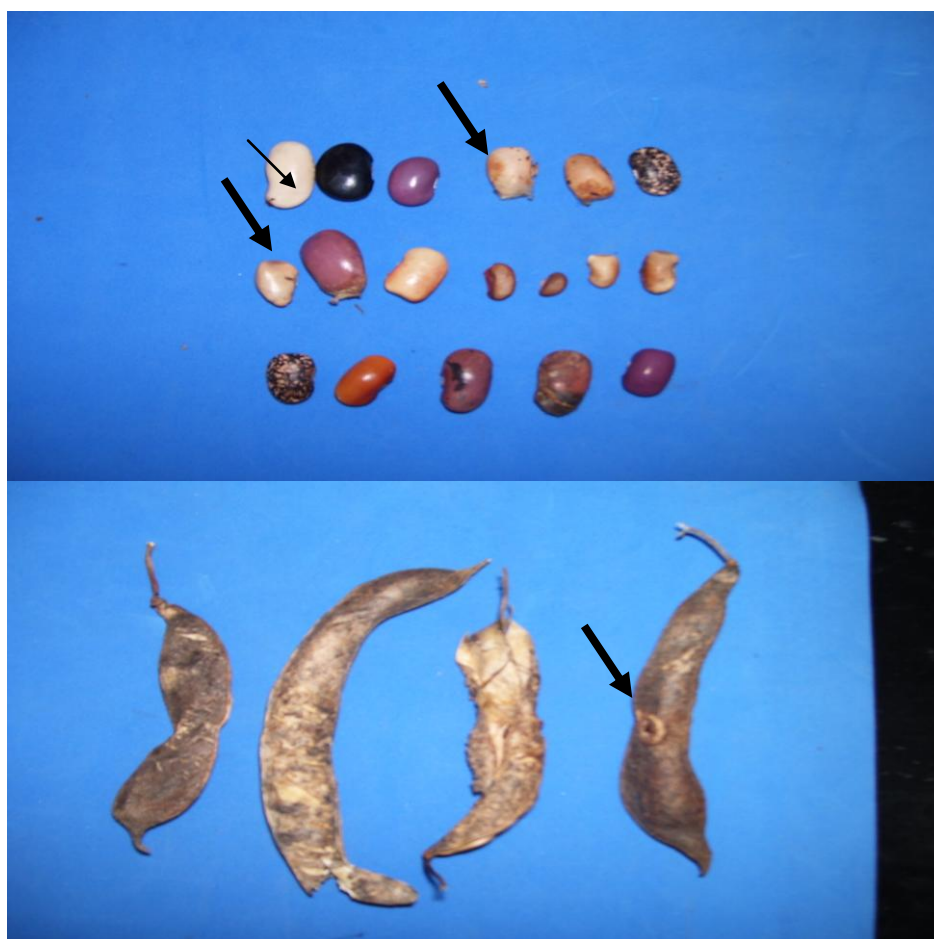


Figura 15. Muestras con las que se trabajó debido a la sospecha de Antracnósis en frijol y vainas (se señalan con flecha los principios de antracnósis).



Muchas de estas muestras se desecharon por la alta contaminación de *Rizophus*, de las muestras escogidas se realizaron las preparaciones correspondientes con fucsina ethel para llevar a cabo la identificación de hongos, en búsqueda del *Colletotrichum lindemuthianum*.

Después de cinco días de cultivo en PDA y PZA a temperatura de 28 °C, se identificaron los siguientes hongos:

- Alternaria
- Rizoctonia
- Fusarium
- Rizophus

Por esta razón se continuó con la búsqueda del hongo *C. lindemuthianum*, a lo largo de tres meses se utilizaron frijoles de distintos tipos, tales como bayos, negros, flor de mayo, flor de junio, star light, peruano, sus respectivas vainas; para el aislamiento e identificación del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en aguacate, se separó un fragmento de un aguacate que a simple vista se nota flácido, y con hendiduras café pardo, el cual fue sembrado directamente en Agar de Papa Dextrosa (PDA).

Finalmente se logró identificar el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en tres cepas: la denominada **1.b.**, este hongo fue aislado de la raíz dañada de una planta de frijol, la cepa denominada **1.d** fue aislada del tallo de una planta de frijol dañada con antracnosis, y la cepa **PM3** tiene como origen aguacate dañado por antracnosis. Por otro lado el INIFAP donó dos cepas de *C. lindemuthianum* raza 467, por lo que a continuación se presentan los resultados obtenidos para esta etapa experimental.

### **Resultados correspondientes a la actividad 1.3.**

#### **Aislamiento del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*.**

La mejor forma de aislamiento del hongo fue por medio de la germinación de las semillas de frijol a través de la siembra en papel Anchor, el inconveniente es que esta forma necesitó más tiempo, control de temperatura para el desarrollo de la planta.

Una vez desarrollada la planta, la enfermedad Antracnosis provocada por el *Colletotrichum lindemuthianum*, se manifestó por medio de unas llagas en forma ovalada en tonos cafés. Cuando las muestras de frijol y trozos de vaina fueron sembradas en PDA y PZA tardaron de 10 a 14 días en desarrollarse a una temperatura de 26°C.

El hongo *Colletotrichum lindemuthianum* creció mejor en medio de PDA que el PZA, bibliográficamente se señala que el medio PZA permite visualizar mejor los apresorios, pero experimentalmente esto no resultó así.



Figura 16. Enfermedad provocada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en vainas de frijol.



Figura 17. Enfermedad provocada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol.

Como se nota en las fotografías la enfermedad llamada Antracnosis se notan manchas que aparentan una quemadura que propician coloraciones que van de negro a café en el frijol y la vaina. El *Colletotrichum lindemuthianum* además de propiciar esta enfermedad puede expandirla y causar la pérdida de un cultivo por completo; cabe mencionar que este hongo es de campo y no es característico en el almacenamiento del frijol cosechado.

(A) PDA

(B) PZA

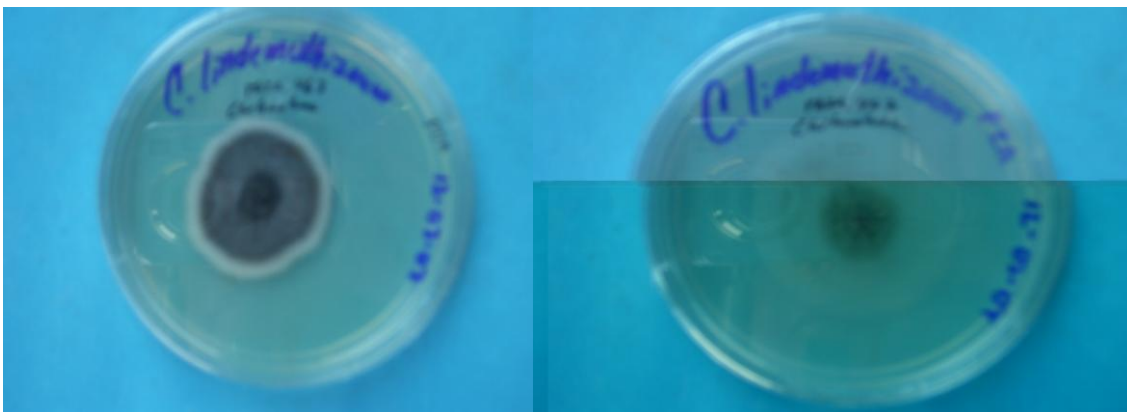


Figura 18. *Colletotrichum lindemuthianum* en un medio de agar de papa dextrosa (PDA), y agar de papa- zanahoria (PZA).

En la figura 18 se observa la diferencia del crecimiento del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*. En la imagen de la izquierda (A) se observa el desarrollo y crecimiento del *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 en un periodo de diez días a una temperatura de 27°C, en medio de Agar de Papa Dextrosa (PDA), en el lado derecho (B) se observa el crecimiento y desarrollo del mismo hongo a las mismas condiciones de tiempo y temperatura pero en medio de Agar de Papa Zanahoria (PZA).

Es de suma importancia señalar que el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* fue de lento crecimiento debido a que éste varió entre 5 y 10 días una vez sembrados en PDA, y generalmente este hongo se encontró mezclado en la misma caja de agar con otros hongos, e incluso bacterias, los cuales eran de rápido crecimiento y esto propició la dificultad de su aislamiento.

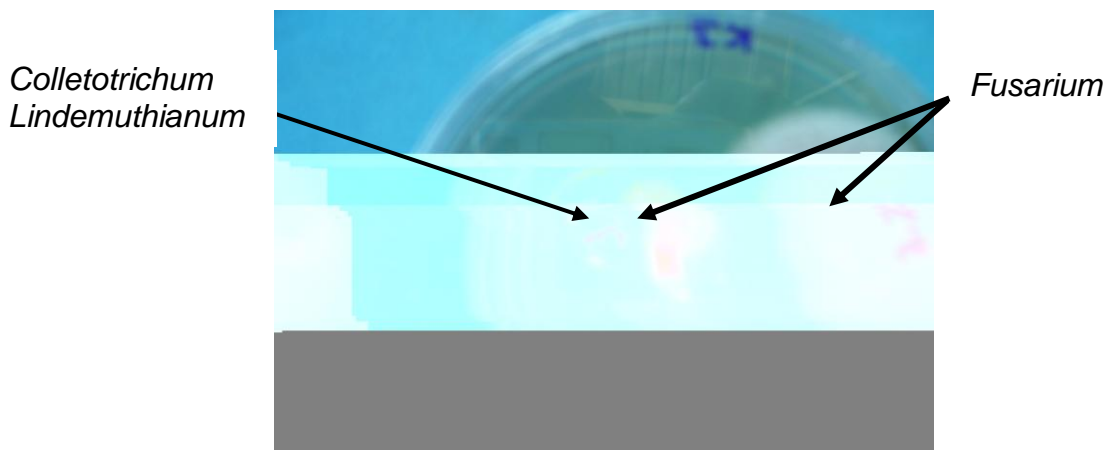


Figura 19. Competencia del crecimiento entre los hongos *Colletotrichum lindemuthianum* y *Fusarium* en agar de PDA.

Como se observa en la figura 22, el hongo *Fusarium* predominó en el medio de PDA lo cual constituyó una desventaja pues para fines experimentales resulta ser una contaminación difícil de aislar, por lo que el cultivo realmente se pierde.

A continuación se presenta la forma en que se observaron las distintas cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*.



Figura 20. Cepa raza 467.

En la figura 20 se muestra la cepa de la raza 467, y después de cuatro semanas desarrolló un halo naranja en su contorno, a condiciones controladas de temperatura (27°C), en medio de Agar de Papa Dextrosa (PDA).

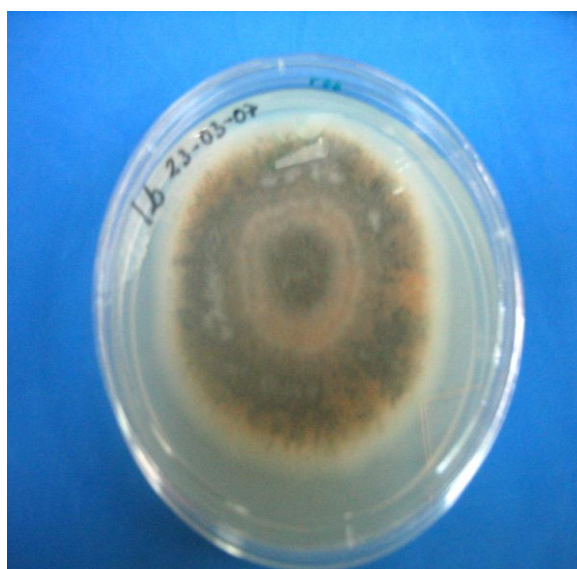


Figura 21. Cepa **1.b** obtenida a partir de una herida del tallo que manifestó una planta joven de frijol con antracnósis.

Como se nota al igual que la cepa de *Colletotricum lindemuthianum*. Raza 467, presentó un halo naranja después de cuatro semanas a las mismas condiciones mencionadas con anterioridad.

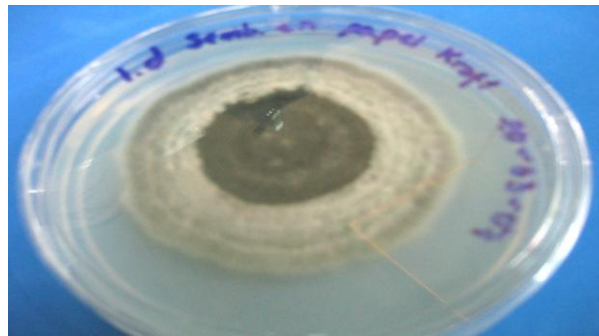


Figura 22. Cepa **1.d** obtenida de un fragmento de la raíz dañada por antracnósis.

Esta cepa se manifestó con halos en tonalidades arena, negras y grises después de treinta días de haber sido sembradas a las mismas condiciones de los otros experimentos.

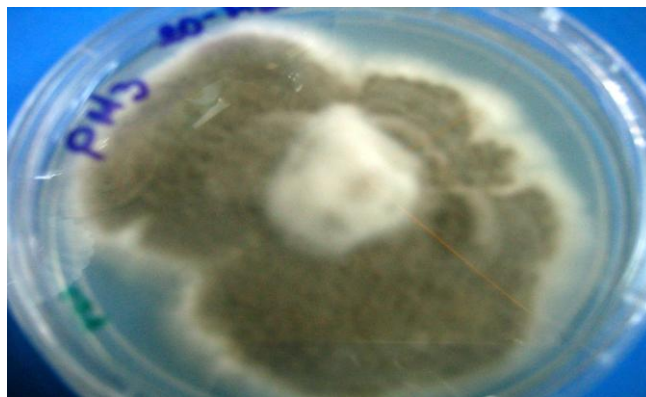


Figura 23. Cepa **PM3** obtenida de una herida de aguacate causada por daño con Antracnósis.

Esta cepa fue la que mostró mayor diferencia de crecimiento a las anteriormente presentadas, esto posiblemente se debe a su origen (aguacate); se ve como un tipo de algodoncillo de color verde militar con blanco, pero microscópicamente se puede observar la estructura característica del *Colletotrichum lindemuthianum* que son los apresorios en forma ovalada.

### Resultados correspondientes a la actividad 1.4.

#### Identificación del hongo *Colletotrichum lindemuthianum*

Para llevar a cabo la identificación de este hongo fue necesario conocer las estructuras de las cuales se conforma, entre las más importantes se encuentran los conidios y apresorios debido a su forma específica, y por lo tanto por medio de ellas se diferenció el tipo *lindemuthianum*.

En la figura 24 se muestran las estructuras que presentaron las cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* vistas a través de microscopio compuesto.

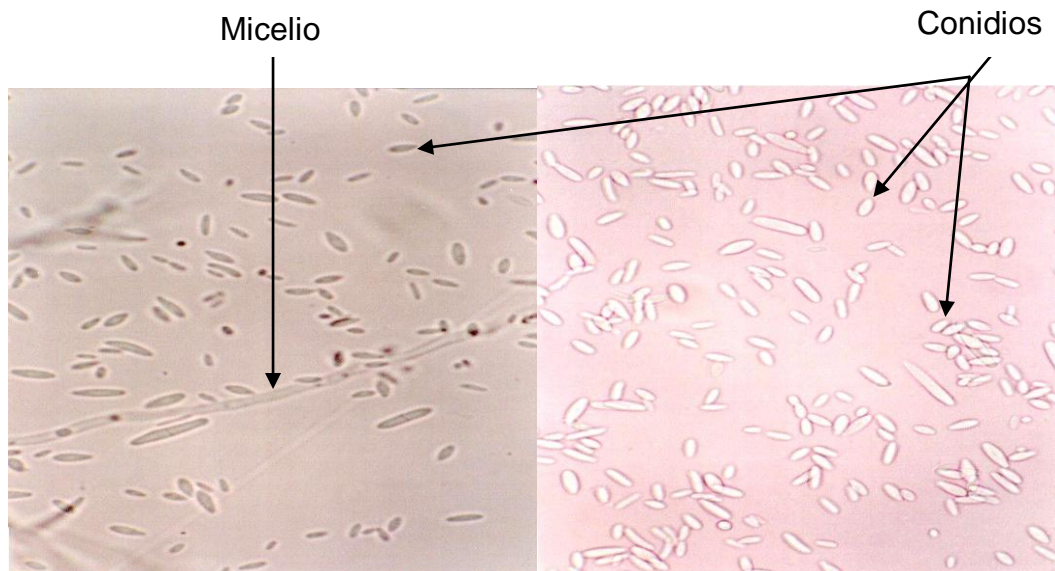


Figura 24. Conidios y el micelio del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467.

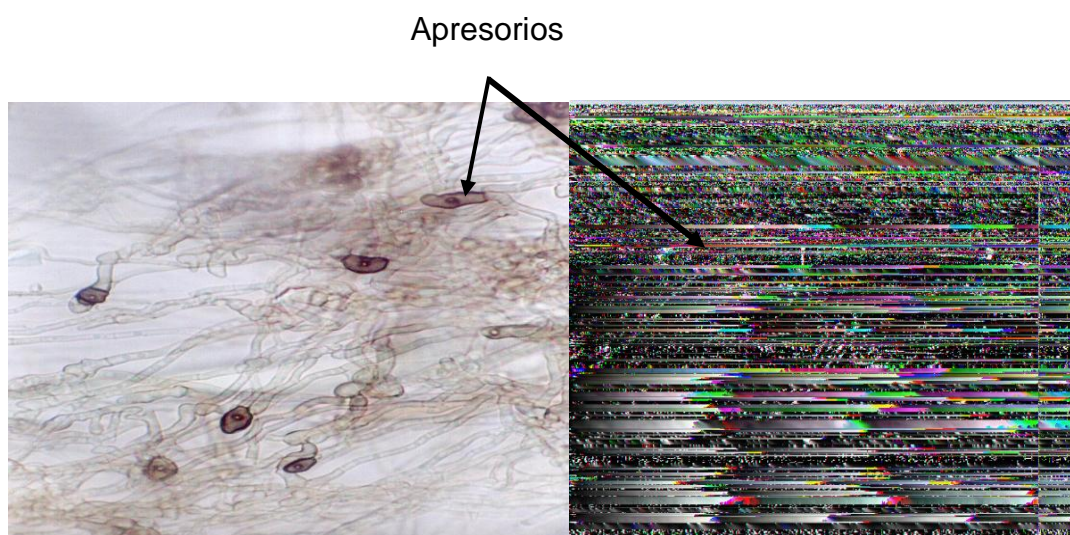


Figura 25. Fotografías de los apresorios del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 identificadas experimentalmente.

Estas estructuras características la presentaron tres cepas aisladas de diferentes orígenes; (PM3), (1.b), (1.d) y la cuarta cepa correspondiente a la raza 467.

### **Resultados correspondientes al Objetivo Particular 2.**

#### **Extracción y semipurificación de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de *Colletotrichum lindemuthianum***

Para llevar a cabo este objetivo fue necesario realizar un seguimiento experimental del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en medio de cultivo líquido y pruebas preliminares sencillas (condiciones de PH, velocidad de agitación y temperatura) que nos dieran un indicio del desarrollo de este hongo, así como de la producción de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) y se basaron en lo cambios físicos que presentaron los caldos de cultivo.



Cuadro 5. Seguimiento experimental del desarrollo del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en medio de cultivo líquido <sup>(34)</sup> sin tween 80 a condiciones de temperatura 30°C y 150 RPM.

<b>Días</b>							
<b>Cepa</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>C.I. raza 467</b>	Formación de un grumo con un diámetro aprox. De .2 mm. Color crema.	Formación de otro grumo similar.	Desarrollo y crecimiento de lo dos grumos a un diámetro aprox. 1cm.	Diámetro aprox. 1.3 cm. , y se agregaron 50 ml. de medio de cultivo porque el hongo lo absorbió.	Se comenzaron a fusionar los dos cúmulos del hongo.	Se unieron ambos grumos, formando un grumo irregular con un diámetro aprox. De 1.8 cm.	A parte del grumo reencuentran 3 hilos del hongo suspendidos en el medio.
<b>C.I. 1.b</b>	A lo largo de 9 días no se notaron visualmente cambios en los matraces que contenían el medio de cultivo y los distintos tipos de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .						
<b>C.I. 1.d</b>							
<b>C.I. Pm3</b>							

El hongo *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467, fue el único que se desarrolló en el medio de cultivo líquido, sin la necesidad de Tween 80.

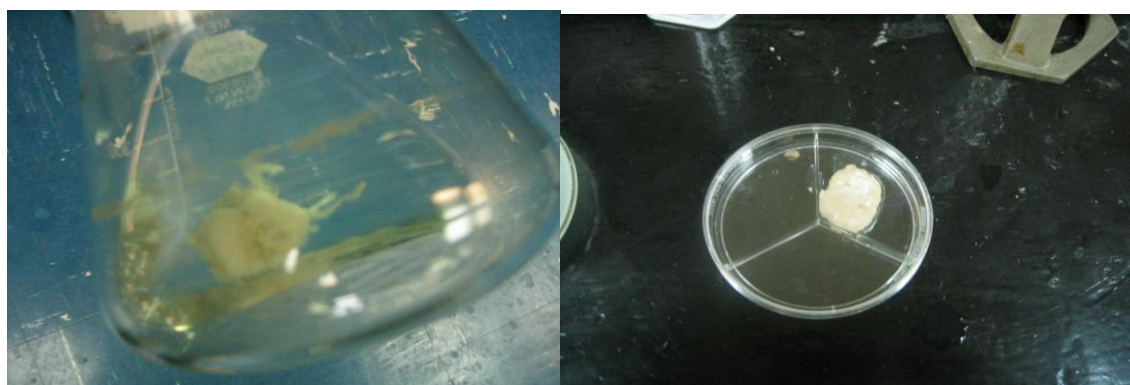


Figura 26. Crecimiento y desarrollo del *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 después de 9 días desde su transferencia de PDA al medio nutritivo líquido.

Cuadro 6. Seguimiento experimental en el medio de cultivo (50ml.), conteniendo tween 80 al .01% (200ml.) con las diferentes cepas de *C. lindemuthianum*.

Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
<b>C.I raza 467</b>									
<b>C.I. 1.b</b>									
<b>C.I. 1.d</b>			Formó 3 esferas con diámetro aprox. De 1 cm. c/u.	Aumentó el número de esferas.	Hay dos esferas con diámetro de 1.5 cm. Y 9 con diámetro de 1cm.				
<b>C.I. Pm3 con cepa del 20-03-07</b>			Formó muchos grumos circulares con diámetro aprox. De 2 mm.	Aumentó el número de esferas	Sigue aumentando el número de esferas al grado que son incontables a simple vista, con un diámetro aprox. De 2 mm.				
<b>C.I.</b>			Formó	Se están	Hay 18				

<b>Pm3 del 30-03-07</b>			pocas esferas con diámetro entre 1 y 2 mm.	formando esferas más grandes	esferas con diámetro aprox. De .7 cm. Y varias esferas pequeñas con un diámetro de .2 cm.				
-----------------------------	--	--	---	---------------------------------------	--	--	--	--	--

En los cuadros que presentan ausencia de comentarios no se notan visualmente cambios en los matraces que contienen el medio de cultivo y los distintos tipos de *Colletotrichum lindemuthianum*.

En contraste con los resultados anteriormente obtenidos, se notó que al utilizar tween 80 en el medio de cultivo líquido no se desarrolló la cepa de *C. lindemuthianum* raza 467, ni la cepa 1.b, cabe mencionar que esta cepa no muestra cambio alguno de ninguna de las formas en que se llevó su cultivo; sin embargo con este medio, se obtuvieron mayores diferencias en crecimiento en cuanto a la cepa **1.d** y **PM3**. Se formaron cúmulos (biomasa) que son la forma de manifestación y desarrollo del hongo *C. lindemuthianum* en medio líquido.

En la figura 27 se muestra la falta de crecimiento de los cúmulos presentados en los demás medios de cultivo de las cepas llamadas 1.b y *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467.

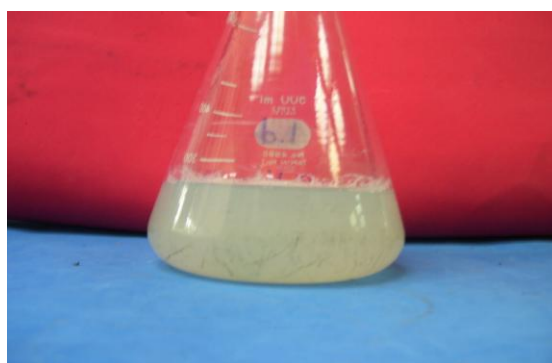


Figura 27. Cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* 1.b (origen: la raíz de una planta de frijol con Antracnósis) en medio líquido (tween 80 y medio de cultivo estéril).

Es importante señalar que la cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* 1.b fue la única que no presentó ningún tipo de cambio físico en el medio líquido de las dos formas en las que se llevó a cabo esta etapa experimental.



Figura 28. Cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 en medio líquido (tween 80 y medio de cultivo estéril).

En las Figuras 29 y 30 se muestra el desarrollo del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en medio líquido y tween 80 bajo condiciones controladas de tiempo (9 días), temperatura (30°C) y rpm (150 rpm).

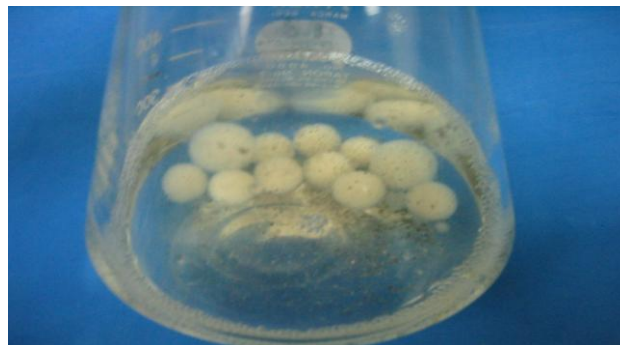


Figura 29.. Cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* 1.d en medio líquido.

La figura 29 es una fotografía tomada al tercer día de incubación, nótese la forma de crecimiento levaduriforme (en forma de esferas); este cultivo partió de un cultivo en caja.

Estas fotografías muestran con claridad el desarrollo de los cúmulos en los que se manifiesta en medio líquido nutritivo el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, cabe mencionar que después del noveno día no hay modificación notable en el crecimiento o forma del hongo.

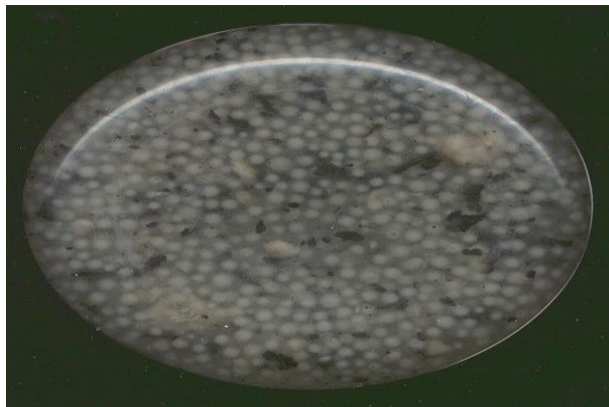


Figura 30. Cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* PM3 en medio líquido a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 30 se nota la forma de crecimiento levaduriforme (en forma de esferas más pequeñas), cultivo más joven.

Estas fotografías demuestran que aún siendo la cepa del mismo origen el tamaño y tipo de desarrollo puede variar en cuanto a la edad de la cepa de partida; por lo que es importante llevar a cabo la experimentación con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*.

Con el paso del tiempo el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* en medio líquido tiende a formar aglomerados cada vez mas grandes, se opaca el medio

de cultivo líquido e incluso el hongo se empieza a teñir en ciertas zonas de un color azul- verdoso debido a la absorción de los componentes presentes en el medio de cultivo.

A partir de los caldos de cultivo de las diferentes cepas de *Colletotrichum* aisladas, se llevaron a cabo las pruebas de actividad de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).

Una vez llevada a cabo la reacción de desacetilación de la quitina con los diversos caldos de cultivo del *Colletotrichum*, se llevó a cabo las pruebas de verificación de la presencia de quitosán a través de la prueba de precipitación con álcali. Y la de disolución del quitosán con ácido acético.

Cuadro 7. Prueba preliminar para revisar la posibilidad de desacetilación de quitina.

<b><i>Al incubarse con enzimas de las cepas:</i></b>	<b><i>Disolución de la quitina en ácido acético</i></b>	<b><i>Presencia de precipitado al agregar NaOH al 13%</i></b>
<b>1.d</b>	Parcialmente	SI
<b>Pm3 del 17</b>	Parcialmente	SI
<b>PM3 del 27</b>	Parcialmente	SI
<b>Raza 467</b>	Parcialmente	SI
<b>1.d</b>	Parcialmente	SI
<b>1.b</b>	Parcialmente	SI

Esta prueba preliminar es muy sencilla, pero importante, debido a que si se disuelve la quitina filtrada en ácido acético se demostraría rápidamente que la parte disuelta es quitosán, si se presenta un precipitado después de agregar Hidróxido de sodio al 13%, ya que este precipitado podría ser quitosán.

Como se observa en el cuadro anterior los resultados fueron prácticamente los mismos sin importar la cepa; ahora no necesariamente porque se presentó precipitado al agregar Na OH al 13 % significa que el precipitado sea quitosan, si no que pueden ser las sustancias contenidas en el medio nutritivo líquido.

Debido a estas razones se replanteó el uso de únicamente el medio nutritivo con quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41), y se propuso el uso de otra enzima llamada lisozima esta proteína enzimática causa el debilitamiento de la capa de péptidoglicano (mureína) de la pared celular bacteriana al romper los enlaces existentes entre las moléculas del ácido N-acetilmurámico y la N-acetil glucosamina.

### **Resultados correspondientes al Objetivo Particular 4.**

#### **Grado de desacetilación determinado por titulación potenciométrica.**

A los precipitados obtenidos del quitosán se les hizo la determinación del grado de desacetilación.

El grado de desacetilación por titulación potenciométrica fue determinado tal y como se indica en el Capítulo 2. A continuación se muestran los valores en porcentaje de grado de desacetilación correspondientes a cada una de las muestras de quitina desacetilada con la enzima CDA del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de diferentes orígenes.

Cuadro 8. Porcentaje resultante de la determinación del grado de desacetilación de las distintas muestras de quitina-quitosan por titulación potenciométrica.

<b>MUESTRA DE QUITINA - QUITOSAN</b>	<b>TRATAMIENTO APLICADO A LA QUITINA ORIGINAL</b>	<b>GRADO DE DESACETILACIÓN (%)</b>
<b>0</b>	Quitina original	28,67
<b>1</b>	Quitina tratado con medio de cultivo con la enzima <i>quitina desacetilasa PM3</i> a pH de 8.5	64,50
<b>2</b>	Quitina tratado con medio de cultivo con la enzima <i>quitina desacetilasa PM3</i> a pH de 3.09	56,73
<b>3</b>	Quitina con tratamiento previo con lisozima y posteriormente con la enzima <i>quitina desacetilasa PM3 27</i> y Buffer Tris- HCOOH	34.55
<b>4</b>	Quitina con tratamiento previo con lisozima y posteriormente con la enzima <i>quitina desacetilasa PM3 17</i> y Buffer Tris- HCOOH	40.31
<b>5</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa PM3</i> a pH de 8.5	28.64
<b>6</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa PM3</i> a pH de 8.5 (2° Evento)	31.61
<b>7</b>	Quitina con tratamiento previo con lisozima y posteriormente con la enzima <i>quitina desacetilasa de Colletotrichum lindemuthianum raza 467</i> y Buffer Tris- HCOOH	40.31
<b>8</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa de</i>	37.45



	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> raza 467 a pH de 8.5	
<b>9</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa 1.d</i> a pH de 8.5	40.31
<b>10</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa 1.d</i> a pH de 8.5 (2° Evento)	25.63
<b>11</b>	Quitina con tratamiento previo con lisozima y posteriormente con la enzima <i>quitina desacetilasa 1.d</i> y Buffer Tris- HCOOH	69.52
<b>12</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa 1.b</i> a pH de 8.5	28,64
<b>13</b>	Quitina tratada únicamente con la enzima <i>quitina desacetilasa 1.b</i> a pH de 8.5 (2° Evento)	48.68

Como se puede observar la cepa PM3 a diversas condiciones de trabajo, así como la 1d, mostraron los mayores grados de desacetilación.

La quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de la cepa PM3 al parecer tiene un amplio rango de trabajo porque a pH 8.5 y 3.09 se obtienen 64.5 y 56.73 grados de desacetilación respectivamente. La quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de la cepa 1d aunque muestra un poco más de grado de desacetilación, las condiciones de trabajo de la enzima son más complicadas ya que previamente se usó la enzima lisozima y posteriormente la quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) se trabajó con un Buffer Tris- HCOOH, lo que hace más costoso el proceso.

#### **Resultados correspondientes al Objetivo Particular 5.**

#### **Determinación del peso molecular de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) obtenida, mediante electroforesis para proteínas.**

Se llevó a cabo el proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida para proteínas siguiendo la metodología mencionada en el capítulo anterior, con el fin de identificar la presencia de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41), y de saber el peso molecular de ésta, ya que bibliográficamente existen dos

tipos de *Colletotrichum lindemuthianum* útiles para la producción extracelular de CDA, estas son:

- ATCC 5667 del cual se obtiene una CDA de 24 KDa
- DSM 63144 cuya CDA pesa 150 KDa

En la figura 31 se muestra un gel de poliacrilamida al 10 % donde se corrieron los extractos enzimáticos obtenidos después del tratamiento previo con Amberlita, antes descrito.

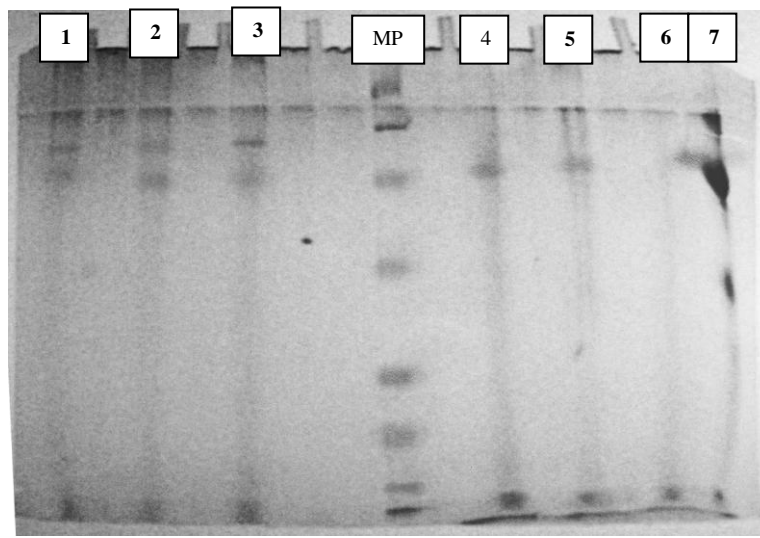


Figura 31. Gel de poliacrilamida al 10% obtenido.

En esta fotografía se observan las bandas en el gel de poliacrilamida a una concentración del 10%, presentándose de izquierda a derecha la enzima obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de aguacate PM3 (1) con 17 días de crecimiento, la enzima obtenida del *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 (2) con 30 días de crecimiento del hongo en medio líquido, la enzima obtenida del *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 (3) con 15 días de crecimiento del hongo en medio líquido, el marcador de peso molecular Cat 161-0318-Bio Rad, la enzima obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* originario del tallo de una planta de frijol con antracnosis y la enzima obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de aguacate PM3

(4) con 27 días de crecimiento, el medio de cultivo líquido concentrado de la misma forma que las enzimas (por medio de Amberlita.(5), medio de cultivo solo (6) y por ultimo la albúmina (BSA) (7).

Es muy importante observar con detenimiento esta fotografía, debido a que en el penúltimo pocillo se corrió el medio de cultivo concentrado, para observar si este influía en la presencia de bandas (proteínas), y el resultado es negativo, lo cual es favorable en su totalidad, y ahora sabemos que las bandas presentadas por las demás muestras son características de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).

Las bandas expresadas por el marcador de peso molecular son las siguientes proteínas con sus respectivos pesos moleculares:

- B-Galactosidasa            124,000 Da
- BSA                            80,000 Da
- Ovoalbúmina                49,100 Da
- Anhidrasa carbónica        34,800 Da
- Inhibidor Tripsina de soya 28,900 Da
- Lisozima                      20,600 Da
- Aprofina                      7,100 Da

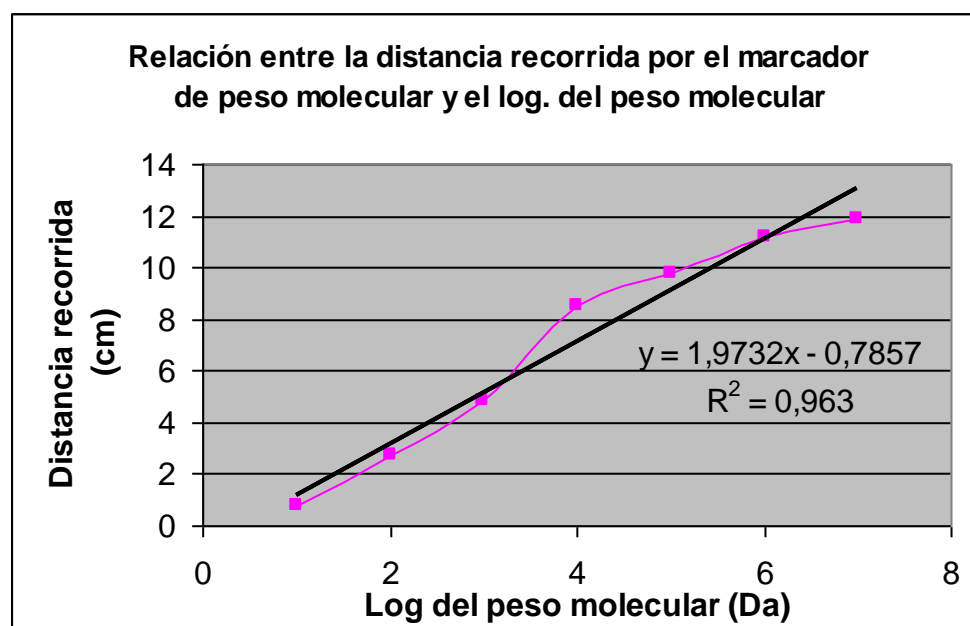
Por medio de las distancias recorridas por las proteínas del marcador de peso molecular y el logaritmo de sus pesos moleculares, se construyó un gráfico el cual sirvió para interpolar el logaritmo del peso molecular de las enzimas quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de diferentes orígenes.

A continuación se muestran el cuadro 9 y el gráfico 1 que señala la relación entre la distancia recorrida y el logaritmo del peso molecular del marcador molecular.

Cuadro 9. Distancia recorrida durante la electroforesis por el marcador molecular Cat 161-0318-Bio Rad en un gel de poliacrilamida al 10 %.

<b>Peso molecular del marcador (Da)</b>	<b>Log de PM (Da)</b>	<b>Distancia recorrida(cm)</b>
124000	5.09	0,8
80000	4,9	2,7
49100	4,69	4,85
34800	4,54	8,5
28900	4,46	9,8
20600	4,31	11,2
7100	3,85	11,9

Gráfico 1. Relación existente entre la distancia recorrida por el marcador de peso molecular y el logaritmo del peso molecular.



Cuadro 10. Distancia recorrida durante la electroforesis en el gel de poliacrilamida al 10% por las enzimas quitina desacetilasas, así como su peso molecular.

<b>Distancia recorrida (cm)</b>						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	Albúmina
1,3	1,35	1,2	2,1	2,1		1,8
2,15	2,15	2,2				
<b>Peso molecular LOG (Da)</b>						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	Albúmina
5,13	5,12	5,14	5,05	5,05		5,08
5,04	5,04	5,04				
<b>Peso molecular (Da)</b>						
M1	M2	M3	M4	M5	M6	Albúmina
134896, 28	131825, 67	138038, 42	112201, 84	112201, 84		120226,44
109647, 81	109647, 81	109647, 81				

Donde:

M1: Es la enzima obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de aguacate (PM3 17)

M2: Es la enzima obtenida del *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 con 30 días de crecimiento del hongo en medio líquido

M3: Es la enzima obtenida del *Colletotrichum lindemuthianum* raza 467 con 15 días de crecimiento del hongo en medio líquido

M4: Es la enzima obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* originario del tallo de una planta de frijol con antracnosis

M5: Es la enzima obtenida del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* de aguacate (PM3 27)

M6: Es el medio de cultivo líquido concentrado de la misma forma que las enzimas (por medio de Amberlita).

En base a los pesos moleculares obtenidos, la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) que se obtuvo del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* pesó 150 000Da, lo cual significa que es de alto peso molecular según lo señalado bibliográficamente.<sup>(32)</sup>

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- Se lograron aislar de diversas fuentes, al hongo *Colletotrichum lindemuthianum* provenientes de lesiones en vainas de frijol, frijol y aguacate.
- Se logró identificar al hongo *Colletotrichum lindemuthianum* a través de sus estructuras morfológicas, principalmente por sus conidios y apresorios.
- La mayor actividad de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) se presentó en los caldos de cultivo de las cepas *PM3* y *1.d*, con 17 días de cultivo.
- Se partió de una quitina con grado de desacetilación de 28.67% y a través de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) de los caldos de cultivo, se logró obtener hasta un 69.52% de grado de desacetilación.
- A través de la electroforesis se analizaron los extractos enzimáticos obtenidos y se encontraron dos bandas que corresponden a los pesos moleculares de 150 kDa.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en la electroforesis del gel de poliacrilamida para proteínas, la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) tiene un peso molecular similar al del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* DSM 63144 de alto peso molecular.
- La conversión de quitina a quitosan, por vía enzimática propicia numerosas ventajas tales como evitar la contaminación que se produce al desacetilar químicamente.
- Desafortunadamente no se cumple la premisa de que disminuirían los gastos para llevar a cabo la desacetilación, lo cual se analizó en base a los costos de químicos y uso de equipos contra el uso de la lisozima y quitina para desacetilar, por lo que es necesario pensar en otras posibilidades para optimizar el uso de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41).



- Debido a la presencia de la enzima quitina desacetilasa (EC. 3.5.1.41) se pudo continuar el experimento llevando a cabo la desacetilación enzimática de la quitina, lo cual es un punto crítico para la resolución del objetivo general planteado en este proyecto.

## **REFERENCIAS**

1. Ahmad Khan Tanveer, Khiang Kok, Seng Chan Hung, "Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods", *J Pharm Pharmaceut Sci*, Vol. 5-3, (2002), pp. 205-212.
2. Alonso M. J., " Las nanopartículas poliméricas: nuevos sistemas para mejorar la biodisponibilidad ocular de fármacos", Archivos de la sociedad española de oftalmología, n.º 8 – agosto (2001), (<http://difusion.uabcs.mx/memorias/mostrarPonencia.php?id=10&idPonencia=159>)
3. Baxter Shari, Zivanovic Svetlana, Weis Jochen, "Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan", *Food Hydrocolloids* Vol.19,(2005),pp. 821–830
4. Berth G., Dautzenberg H., "The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 47 (2002), pp.39-51
5. Blair D. E., Hekmat, Alexander, Schuttelkopf, Binesh Shrestha, Tokuyasu Ken, Stephen G., and Daan M. F. Van Aalten "Structure and mechanism of chitin deacetylases from the Fungal Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*", *Biochemistry*, Vol. 45 (31) (2006), 9416-9426.
6. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Arguelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo M., "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization", *Polymer*, Vol. 42, (2001), pp. 3569-3580.

- 7. Cárdenas Galo, Cabrera Gustavo, Plessing Carlos, Curotto Emilia, Miranda Patricia, “Enzymatic Hidrolisis of chitin , chitosan and derivatives using lysozyme“, ED..**
8. Casariego Alicia, Cossío Gema, Díaz Raul, González Juan, Fernández Sol y Ramírez Ana, "Propiedades mecánicas de películas de quitosana elaboradas con ácido láctico influencia de la concentración de ácido y el tipo y concentración de plastificante", *Alimentaria*, septiembre (2002), pp. 21 a 31.
9. Cira L.A., Huerta S. y Shirai K., “Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus* sp) en un reactor de fermentación sólida”, *Revista mexicana de ingeniería química*, Vol. 1 (2002) 45-48.
10. Fernández Monagas Sol A., “Hidrólisis enzimática de carboximetilquitina y carboximetilquitosana”, *Cubana Farm*, Vol32-2, (1998), pp. 125-129.
11. Furuta Masakazu, Oka Masahito, Hayashi Toshio, “Radiation sterilization of enzyme hybrids with biodegradable polymers”, *Radiation Physics and Chemistry* Vol. 63 (2002), pp. 323–325
12. Hackman Ronald H., Goldberg, “Light-scattering and infrared-spectrophotometric studies of chitin and chitin derivatives”, *Carbohydrate Research*, Vol. 58, (1974), pp. 35-45.
13. How Chuen, Hein San, Ogawa Koza, Chandkrachang, Stevens Willem F., “Distribution of D-glucosamine moieties in heterogeneously deacetylated cuttlefish chitin”, *Carbohydrate Polymers*, XXX (2007), XXX.
14. Jun Cai, Jianhong Yang, Yumin Du, Lihong Fan, Yanlin Qiu, Jin Li, John F. Kennedy, “Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* micelium of citric acid production plant”, *Science Direct, Carbohydrate Polymers* , Vol. 64 (2006) 151-157

15. Lárez Velásquez Cristóbal, "Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos", *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 4(2)*, Abril 2003, pp.91-109.
16. Laurel L., Davis, Bartnicki-García Salomon, "Chitosan synthetase and chitin deacetylase from *Mucor Rouxii*", *Biochemistry*, Vol. 23, (1984), pp.1065-1073
17. Liu Dasheng, Wei Yuanan, Yao Pingjia, Jiang Linbin, "Determination of the degree of acetylation of -chitosan by UV spectrophotometry using dual standards", *Carbohydrate Research*, Vol. 341 (2006), 782-785.
18. Martinou Aggeliki Martinou, Vassilis Bouriotis, Stokke T., Bjorn Varum M. Kjell, "Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially N-actylated chitosans", *Carbohidrate Research*, Vol. 11 (1998) 71-78.
19. Miranda Castro Susana Patricia, Cárdenas Galo, López Daniel, Lara-Sagahon, "Comportamiento de películas de Quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate", *Revista de la Sociedad Química de México*, Vol. 47, Núm. 4 (2003), pp 331-336.
20. Minagawa Tatsuya, Okamura Yasuhiko, Shigemasa Yoshihiro, Minami Saburo, Okamoto Yoshiharu, "Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 67 (2007), pp. 640-644.
21. Niola Frédéric, Basora Nuria, Chornet Esteban, Francois Vidal Pierre, "A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC", *Carbohydrate Research*, Vol. 238, (1993), pp. 1-9.
22. Ocampo Hernández Jaime, "Manejo de enfermedades del frijol", Comité estatal de sanidad vegetal de Guanajuato A.C., Guanajuato, Mayo 26 del 2006

23. O'Connell, Ride J. P., "Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Colletotrichum lindemuthianum*", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol. 37, (1990), pp. 39-53.
24. Rao M. S., Muñoz J., Stevens W. F., "Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 54 (2000) 808-813.
25. Sannan Takanori, Kurita Keisuke, Ogura Katsuyuki, Iwakura Yoshio, "I.r. spectroscopic determination of degree of deacetylation", *Polymer*, Vol.19, (1978), pp. 458, 459.
26. Snyman D., Hamman J.H., Kotze J.S., Rollings J.E., Kotze A. F., "The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride", *Carbohydrate Polymers*, Vol.47 (2002) 39-51
27. Tanaka Takeshil, Fukui Toshiaki, Fujiwara Shinsuke, Atomi Haruyuki, Imanaka Tadayuki, "Concerted Action of Diacetylchitobiose Deacetylase and Exo B-D-glucosaminidase in a Novel Chitinolytic Pathway in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 29, (2004 ) pp. 30021-30027.
28. Tokuyasu Ken, Kaneko Satoshi, Hayashi Kiyoshi, Yutaka Mori, "Production of a recombinant chitin deacetylase in the culture medium of *Escherichia coli* cells", *FEBS Letters* Vol. 458 (1999), pp. 23-26.
29. Tokuyasu Ken, Ohnishi-Kameyama Mayumi, Hayashi Kiyoshi, "Purification and characterization of Extracellular Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*", *Biosel, Biotech, Biochem*, Vol.60 (10) (1996), 1598-1603.

30. Tokuyasu Ken, Ono Hiroshi, Hayashi Kiyoshi, Mori Yutaka, "Reverse hydrolysis reaction of chitin deacetylase and enzymatic synthesis of B-D-GlcNAc-(1-4)-GlcN from chitobiose", *Carbohydrate Research*, Vol. 322 (1999), pp.26-31
31. Tokuyasu Ken, Ono Hiroshi, Mitsutomi Masaru, Hayashi Kiyoshi, Mori Yutaka, "Synthesis of a chitosan tetramer derivative, B-D-GlcNAc-(1-4)-D-GlcN through a partial N-acetylation by chitin deacetylase", *Carbohydrate Research* Vol. 325 (2000), pp. 211-215.
32. Tsigos Iason, Martinou Aggeliki, Kafetzopoulos Dimitris y Bouriotis Vassilis, "Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology", *Trends in biotechnology*, Vol. 18 No. 7, (2000), pp.305-312
33. Tsigos Iason, Bouriotis Vassilis, "Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*", *The journal of biological chemistry*, Vol. 270, No. 44, (1995), pp. 26286–26291.
34. Win N. N., Steven W.F., "Shrimp chitin a substrate for fungal chitin deacetylase", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 57 (2001) 334-34

Yábar Varas Carlos, "Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN", Instituto Nacional de Salud (2003), pp. 1-19.

## ANEXO A

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LA CEPA DEL HONGO *Colletotrichum Lindemuthianum* y LA ENZIMA CDA.

Medio de cultivo líquido estéril para el crecimiento del *Colletotrichum Lindemuthianum* (Tsigos et. Al, 1996)

Reactivos	Cantidad en gramos	Concentración (%)
Glucosa	7.5	1.5
Acido glutámico	3.3	0.66
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.1
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.25	0.5
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.9	0.18
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.5	0.1
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.15	0.03
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0.2	0.04
Tiamina	0.5	0.1
Acido nicotínico	0.5	0.1

Aforar esta proporción a 500 ml. de agua destilada y posteriormente esterilizar

Buffer de acetato a pH de 4.6

Reactivos	Volumen (ml)	Concentración (M)
Acido acético	25.5	.2
Acetato de sodio	24.5	.2

Aforar en esta proporción a 100 ml. de agua destilada.

Buffer Tris-HCOOH a pH de 8.5

Reactivo	Cantidad en gramos	Concentración
Tris-HCOOH	121.14	50mM

Aforar en esta proporción en 1 litro de agua destilada.

## **ANEXO B**

### **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**

#### **BUFFER DE LA MUESTRA 4X PARA PROTEÍNAS**

<b>Reactivos</b>		<b>Concentración final</b>
Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 mL	0,125 M
SDS al 10 %	2,5 mL	2.5 %
2-Mercaptoetanol	2,5 mL	25 %
Glicerol	2,5 mL	25 %
Azul de bromofenol	1 mg	0,1 mg/mL

Mezclar los componentes arriba mencionados.

#### **BUFFER DE ELECTROFORESIS TRIS-GLICINA 10X PARA PROTEÍNAS**

<b>Reactivos</b>		<b>Concentración final</b>
STris base	3,038 gr	0,25 M
Glicina	15,01 gr	2 M
SDS	1 gr	1 %

Completar con 100 mL de agua bidestilada.

<b>Reactivos</b>		<b>Concentración final</b>
STris base	3,038 gr	0,25 M
Glicina	15,01 gr	2 M
SDS	1 gr	1 %

Completar con 100 mL de agua bidestilada.



## SOLUCIÓN DE TRABAJO ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA AL 30%

Reactivos		Concentración final
Acilamida	29,2 gr	29,2%
Bisacilamida	0,8 gr	0,8%
Mezcla total	30 gr	30%

Disolver con 100 mL de agua bidestilada. Filtrar para remover las impurezas en papel Whatman N° 1 y forrar el recipiente con papel aluminio o kraft.

### **BUFFER TRIS 1,5 M pH= 8,8**

Pesar 181,65 g de tris base y enrasar con agua bidestilada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH= 8,8 con HCl.

### **BUFFER TRIS 0,5 M pH=6,8**

Pesar 60,55 g de tris base y enrasar con agua bidestilada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH = 6,8 con HCl.

### **PERSULFATO DE AMONIO (APS 10%)**

Pesar 100 mg y diluir en un volumen final de 1 mL con agua tridestilada. Este reactivo en polvo es altamente hidrofílico, por lo tanto, es importante mantener el envase herméticamente cerrado. Esta preparación debe ser de 1 semana de antigüedad como máximo.

### **BUTANOL-AGUA**

Mezclar un volumen de butanol más un volumen de agua destilada y mezclar. Tomar la fase superior de la mezcla. <sup>(35)</sup>

**PREPARACIÓN DE GELES POLIACRILAMIDA DE RESOLUCIÓN DE ACUERDO A SU CONCENTRACIÓN Y VOLUMEN**

<b>COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN</b>	<b>VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN</b>			
<b>GEL AL 6</b>	<b>5 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>15 mL</b>	<b>20 mL</b>
Agua bidestilada	2,6	5,3	7,9	10,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,0	2,0	3,0	4,0
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01
<b>COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN</b>	<b>5 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>15 mL</b>	<b>20mL</b>
<b>GEL AL 8%</b>				
Agua bidestilada	2,3	4,6	6,9	9,3
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,3	2,7	4,0	5,3
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01
<b>GEL AL 10%</b>				
Agua bidestilada	1,9	4,0	5,9	7,9
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,7	3,3	5,0	6,7
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

**PREPARACIÓN DE GELES DE EMPACAMIENTO AL 5% DE ACUERDO A SU VOLUMEN**

<b>COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN</b>	<b>3 mL</b>	<b>4 MI</b>	<b>6 mL</b>	<b>8 mL</b>
Agua bidestilada	1,1	2,3	3,4	4,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2,5	5,0	7,5	10,0
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

## **SOLUCIÓN DE TRABAJO DE AZUL BRILLANTE DE COMASIE R250**

Disolver 0,25 g de azul brillante de coomasie R250 en 90 mL de metanol: H<sub>2</sub>O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar la solución a través de un papel Whatman N°1 para eliminar los residuos extraños. Antes de usar dejar en reposo por una semana en un frasco oscuro.

## **SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN RÁPIDA**

Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 50 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 40 ml. de agua destilada.

## **SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN LENTA**

Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 5 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 85 mL de agua destilada.

## **SOLUCIÓN GLICEROL METANOL**

Mezclar 4 mL de glicerol con 45mL de metanol. Llevarlo a un volumen de 100 mL de agua destilada.

## **SDS 10%**

Disolver 10 g de SDS en 80 mL de agua bidestilada, una vez disuelto se lleva a pH 7,2 con 10 N de NaOH, finalmente se completa hasta 100 mL con agua bidestilada.

Calentar a 68°C para disolver completamente el SDS. <sup>(35)</sup>