

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



“Optimización del pH y la temperatura para la producción de una quitosanasa extracelular a partir de un microorganismo (*Aeromonas* sp. PA8) aislado de ambiente extremo”

POR

Aglael Castro Gatica

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2009

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

Optimización del pH y la temperatura para la producción de una quitosanasa extracelular a partir de un microorganismo (*Aeromonas* sp. PA8) aislado de ambiente extremo

POR

AGLAEL CASTRO GATICA

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADO POR:



Dra. ANA VERÓNICA CHARLES RODRIGUEZ
Director



Dr. JUAN E. MAURICIO BENAVIDES
Asesor



Dr. ANTONIO F. AGUILERA CARBÓ
Asesor



ING. JOSÉ RODOLFO PEÑA ORANDAY
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio 2009

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

AGRADECIMIENTOS

A mi **ALMA MATER** quien me brindo, casa, comida y sustento, llenándome de buenos recuerdos con todos mis amigos, compañeros y maestros...

A la **Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez** y a todo su equipo por brindarme sus conocimientos y asesorarme durante la realización de este trabajo.

Al **Dr. Juan Enrique Mauricio Benavides** por brindarme su apoyo y sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. Antonio F. Aguilera Carbo** por su ayuda brindada para el término de este trabajo.

Al **Departamento de Biotecnología** de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

A mi primo **Hernán, Alfredo** y a mi hermana ahora conocida **Maritza**, por brindarme su amistad y consejos no solo a lo largo de mi carrera sino parte de mi vida.

A los docentes que me han formado como graduado con su dedicación, apoyo confianza, muchos regaños, exigencias, presiones y muchos consejos: **M. C Mary, M. C Xochitl, Químico Reboloso, T. L. Q Carlitos, Lic. Laurita, Q. F. B Carmen Julia, el ahora Dr. Heliodoro, a la Dra. Lourdes Caballero** y a todos aquellos que omití sin intención alguna.

A mis **amigos y compañeros** de toda la licenciatura en la Universidad y fuera de ella, por su amistad desinteresada o no, su compañía, respeto, confianza y por todos los buenos y malos momentos que pasamos juntos.

DEDICATORIAS

A mi padre DIOS por haberme permitido terminar una etapa más en mi vida, sin su ayuda, hubiera sido muy difícil llevarla a cabo.

A mis **padres:**

Sra. Alicia Gatica Sustaita

Sr. Javier Castro Cobos

Y a mis **hermanos:**

Javier

Edgar

Omar

Por todo su apoyo incondicional que me brindaron durante mi desarrollo profesional, no solo eso sino mis padres también por haberme dado la vida, a todos ustedes LOS QUIERO!!!!

Así también a sus esposas **Arcy** (Edgar) y **Tere** (Omar), al igual que a mis dos angelitos **Nair** y **Erik** sus hijos.

A mi segunda mamá, una gran amiga, la TIA ROSA (†) que se nos adelanto en el camino, pero que desde el cielo disfruta mi alegría, agradezco a ella por haberme dado alojamiento, cariño y sobre todo por todos sus consejos. Mi tía este triunfo te lo debo a ti y te lo dedico con todo cariño.

A mis primos Aimé, Chuy, Luis, por todo su apoyo y cariño, en las buenas y malas siempre estábamos juntos la familia GATICA.

A la familia Pérez Reyes (Vero, Fernando, Yuri, Fer y Naru) por ofrecerme todo su cariño y apoyo incondicional.

A la familia Charles Reyes (Mary, Chay, Jenny y Danna) por todos sus buenos consejos, amor y apoyo.... GRACIAS!!!

A mis amigos de la prepa: Rafa, Leo, Rodrigo, Arbey, Pivis, Celes, Jenny, amigos de universidad Tere, Alejandrina, Alfredo y Don Fer a todos ellos gracias!!!..

A mi novio y amigo Juan José Hernández Centeno quien siempre me ha ofrecido todo su amor y confianza, gracias hermoso... Te amo!!!...

INDICE

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	2
Antecedentes.....	2
Justificación.....	4
Hipótesis.....	5
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
1.-Quitina.....	7
1.1 Composición química.....	7
1.2 Métodos de Obtención.....	8
1.2.1 Método enzimático.....	8
1.2.2 Método químico.....	9
1.3 Usos y aplicaciones.....	10
2. Quitosán.....	11
2.1 Composición química.....	11
2.2 Métodos de Obtención.....	12
2.2.1 Método químico.....	12
2.2.2 Método enzimático.....	12
2.3 Propiedades.....	13
2.4 Usos.....	13
2.4.1 Formación de películas.....	13
2.4.2 Absorción de agua.....	14
2.4.3 Interacción con péptidos o proteínas.....	14
2.4.4 Propiedades biológicas.....	14
2.4.5 Propiedades antimicrobianas.....	14
2.5 Aplicaciones.....	15
2.5.1 Medicina y farmacia.....	15
2.5.2 Agricultura y ganadería.....	15
2.5.3 Industria textil.....	16
2.5.4 Industria alimentaria.....	16
2.5.5 Cosmética.....	17
3. Oligosacáridos.....	17
3.1 Propiedades.....	17
3.2 Obtención.....	18
4. Enzimas.....	19
4.1 Generalidades.....	19
4.2 Factores que afectan la actividad enzimática.....	20
4.2.1 Efecto del pH.....	20
4.2.2 Efecto de la temperatura.....	21
4.3 Cinética enzimática.....	21

5. Quitosanasas.....	23
5.1 Propiedades.....	24
5.1.1 Peso molecular.....	24
5.1.2 Especificidad del sustrato.....	24
5.1.3 Composición de aminoácidos y glicosilación.....	25
5.1.4 Influencia del pH y temperatura.....	25
5.1.5 Activadores e inhibidores de las quitosanasas.....	25
5.1.6 Modo de acción.....	26
5.2 Usos y aplicaciones.....	27
6. Microorganismos.....	28
6.1 Definición.....	28
6.2 Gram negativos.....	28
6.3 Gram positivos.....	29
6.4 Microorganismos marinos.....	29
6.5 Extremófilos.....	29
6.6 Microorganismos marinos simbióticos.....	29
7. Género <i>Aeromonas</i>	30
7.1 Especies.....	30
7.2 Enzimas secretadas por <i>Aeromonas</i> sp.....	30
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
CAPITULO V	
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina.....	8
Figura 2. Estructura química del quitosán.....	11
Figura 3. Reacción catalítica.....	22
Figura 4. Morfología microscópica de <i>Aeromonas</i> sp. PA8 mediante tinción de Gram...	40
Figura 5. Cinética de crecimiento microbiano de células de <i>Aeromonas</i> sp. PA8 cultivadas en caldo nutritivo a 37°C.....	42
Figura 6. Concentración de proteína celular de <i>Aeromonas</i> sp. PA8 en caldo nutritivo.	43
Figura 7. Grafica comparativa de crecimiento microbiano de <i>Aeromonas</i> sp PA8 empleando medio específico a diferentes pH 's.....	47
Figura 8. Grafica comparativa del contenido de proteína celular de <i>Aeromonas</i> sp. PA8 en medio específico empleando de diferentes pH's.....	48
Figura 9. Grafica comparativa del contenido de proteína extracelular de <i>Aeromonas</i> sp. PA8 en medio específico a diferentes pH's.....	50
Figura 10. Grafica comparativa de crecimiento microbiano de <i>Aeromonas</i> sp PA8 en medio de cultivo específico a diferentes temperaturas de incubación.....	52
Figura 11. Grafica comparativa del contenido de proteína extracelular en cultivos de <i>Aeromonas</i> sp. PA8 en medio específico empleando distintas temperaturas de incubación.....	53
Figura 12. Grafica comparativa de la actividad quitosanasa de <i>Aeromonas</i> sp PA8 en función del pH del medio de cultivo específico probado.....	55
Figura 13. Grafica comparativa de la actividad quitosanasa de <i>Aeromonas</i> sp PA8 en función de la temperatura de incubación.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización del quitosán.....	13
Tabla 2. Activadores e inhibidores de quitosanasas.....	26
Tabla 3. Modo de acción de la quitosanasa.....	27
Tabla 4. Curva de calibración de proteínas por el método de Lowry.....	34
Tabla 5. Componentes del medio de cultivo.....	35
Tabla 6. Curva de calibración de glucosa 500 ppm para azúcares reductores.....	39
Tabla 7. Relación de velocidad inicial de formación de producto, proteína extracelular, y actividad quitosanasas a diferentes pH 's.....	56
Tabla 8. Relación de velocidad inicial de formación de producto, proteína extracelular, y actividad quitosanasas a diferentes temperaturas.....	59

Resumen

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los microorganismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por una enzima en particular, por lo tanto, en todo organismo biológico se encuentra un gran número de enzimas. Estos catalizadores son las responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos; aceleran las reacciones bioquímicas en relación con reacciones no catalizadas a temperaturas alrededor de 37°C (Prado, *et. al*, 1999).

Existen factores que afectan la actividad y estructura de las enzimas entre los que cabe destacar: pH y la temperatura.

En este trabajo se optimizó el pH y la temperatura para la producción de una quitosanasa extracelular a partir de un microorganismo de ambiente extremo (*Aeromonas* sp PA8) aislado de la Poza Azul del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

Cinéticas de crecimiento bacteriano fueron determinadas en caldo nutritivo y medio específico para la producción de la enzima.

Se utilizó un medio de cultivo empleado como única fuente de carbono los oligosacáridos de quitosán de mediano peso molecular (30-100 kDa) para la producción de la quitosanasa extracelular.

Las cinéticas de optimización de pH y temperatura para la producción de la quitosanasa extracelular a partir de *Aeromonas* sp PA8 muestran que al emplear un medio con pH de 6.0 y una temperatura de incubación de 37°C se obtienen la mayor producción de enzima quitosanasa, así como los mejores valores de actividad enzimática (0.0642 U/mg de proteína). Comparando los datos de la cinética enzimática con la producción de la enzima, se determinó que la mayor producción de enzima catalíticamente activa se obtiene antes de que el microorganismo salga de la fase logarítmica y entre a fase estacionaria.

Palabras clave: quitosanasa, optimización, Aeromonas sp PA8, Cuatrociénegas.

Capítulo I

Introducción

Antecedentes

El quitosán, un polisacárido parecido a la celulosa, químicamente compuesto por unidades de N-acetil glucosamina, es un producto de la quitina, después de una desacetilación (Somashekar y Joseph, 1996).

La hidrólisis del quitosán y derivados, se puede realizar con diferentes métodos químicos, además la degradación selectiva de los mismos se puede llevar a cabo por enzimas propias de microorganismos en procesos biotecnológicos.

Los oligosacáridos del quitosán son amino azúcares no tóxicos de bajo peso molecular. Estos oligosacáridos son una mezcla de oligómeros de D- glucosamina con un grado de polimerización de 20.3 y un peso molecular de aproximadamente 2000 kDa. Los oligosacáridos son obtenidos mediante hidrólisis enzimática del quitosán mediante el empleo de la enzima quitosanasas (Park, 2002).

Los oligosacáridos de quitosán tienen actividad antifúngica y antimicrobiana, tienen la capacidad de absorber grasas y retrasar el crecimiento de tumores (Jeon *et al.*, 2000)

Se ha reportado en la literatura que los oligosacáridos de quitosán que particularmente muestran máximas actividades antifúngicas son los que presentan un grado de polimerización mayor de 5, sin embargo, los oligosacáridos de menor peso molecular presentan actividades antifúngicas significativas (Kim, *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999).

En los últimos años ha llamado la atención a los biotecnólogos para desarrollar procesos enzimáticos para la producción de oligosacáridos ya que el curso de la reacción se lleva a cabo bajo condiciones suaves y la distribución del producto puede ser controlada mejor, a pesar de la rapidez de la reacción química (Qin, *et al.*, 2002).

Las quitosanasas catalizan la degradación del quitosán parcialmente acetilado de forma endo-hidrolítica. La capacidad para hidrolizar quitosán con diferente grado de desacetilación depende del microorganismo que produce la quitosanasas.

Las quitosanasas se han encontrado en bacterias, hongos y plantas; la mayoría de bacterias y hongos secretan quitosanasas de manera extracelular (Monaghan, 1973), mientras que las quitosanasas de manera intracelular se encuentran en plantas (Grenier 1991) y en hongos *Zygomycetos* (Reyes, *et al.*, 1985).

En función de la especificidad del sustrato, las quitosanasas microbianas se pueden dividir en dos grupos. Las que pertenecen al grupo I sólo pueden hidrolizar quitosán, mientras que las que pertenecen al grupo II pueden hidrolizar quitosán y carboximetilcelulosa (Chiang, *et al.*, 2003).

Justificación

Las investigaciones sobre la producción de quitosanasas han tomado gran importancia debido a que los oligosacáridos han ganado terreno gracias a la diversidad de aplicaciones que tienen en diferentes campos industriales, como la industria agrícola, ganadera, biotecnológica, médica y sobretodo en la industria alimentaria.

Actualmente el interés de los oligosacáridos de quitosán a nivel industrial se debe a la actividad antifúngica, antimicrobiana, además de que poseen la capacidad de absorber grasas y retrasar el crecimiento de tumores (Kittur, *et al.*, 2003).

Una de las principales fuentes de obtención de quitosán es la industria pesquera ya que genera 1, 000,486 toneladas de cabeza de camarón en peso vivo, residuos ricos en quitosán los cuales representan un problema ecológico.

Los métodos convencionales utilizados para la obtención de oligosacáridos de quitosán son los que requieren compuestos químicos, los cuales originan desechos corrosivos que perjudican el medio ambiente, en los últimos años se ha optado por la generación tecnologías biotecnológicas alternas como son el uso de las enzimas. Por tal motivo es necesaria, la optimización del proceso de producción de las quitosanasas mediante la evaluación de parámetros como pH y temperatura, aireación, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, concentración de inóculo etc.

Los resultados generados permitirán mejorar la producción de la enzima quitosanasasa, proporcionando una alternativa al proceso químico que permita eficientar y reducir los costos de producción de los oligosacáridos de quitosán.

Hipótesis

Es posible la optimización del pH y la temperatura para la producción de una quitosanasa extracelular en un medio de cultivo que emplee como única fuente de carbono oligosacáridos de quitosán a partir de células de *Aeromonas* sp. PA8.

Objetivo General

Optimizar el proceso de producción de una quitosanasa extracelular producida por células de *Aeromonas* sp. PA8 proveniente de ambientes extremos.

Objetivos Específicos

Etapa I. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células de *Aeromonas* sp. PA8.

- Cultivar y conservar el microorganismo en caldo nutritivo.
- Monitorear el crecimiento microbiano en medio sólido.
- Determinar la curva de crecimiento en caldo nutritivo.
- Determinar la cantidad de proteína celular.

Etapa II. Optimización del pH del medio de cultivo para la producción de la quitosanasa.

- Sembrar el microorganismo en medio de cultivo específico.
- Monitorear el crecimiento microbiano a 3 diferentes pH 's
- Determinar las curvas de crecimiento en medio de cultivo específico

Etapa III. Optimización de la temperatura de incubación para la producción de la quitosanasa extracelular.

- Sembrar en medio de cultivo específico
- Monitorear el crecimiento microbiano a 3 diferentes temperaturas
- Determinar las curvas de crecimiento en medio de cultivo específico

Etapa IV. Estudio de la actividad enzimática del extracto obtenido, mediante cinéticas de viscosidad y/o liberación de azúcares reductores.

- Determinar la actividad enzimática mediante la liberación de azúcares reductores.

Capítulo II

Revisión de literatura

1.-Quitina

La quitina es un biopolímero el cual fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen la denominó “fungina” (Braconnot, 1811). El nombre quitina del griego, *xitwuv* que significa cubierta o envoltura se debe a Odier, que en 1923 la aisló a partir de escarabajos en soluciones alcalinas.

Compuesto insoluble en la mayoría de los disolventes comunes, Sin embargo, en la actualidad, la quitina y sus derivados han pasado a ser polímeros de gran aplicabilidad en los más diversos campos de la actividad humana.

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. Es el segundo polímero natural más abundante, sólo superado por la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable (Cauchie, 1998).

1.1 Composición química

Este polímero está compuesto por amino azúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ formando una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa algunas de las cuales se encuentran desacetiladas, en la figura 1 se muestra la estructura química de la quitina, se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación de 0.66, es decir, que una de cada tres de sus unidades se encuentra desacetiladas.

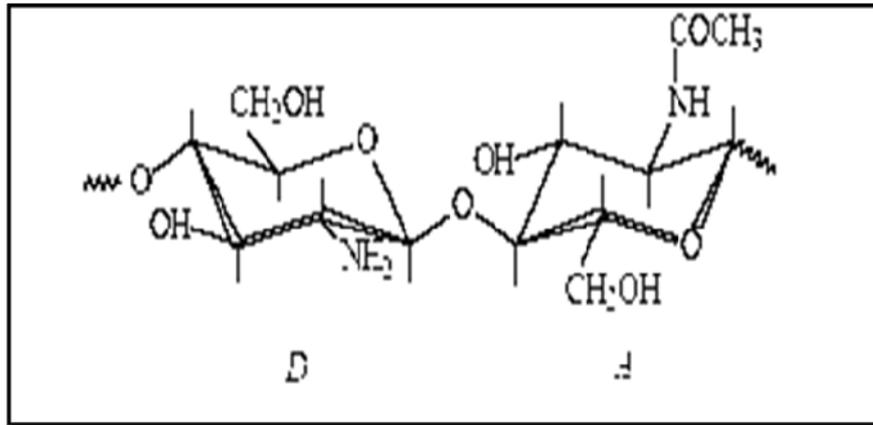


Figura 1. Estructura química de la quitina.

1.2 Métodos de Obtención

La quitina comercial se extrae a partir de desechos de crustáceos de la industria pesquera, siendo las principales fuentes los caparazones de cangrejo, camarón, langostino y langosta.

Las técnicas de extracción reportadas son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente, la composición del material de partida varía notablemente de una especie a otra.

1.2.1 Método enzimático

En la actualidad se investigan tratamientos enzimáticos como una alternativa promisorio. A tal efecto se han reportado procesos que utilizan extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas, pero aún sin la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico (Beaney, *et al.*, 2005).

1.2.2 Método químico

Los métodos químicos han sido el principal proceso de obtención de la quitina por muchos años, sin embargo, la tendencia a fomentar la aplicación de tecnologías limpias han generado la necesidad de obtener estos compuestos mediante el empleo de procesos biotecnológicos ya sea empleando a los microorganismos productores de quitinasas o el uso de las enzimas parcialmente purificadas.

La mayor parte de las técnicas desarrolladas descansan en procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. Algunos incluyen un paso de decoloración de la quitina extraída, mediante una extracción con solvente o la oxidación de los pigmentos remanentes. Estos métodos utilizan generalmente grandes cantidades de agua y energía, y con frecuencia dan lugar a desechos corrosivos.

A continuación se mencionan las etapas del método químico para la obtención de la quitina:

- Acondicionamiento de la materia prima

Consiste en el lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismos. Posteriormente se procede a su molienda hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros (Roberts, 1992).

- Desproteínización

El procedimiento utilizados con mayor frecuencia para desproteínizar consiste en tratar los caparazones de los crustáceos con una solución acuosa diluida de NaOH a temperatura de (65-100°C), con el fin de disolver la proteína.

El tiempo de tratamiento suele variar entre 0.5 y 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos. Hay que tener en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero (Roberts, 1992).

- Desmineralización

El principal componente inorgánico de los caparazones de los crustáceos es el CaCO_3 , el cual se suele eliminar empleando soluciones diluidas de HCl (hasta 10%) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos (HNO_3) (Austin, *et al.*, 1981).

- Decoloración

La coloración de los caparazones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como la astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β -caroteno.

Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes (No, *et al.*, 1997).

También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H_2O_2 (0.5-3%) y el NaClO (0.32%), aunque debe tenerse presente que éstos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero.

En caparazones fuertemente coloreados, como el de la langosta común, se ha reportado la utilización exitosa de tratamientos con mezclas de acetona y NaOCl a temperatura ambiente (Acosta, *et al.*, 1993).

1.3 Usos y aplicaciones

La quitina es muy eficaz en la disminución de tensión arterial, triglicérido y colesterol en sangre.

Debido a que la quitina es un polisacárido biodegradable y no tóxico, puede ser empleado como anti-infeccioso, anti-tumoral, bacteriostático, fungistático y anti-absorbente (Mayer, 1989).

Ofrece consistencia a alimentos procesados, atrapa grasa, es bactericida y sirve como envoltura biodegradable, entre otros beneficios, la quitina está involucrada en la protección de varias especies.

2. Quitosán

El quitosán es un polisacárido natural obtenido por desacetilación de la quitina. La reacción de desacetilación, involucra la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2 dando lugar a un grupo amino en esa posición se produce cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado y a temperaturas superiores a 60°C.

El quitosán, el cual es renovable, no tóxico, biodegradable y ampliamente disponible en el exoesqueleto de los crustáceos y de insectos (Qin *et al.*, 2002) y que se encuentra en estado natural en las paredes de algunos hongos, pero siendo principalmente producido por la hidrólisis de la quitina en medio alcalino (hidróxido de sodio o de potasio al 50 %) a altas temperaturas por varias horas (Choi, *et al.*, 1999).

2.1 Composición química

El quitosán está constituido por residuos 2-acetoamido-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (GlcNAc) y 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (GlcN) unidos por enlaces glucosídicos β(1-4).

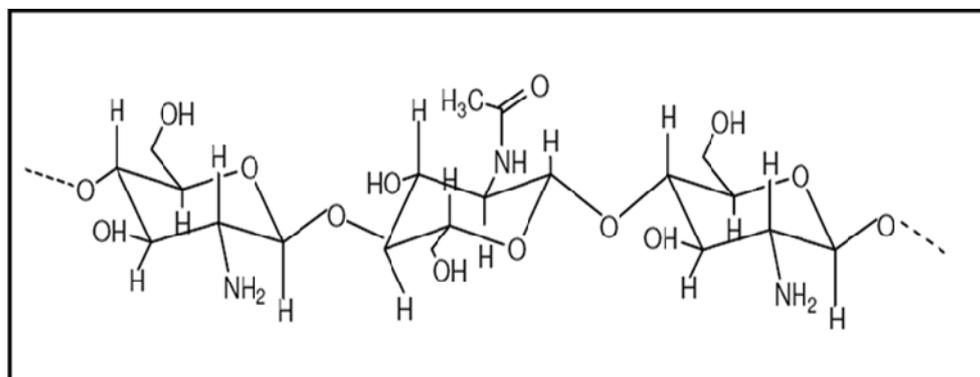


Figura 2.

Estructura química del quitosán

2.2 Métodos de obtención

La obtención del quitosán se produce por desacetilación de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos o enzimáticos.

2.2.1 Método químico

Este proceso, se puede llevar a cabo de dos formas, homogéneo y heterogéneo. La desacetilación homogénea comienza con un pre tratamiento de hinchamiento y la eventual disolución completa de la quitina en frío ($\sim 0^{\circ}\text{C}$) mediante la utilización de la

quitina en NaOH en una proporción de 1:10 (p/p).

Luego se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la del ambiente durante períodos largos de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena (Goycoolea, *et al.*, 2004) y que el ataque a los grupos amida sea más uniforme.

La desacetilación heterogénea, se lleva a cabo en soluciones acuosas concentradas de bases como hidróxido de sodio o de potasio, bajo condiciones severas ($100\text{-}160^{\circ}\text{C}$). Las condiciones en las que se lleva a cabo la desacetilación heterogénea pueden reducir la longitud de la cadena por lo que es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo y aislando el producto en cada etapa (Mima, *et al.*, 1983). Para disminuir la pérdida de peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante (Domard, *et al.*, 1983).

2.2.2 Método enzimático

Otro método para obtener quitosán es la utilización de enzimas. La principal ventaja de este método respecto al químico es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, lo cual es muy apreciado para aplicaciones biomédicas.

La quitina desacetilasa es el enzima que cataliza la conversión de quitina a quitosán por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. La limitación de este método es que el enzima no es muy efectivo en la desacetilación de quitina insoluble y por lo tanto es necesario un pretratamiento (Domard, *et al.*, 1983).

2.3 Propiedades

En la tabla 1 se presentan algunas propiedades físicas y químicas, donde existe variación considerable debido a la utilización de diferentes métodos.

Tabla 1. Caracterización del quitosán

ESPECIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Nitrógeno (%)	7.06-7.63	Bough <i>et al.</i> , (1978)
	7.80 ^a 7.88 ^a	Wu and Bough (1978)
	7.74-7.97	No <i>et al.</i> , (1989)
Ceniza (%)	< 1	Bough <i>et al.</i> , (1978)
	<0.01	Okafor, (1965)
Color (%)	blanco	Wu and Bough (1978)
	rosa-blanco	Bough <i>et al.</i> , (1978)
	textura	Wu and Bough (1978)
Peso molecular	> 5.0 x 10 ⁵	Anderson <i>et al.</i> ,(1978)
	0.7-1.5 x 10 ⁶	Brzeski (1982)
	0.12-0.03 x 10 ⁶	Shahidi <i>et al.</i> , (1991)

2.4 Usos

El quitosán posee las siguientes propiedades funcionales: formación de películas, capacidad de gelificación, adsorción de metales, adsorción de células y proteínas, y puede reaccionar con péptidos o proteínas.

2.4.1 Formación de películas

El quitosán tiene la capacidad de formar películas con buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad (Muzzarelli, 1977). Las propiedades mecánicas de las películas de quitosán dependen del peso molecular de la muestra, de su grado de

cristalinidad y del contenido de humedad de las mismas (Samuels, 1981). Además, presentan una excelente adhesión a diferentes tipos de superficies y una buena elasticidad.

2.4.2 Absorción de agua

Las películas de quitosán se hinchan en contacto con el agua debido a la presencia de grupos hidroxilo y amino en su estructura. El índice de hinchamiento depende del peso molecular y grado de desacetilación del polímero (Wan *et al.*, 2003). El índice de hinchamiento es mayor cuanto mayor es el peso molecular, no obstante con el grado de desacetilación se observa la tendencia contraria, disminuye al aumentar el grado de desacetilación. Cabría esperar un aumento en el índice de hinchamiento al aumentar el grado de desacetilación ya que el contenido del grupo amino sería mayor.

Este comportamiento podría ser debido a que los puentes de hidrógeno intramoleculares que se establecen entre los grupos hidroxilo y los grupos amino son mucho más fuertes que los que se establecen entre estos grupos polares y el agua.

2.4.3 Interacción con péptidos o proteínas

El conocimiento sobre el papel de las interacciones proteína-polisacárido es aún limitado. La distinción más importante que puede hacerse es entre interacciones covalentes y no covalentes (Kato, 2002).

2.4.4 Propiedades biológicas

El quitosán es un polímero natural, no tóxico y biodegradable. Además puede actuar como agente reductor del colesterol y como estimulante del sistema inmunológico (Muzzarelli, 1977).

2.4.5 Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana del quitosán dependerá de factores como el tipo de quitosán (grado de desacetilación, peso molecular), del pH del medio, de la temperatura, etc.

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de la actividad antimicrobiana del quitosán. La más plausible es un cambio en la permeabilidad de la célula debido a las

interacciones entre el quitosán que es policatiónico y las cargas electronegativas de la superficie de la célula (Devlieghere, 2004).

El quitosán es capaz de inhibir algunas bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio spp.* y *Salmonella typhimurium*.

Debido a que es una macromolécula no puede atravesar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, ya que esta membrana actúa como una barrera contra las macromoléculas (Nikaido, 1996).

2.5 Aplicaciones

Tiene diferentes aplicaciones en la industria de las cuales a continuación se mencionan en diferentes áreas:

2.5.1 Medicina y farmacia

El quitosán es un polímero biodegradable, no-tóxico y mucoadhesivo, lo que la hace atractiva para aplicaciones en medicina y farmacia.

También es un buen hemostático, pero sus derivados sulfatados exhiben actividad anticoagulante. Se sabe que el quitosán es hipocolesterolemico e hipolipidémico (Sugano, *et al.*, 1980), posee actividad antimicrobiana (Kim, *et al.*, 2003), antiviral (Ishihara, *et al.*, 1993), y antitumoral (Qin, *et al.*, 2002).

En la biomedicina se ha utilizado como hilos de sutura, esponjas y vendas biodegradables, matrices (en microesferas, microcápsulas, membranas y tabletas comprimidas) para dosificación de fármacos, en ortopedia y en estomatología.

2.5.2 Agricultura y ganadería

En la agricultura moderna se hace cada vez más generalizado el uso de polímeros naturales biodegradables, tanto asociados a composiciones de fertilizantes como a preparados protectores de semillas y plantas, con el fin de lograr incrementar los rendimientos de los cultivos.

El quitosán ha sido utilizado en el recubrimiento de cereales, dando como resultado un incremento en la productividad de los cultivos. Aparentemente provoca una respuesta en la semilla, protegiendo a la planta de infecciones de hongos fitopatógenos que tienen quitina en su pared celular.

El efecto antifúngico del quitosán se ha demostrado en varios experimentos, esto puede estar dado por la inducción de enzimas quitinasas durante la germinación.

Otra potencial aplicación del quitosán en la agricultura está en la encapsulación de embriones somáticos para preparar semillas artificiales (Hidalgo, *et al.*, 1996).

2.5.3 Industria textil

La utilización del quitosán está cada vez más presente en el sector textil. Existen tres formas de aplicación: a) producción de fibras, b) auxiliar textil, y c) aplicado en procesos de acabado lo que mejora propiedades de fibras naturales como lana y algodón (Hudson y Cuculo, 1980). También es aplicado para la adsorción de colorantes, estabilizador de color.

2.5.4 Industria alimentaria

Se ha empleado como películas antimicrobianas, aditivo en alimentos, clarificación de jugos y vinos, soporte para inmovilización en la producción de maltosa, espesante en alimentos, agente de acción controlada, agente conservador (Lárez, 2003).

El quitosán es usado en la industria alimentaria, particularmente en Japón, formulado en galletas, productos avinagrados y fideos debido a su acción hipocolesterolémica.

También se emplea como conservante de los zumos de frutas, como película con propiedades antimicrobianas para cubrir frutas (El-Ghaouth, *et al.*, 1991; Jiang y Li, 2001), clarificación de zumos de frutas (Soto-Peralta, *et al.*, 1989).

2.5.5 Cosmética

En la industria cosmética se aplica en la elaboración de espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo, lociones, tratamiento para el cabello.

3. Oligosacáridos

Los oligosacáridos de quitosán son los azúcares aminados con la unidad estructural básica de N-acetyl-B-D-glucosamina, (Tamai, *et al.*, 2003).

Los oligosacáridos de quitosán han recibido una gran atención debido a que tiene una variedad de actividades biológicas, tales como efectos inhibitorios en el crecimiento de bacterias y hongos, efectos inmunopotenciadores (Qin, *et al.*, 2002).

La longitud de la cadena, el grado de desacetilación y el peso molecular de los oligosacáridos de quitosán están considerados como los factores más importantes que influencian las actividades biológicas. Además para que sean eficientemente absorbidos por el cuerpo deben ser de bajo peso molecular (Choi, *et al.*, 1999).

3.1 Propiedades

En los últimos años, ha habido un aumento firme en la demanda de la quitina y sus derivados para las varias aplicaciones industriales, clínicas, y farmacéuticas. Se ha mostrado que los oligosacáridos y sus derivados se utilizan para promover el crecimiento de bifidobacteria, inhiben el crecimiento microbiano, antitumoral (Austin, *et al.*, 1981), estas aplicaciones médicas le han dado valor agregado a esta materia prima, normalmente se produce por el hidrolisis parcial de la quitina o quitosán con los ácidos concentrados, seguidos por la separación de cromatografía de columna. El proceso es intensivo y no es muy costoso.

En los últimos años ha llamado la atención a los biotecnólogos para desarrollar un proceso enzimático para la producción de oligosacáridos (Muraio, *et al.*, 1992)

Los oligosacáridos de quitosán tienen muchas actividades biológicas, tal como en el crecimiento de la planta y desarrollo de resistencia a hongos sirviendo como un uso

práctico en la agricultura, industria alimentaria, y los campos médicos (Agulló, *et al.*, 2003; Karasuda, *et al.*, 2003).

Adicionalmente, tienen menos viscosidad, bajo peso molecular y longitudes de cadena cortas y son solubles en soluciones acuosas neutrales. Además de que son más fáciles de absorber in vivo (Jeon, *et al.*, 2001).

Se ha evaluado la capacidad de los oligosacáridos de quitosán para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos en tortillas de maíz (*Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp) (Loredo, 2004).

3.2 Obtención

A lo largo del tiempo los métodos de obtención de los oligosacáridos han sido documentados tales como: el empleo de enzimas, como las celulasas (Joo, 2002), quitosanasas. El empleo del método químico utiliza varios ácidos para la hidrólisis del quitosán obteniendo los oligosacáridos de quitosán de bajo peso molecular.

También se han usado varios agentes oxidantes para las degradaciones, pero la mayoría de ellos son reactivos tóxicos. Por esto el proceso enzimático parece ser preferido generalmente a las reacciones químicas debido a que el curso de la reacción se lleva a cabo bajo condiciones suaves y la distribución del producto puede ser controlada mejor, a pesar de la rapidez de la reacción química (Qin, *et al.*, 2002). También se emplean métodos físicos como ultrafiltración.

Se ha reportado la obtención de oligosacáridos de quitosán con un peso molecular mayor a 10 kDa en tiempos de reacción de hasta 24 horas, empleando una quitosanasa purificada comercial (Charles-Rodríguez, 2008) menciona que el porcentaje de hidrólisis está relacionado directamente con la disminución de la viscosidad del sustrato.

El tiempo de reacción entre la enzima y sustrato es fundamental para la obtención de los oligosacáridos de diferentes pesos moleculares.

Se ha evaluado el método de obtención de oligosacáridos de quitosán por vía enzimática. El quitosán (5%, p/v) sometido a una depolimerización por una quitosanasa bacteriana comercial de tipo endo a diferentes tiempos de reacción (2, 4, 8, 14 y 24 h) en solución amortiguadora de ácido acéticoacetato de sodio (1M, pH 5). A las soluciones se les inactivó la enzima calentando para posteriormente filtrar y dializar en agua destilada para eliminar la solución amortiguadora. A los extractos enzimáticos se les determinó su

solubilidad en agua, azúcares reductores y totales y fueron sometidos a la acción de una enzima exo para determinar el grado de polimerización (Loredo, 2004).

4. Enzimas

Para iniciar el capítulo sobre las enzimas quitosanasas de la presente investigación se describen en principio algunos conceptos básicos sobre las enzimas en general.

4.1 Generalidades

La palabra enzima se deriva del griego y significa “en la levadura”, siendo usada por primera vez en 1878 por Kuhne. El término se aplicó comúnmente a extractos de microorganismos.

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los microorganismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por una enzima en particular, por lo tanto, en una célula se encuentra un gran número de enzimas. Son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Aceleran las reacciones bioquímicas en relación con reacciones no catalizadas a temperaturas alrededor de 37°C (Prado, *et. al*, 1999).

Tres son las principales características que hacen notables a las enzimas sobre otros catalizadores: el poder catalítico, su especificidad y la capacidad para regular su capacidad catalítica por una variedad de compuestos naturales.

La segunda característica importante de la actividad enzimática es la especificidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Muchas enzimas son específicas tanto en la naturaleza del sustrato que utilizan, como en la reacción que catalizan. Esta especificidad enzimática permite modificar selectivamente componentes alimentarios individuales.

La tercera característica de las enzimas es que su actividad catalítica puede ser regulada por pequeños iones u otras moléculas.

4.2 Factores que afectan la actividad enzimática

Debido a la naturaleza proteica las enzimas se puede afectar su actividad y estructura por factores que afectan a las demás proteínas, entre los que cabe destacar: el pH y la temperatura.

4.2.1 Efecto del pH

Tanto en la transformación del sustrato en producto (proceso catalítico), como en la fijación del sustrato al sitio activo de la enzima, intervienen grupos con carácter ácido base, por este motivo el pH del medio afecta a la actividad de la gran mayoría de las enzimas. De hecho la mayoría de las enzimas sólo son activos en un estrecho intervalo de pH. Por arriba o por debajo de este intervalo de pH, la actividad disminuye.

La desnaturalización de la enzima es otro factor que influye en la pérdida de actividad a pH extremos, puesto que la estabilidad de la enzima se debe, en gran medida, a la presencia de puentes de hidrógeno entre los diferentes grupos de la proteína. El aumento o disminución del pH afecta al estado de protonación, y por tanto a su capacidad para formar puentes de hidrógeno (Voet, 1990).

4.2.2 Efecto de la temperatura

En general cuando se estudia la velocidad de una reacción química en función de la temperatura y en ausencia de una enzima, se observa un incremento de la velocidad conforme se aumenta la temperatura. En cambio, cuando la reacción está catalizada por una enzima, se observa una fase ascendente en la actividad, seguida de un máximo y de una última fase en la que la actividad se pierde.

Conforme la temperatura va aumentando, la energía térmica de la cadena polipeptídica se incrementa y comienza a predominar sobre las fuerzas que mantienen la estructura nativa del enzima. En estas condiciones la proteína se desnaturaliza y la actividad se pierde (Voet, 1990).

4.3 Cinética enzimática

La catálisis enzimática comienza con la combinación de una enzima (E) con una molécula de sustrato (S) para formar un complejo ES ($E+S \rightarrow ES$). La molécula sustrato se une en una región específica de la enzima, denominada sitio activo que es una hendidura en la estructura tridimensional de la enzima donde se lleva a cabo el proceso catalítico.

El sitio activo tiene algunas características particulares que son comunes para la mayoría de las enzimas:

- Exhibe especificidad, es decir, puede discriminar entre diversas moléculas de posibles sustratos. El sitio activo tiene una forma que se asemeja bastante a la del sustrato. El sustrato correcto se ajusta perfectamente en el sitio activo.
- El sitio activo es una región tridimensional relativamente pequeña de la enzima. El sustrato unido, interactúa directamente quizá con no más de tres a cinco residuos de aminoácidos cuando está completamente encajado en el sitio activo.
- Los sustratos son retenidos inicialmente en el sitio activo por fuerzas intermoleculares de carácter débil, interacciones de Van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno que posibilitan que esa unión se pueda romper con facilidad tras la acción enzimática.

La actividad catalítica de algunas enzimas requiere la presencia de compuestos no proteicos llamados cofactores. Los cofactores pueden ser iones metálicos o moléculas orgánicas conocidas como coenzimas. Algunos cofactores, sólo se hallan asociados transitoriamente con la enzima, mientras que otros, conocidos como grupos prostéticos, se hallan asociados de forma permanente. El complejo enzima-cofactor activo catalíticamente se llama holoenzima. La proteína inactiva enzimáticamente que resulta de la separación del cofactor de un holoenzima se designa como apoenzima (Voet, *et al.*, 1990).

En la figura 3 se muestra las reacciones catalizadas donde la enzima [E] y el sustrato [S] forman, en primer lugar, el complejo enzima-sustrato [ES] que, tras la acción enzimática da lugar al producto final [P] y la enzima [E].



Figura 3. Reacción catalítica

Quando se mantiene constante la concentración de un enzima se observa que el aumento en la velocidad de reacción es proporcional al incremento en la concentración del sustrato. Este proceso se mantiene hasta que en cierto momento los incrementos de concentración del sustrato no producen un aumento significativo de la velocidad de reacción.

Decimos que se ha alcanzado la velocidad máxima (V_{\max}) ya que en estas condiciones la enzima está saturada por el sustrato y no puede actuar con mayor rapidez. En la siguiente ecuación se menciona la teoría general de la acción enzimática.

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Donde:

V es la velocidad de reacción

V_{\max} la velocidad máxima de reacción

[S] la concentración de sustrato

K_M la constante de Michaelis-Menten, que representa la concentración de sustrato a la que un enzima alcanza la mitad de la V_{\max} .

La magnitud de K_M varía ampliamente con el enzima y con la naturaleza del sustrato. Es también función de la temperatura y del pH (Voet, *et al.*, 1990).

Esta constante proporciona una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato, a menor K_M mayor afinidad.

5. Quitosanasas

Las quitosanasas (EC 3.2.2.99) representan una clase de enzimas hidrolíticas, son encontradas en bacterias, hongos y plantas (Yoon, *et al.*, 1998). Aparentemente fueron descubiertas simultáneamente por dos grupos de investigación: Monaghan, *et al* (1973) y Ruiz -Herrera y Ramírez-Leon (Fenton y Eveleing, 1981).

La diferencia entre quitosanasas y quitinasa no es clara, ya que ambas enzimas tienen la habilidad por degradar el quitosán de diferentes grados de acetilación (Ohtakara, *et al.*, 1988; Osswald, *et al.*, 1993; 1994).

Las quitosanas atacan preferentemente a polímeros altamente N-acetilados, o bien son más eficientes con quitosán de bajo contenido de grupos de N-acetilados. La mayoría de las bacterias y hongos secretan quitosanas de manera extracelular (Monaghan, *et al.*, 1973), mientras que las plantas secretan quitosanas de manera intracelular (Grenier, 1991) y en hongos *Zygomycetos* (Reyes *et al.*, 1985; Alfonso, *et al.*, 1992).

Se ha reportado en la literatura que las quitosanas son enzimas “endo-acting”, las cuales producen dímeros, trímeros, tetrámeros u oligómeros de quitosán como el producto de una hidrólisis (Nanjo, *et al.*, 1990).

Las quitosanas están clasificadas en varios grupos por su especificidad de sustrato; el primer grupo hidroliza sólo quitosán, el segundo grupo hidroliza tanto al quitosán como carboximetilcelulosa, el tercer grupo hidroliza quitosán y quitina (Yoon, *et al.*, 1998).

En la actualidad, las quitosanas han ganado importancia en el mantenimiento del balance ecológico, además de que han sido utilizadas para determinar el mecanismo de degradación del quitosán a nivel bioquímico y molecular, las quitosanas han sido purificadas de varios microorganismos (Blanchard, 2000).

5.1 Propiedades

Existe heterogeneidad considerable en las propiedades bioquímicas informadas de las quitosanas. Se presentan varias propiedades de quitosanas de diferentes fuentes.

5.1.1 Peso molecular

La mayoría de las quitosanas están caracterizadas por su aparente bajo peso molecular, el cual se encuentran en un rango de 10-50 kDa.

5.1.2 Especificidad del sustrato

Las quitosanas reportadas de varias fuentes se encarga de hidrolizar el quitosán y sus derivados (quitosán glicol, carboximetil quitosán y quitosán coloidal).

Las quitosanas muestran diferencia para los sustratos (Schindler, *et al.*, 1997). Se ha dado como hipótesis que “los cambios evolucionados en la estructura del sustrato pueden influenciar el desarrollo del sitio activo de la lisozima así que este podría funcionar más eficientemente con el sustrato natural particularmente encontrado para cada especie”.

5.1.3 Composición de aminoácidos y glicosilación

No existe mucha información acerca de la composición de aminoácidos y glicosilación de varias quitosanasas, sin embargo, se conocen las quitosanasas de *Myxobacter* AL-1 y *Streptomyces* sp. No 6 contiene grandes cantidades de aminoácidos básicos como lisina y arginina (Hedges, 1974; Price, 1975). Se han encontrado residuos libres de cisteína en las quitosanasas de *Penicillium islandicum* y *Streptomyces* sp. No 6 (Price Storck, 1975).

5.1.4 Influencia del pH y temperatura

Se ha reportado que el pH y temperatura de la actividad quitosanasasa se encuentra en el rango de 4.0-8.0 y 30-70 °C, respectivamente (Somashekar, 1996).

Los puntos isoeléctricos de las quitosanasas de varios microorganismos van de 4.0-10.1

5.1.5 Activadores e inhibidores de las quitosanasas

Shimosaka en 1993, reporta que la quitosanasasa producida por *F. solani* no fue inhibida o estimulada por diversos iones metálicos y aminoácidos. Sin embargo, las isoformas de diversas quitosanasas obtenidas de varias especies de plantas, fueron inhibidas por 2-mercatoetanol en una muestra de búffer antes de hacer una prueba de SDS-PAGE (Tabla 2).

Tabla 2. Activadores e inhibidores de quitosanasas

FUENTE DE QUITOSANASA	INHIBIDORES	ACTIVADORES
<i>Myxobacter</i> AL-1	Ag ⁺² , Hg ⁺² , Cd ⁺² , Zn ⁺²	—
<i>Bacillus</i> sp. R-4	Hg ⁺² , Zn ⁺² , Fe ⁺² , Ni ⁺² pCMB, Monoidoacetato	EDTA
<i>Bacillus</i> sp. PI-7S	Ag, Hg, pCMB	—
<i>Streptomyces griseus</i>	Ag ⁺² , Hg ⁺² , Fe ⁺² , Cu ⁺² , pCMB	—
<i>Amycolatopsis</i> sp CsO-2	Hg ⁺² , pCMB, NBS	—
<i>Rhodotorula gracilis</i>	Hg ⁺² , Cu ⁺² , PCMB NBS	Mn ⁺²
<i>Mucor rouxii</i> * Ch-A	Hg ⁺² , Mn ⁺² , Cu ⁺² , Pb ⁺² , Sn ⁺² , CH ₃ COO ⁻	K ⁺
<i>Mucor rouxii</i> * Ch-B	Hg ⁺² , Mn ⁺² , Cu ⁺² , Pb ⁺² , Sn ⁺²	Ca ⁺²
<i>Penicillum islandicum</i>	Hg ⁺² , Cu ⁺²	Ca ⁺²

Fuente: Somashekar *et al.*, 1996.

5.1.6 Modo de acción

La mayoría de las quitosanas reportadas hasta ahora, parece que tienen una naturaleza de tipo endo, liberando predominantemente una mezcla de dímeros, trímeros, y oligómeros de quitosán (Tabla 3). Al parecer el nivel de acetilación en el quitosán influencia el grado de hidrólisis por las diferentes enzimas (Yabuki, *et al.*, 1988).

Tabla 3. Modo de acción de la quitosanas.

FUENTE	NIVEL DE ACETILACIÓN DEL SUSTRATO QUITOSAN (%)		MODO DE ACCIÓN DE LA ENZIMA	REFERENCIA
	Rango de acetilación para	óptima actividad		
<i>Streptomyces N-174</i>	1-60	1-21	ND	Boucher et al. (1992)
<i>Nocardia orientalis</i>	0-41	30	GlcN o GlcNAc	Saki et al. (1991)
<i>Bacillus</i> sp. No 7-M	1	ND	GlcN- GlcN	Uchida y Ohtakara(1988)
<i>Bacillus circulans</i>	0-60	20	ND	Davis y Eveleigh(1984)
<i>Bacillus</i> sp. PI-7S	0-70	1	ND	Seino et al. (1991)

<i>Bacillus pumilus</i>	25-35	ND	GlcN- GlcN	Fukamizo et al. (1994)
<i>Pseudomonas</i> sp. H-14	0-38	0	ND	Yoshihara et al. (1993)
<i>Enterobacter</i> sp. G-1	20	20	GlcNAc- GlcNAc	Yamasaki et al. (1993)
<i>Penicillium islandicum</i>	0-80	30-60	GlcNAc- GlcN	Fenton (1981)
<i>Fusarium solani</i> f. sp.	0 y 30	30	ND	Shimosaka et al. (1993)
<i>Mucor rouxii</i>	18,31 y 39	39	ND	Alfonso et al. (1992)
<i>Amycolatopsis</i> sp. CsO-2	0-30	0	ND	Okajima et al. (1994)
<i>Citrus sinensis</i>	0-20	18-20	ND	Osswald et al. (1994)
	la actividad de la enzima	de la enzima		

ND: no está determinado

Fuente: Somashekar *et al.*, 1996

5.2 Usos y aplicaciones

Las quitosanasas pueden ser usadas para propósitos nutricionales por microorganismos que crecen en sustratos que contienen quitina o quitosán (Price y Storck, 1975). Dichas enzimas encuentran aplicación en la generación de oligómeros de quitosán de peso específico. Las quitosanasas han sido usadas para la generación de protoplastos fúngicos para estudios básicos.

También se usan para la preparación de oligosacáridos de quitosán, los cuales poseen propiedades biológicas (Conrath, *et al.*, 1989., Kauss, *et al.*, 1989), inmunopotenciación e inhibición del crecimiento de patógenos de plantas.

En varias especies de plantas se excretan quitosanasas, las cuales proveen un sistema de defensa contra reacciones de ataques por hongos patógenos, (Nogawa, *et al.*, 1997).

Algunos autores han considerado a las quitosanasas para estudios taxonómicos de hongos, caracterización de las paredes celulares de hongos y la patogénesis de algún hongo, planta o animal (Hedges y Wolfe, 1974;., Price y Storck, 1975).

Aparte de la aplicación de las quitosanasas, el propio quitosán como sustrato tiene numerosas aplicaciones en los campos de agricultura, industria alimentaria y las industrias farmacéuticas (Sandford, 1989).

6. Microorganismos

6.1 Definición

Los microorganismos son seres vivos de tamaño muy pequeño de aproximadamente un micrómetro, debido a su poco peso pueden difundirse con facilidad por corrientes de aire, estos pueden vivir aislados o en colonias.

Los microorganismos pueden ser clasificados como Gram negativo o positivo de acuerdo a la capacidad de los compuestos de la membrana celular para reaccionar con las cargas de los colorantes, ácidos o básicos, a continuación describen los dos grupos:

6.2 Gram negativos

Las células pueden ser esféricas, o en forma de bacilos filamentosos. La reproducción celular se da generalmente por fisión binaria; algunas producen esporas como forma resistente. Son procariotas no fotosintéticas; son quimiosintéticas

heterótrofas que incluyen a las aerobias, anaerobias facultativas y microaerófilas (Bergey, 2000).

6.3 Gram positivos

Son células que contienen una capa delgada de péptidoglicano (contiene ácido murámico, presente en todas las bacterias). Las formas de las bacterias puede ser ovalada, esférica, bacilos lineales o curvos helicoidales ó filamentosos; algunas de estas formas puede ser encapsuladas. Su reproducción se lleva a cabo por fisión binaria (Bergey, 2009).

6.4 Microorganismos marinos

Los microorganismos de origen marino son muy fáciles de cultivar, identificar, y procesar, ellos son de interés para los investigadores a nivel mundial. La naturaleza simbiótica (los microorganismos se les asocia con varias esponjas marinas, corales, y otras especies) y su presencia en los ambientes extremos (extremófilos) como los ventos hidrotérmicos también han sido áreas de reciente investigación.

6.5 Extremófilos

La biodiversidad microbiana en la industria de la biotecnología, reconoció a enzimas termófilas que soportan temperaturas de 350-400 °C se comportan como moléculas de proteína estables.

Microorganismos hipertermófilos aislados de agua y de profundidades del mar como *Pyrococcus* sp. y *Thermococcus* sp. han sido caracterizados mediante la producción de enzimas hidrolíticas termoestables por su potencial área de aplicaciones (Francesco, 2002).

6.6 Microorganismos marinos simbióticos

Una proteasa bacteriana se aisló de un gusano marino y se probó las formulaciones para un limpiador (Greene, *et al.*, 1995). Se han encontrado bacterias que crecen en las ballenas, esta es una fuente rica de lipasas y esterases, dos clases de importantes

enzimas para la industria (Wells, 1999). Microorganismos marinos sobreviven en simbiosis de manera extracelular e intracelular.

7. Género *Aeromonas* sp

Único género de la familia *Aeromonadaceae*, establecido en 1986. Su clasificación taxonómica sigue siendo confusa. Los miembros de este género son anaerobio facultativo y Gram negativo. Son oxidasa y catalasa positivo, reducen de nitratos a nitritos, fermentan la D-glucosa y los carbohidratos. Son bacilos o cocobacilos, crecen entre 10 °C y 42 °C, con pH 4.5 hasta 9 y resisten a concentraciones de sal entre 0 a 4 %. En general son resistentes al factor vibrio estático O/129. Habitan en aguas, todas con baja concentración salina, en diversos productos frescos: carnes, leche helados.

Otra de las características de *Aeromonas* sp. es la producción y secreción de enzimas de manera extracelular esto se asocia por su patogenicidad y adaptabilidad al medio ambiente. Entre las enzimas encontramos L-lactasas, lipasas, enterotoxinas, proteasas, quitinasas, nucleasas y amilasas.

7.1 Especies

Aeromonas hydrophila complejo de *Aeromonas. caviae* y *Aeromonas. veronii* bv. *sobria*.

7.2 Enzimas secretadas por *Aeromonas* sp.

Las quitinasas (EC 3.2.1.14), estas enzimas se han detectado en una variedad de organismos incluyendo algunos que no contienen quitina como un componente estructural, como las bacterias, plantas y animales.

La producción de las quitinasas por plantas se cree que participan en las reacciones de defensa contra los agentes patógenos que contiene quitina.

Las quitinasas utilizan en su asimilación a la quitina como fuente de carbono y nitrógeno, y estas enzimas juegan un papel ecológico importante en la degradación de la quitina.

Numerosas quitinasas se han caracterizado y los genes correspondientes han sido analizados sobre la base de las estructuras primarias y secundarias de los dominios catalíticos, se agrupan en dos familias 18 y 19 en la clasificación de la glicosil hidrolasa (Ohno, *et al.*, 1996).

Se ha reportado la caracterización extracelular de la enzima quitinasa excretada por *A. hydrophila* JP101, cuando esta bacteria es inducida con quitina, y es codificada por ORF de 2.598 pb para la codificación de 865 aminoácidos (Wu, *et al.*, 2001).

En estudios anteriores el gen de Chi92 de *Aeromonas hydrophila* JP101 es clonado y expresado en *E.coli* (Chen, *et al.*, 1991). La forma madura de Chi92 es una enzima modular de 842 aminoácidos (89.830- kDa).

Se ha usado la quitina para la degradación de productos, GlcNAc y oligosacaridos de quitosán, ampliamente utilizado en la industria alimentaria, medicina y agricultura (Jung, *et al.*, 2003). Tradicionalmente, GlcNAc y oligomeros de quitosán han sido producidos por la hidrolisis ácida de la quitina (Capon y Foster, 1970).

Este proceso químico es costoso y produce efluentes indeseables que es de preocupación medioambiental. Por consiguiente, mucha atención se ha enfocado en la hidrolisis enzimática de quitina que podría minimizar estos efluentes (Sashiwa, *et al.*, 2002).

En un estudio realizado para desarrollar los métodos biológicos para la preparación de N-acetyl-D-glucosamine y diacetilquitobiosa como una alternativa al tratamiento químico, se describió la producción selectiva y eficaz de GlcNAc y GlcNAc2 usando la preparación de la enzima cruda de una bacteria aislada, *Aeromonas* sp. PA8. PA8 GJ-18 mostró la actividad quitinolítica fuerte.

Aeromonas J-5003, produce dos enzimas de actividad quitinolítica: la quitinasa y quitobiasa. Para la producción de quitinasa, los componentes mayores de medio fueron quitina coloidal 0.5%, glucosa 0.2%, levadura 0.25% y peptona 0.25%, mientras para la producción de quitobiasa, se uso quitina coloidal 0.5%, galactosa y triptona 0.2%. La temperatura de 30°C, el pH 7.0 para las dos enzimas.

Capítulo III

Materiales y métodos

La parte experimental se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología de la UAdeC y en los laboratorios de Producción Animal de la UAAAN.

El presente trabajo se diseñó en etapas de investigación, para evidenciar la influencia del pH y la temperatura en la producción de una enzima quitosanasa por microorganismos extremófilos, así como determinar los parámetros cinéticos de la actividad de dichas enzimas, a continuación se describen las etapas desarrolladas.

ETAPA I: Estudio cinético del crecimiento microbiano de células de *Aeromonas* sp.

PA8.

1. Cultivar y conservar el microorganismo (*Aeromonas* sp. PA8) en caldo nutritivo.

El microorganismo fue proporcionado por el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, en Saltillo Coahuila, México. *Aeromonas* sp. PA8 se obtuvo de la Poza Azul del valle de Cuatrociénegas, Coahuila, México. Las condiciones que presentó el agua de donde se aisló el microorganismo fueron de pH 7.0 y una temperatura de 32°C. Esta poza se encuentra a 120° 7' 26'' 799'' de longitud y 26° 55' 20'' 764'' de latitud en Cuatrociénegas, Coahuila. Este microorganismo fue identificado y caracterizado por Mauricio-Benavides, *et al.*, en el 2007.

El microorganismo fue cultivado primero en agar nutritivo, se incubó a una temperatura de 37 °C por 24 h, posteriormente se realizó la tinción de Gram para certificar su identidad.

1.1 Preparación de caldo nutritivo

En un matraz Erlenmayer de 250 mL se adicionaron 46 g caldo nutritivo en 200 mL de agua destilada, posteriormente se esterilizó en una autoclave (Presto, 21 L) por 15 minutos a 120 °C.

1.2 Siembra en caldo nutritivo

En 50 mL de caldo nutritivo a pH de 6.0 se añadieron 0.3 mL de suspensión celular de *Aeromonas* sp. PA8, posteriormente se incubó a 37 °C a 150 rpm durante 144 h (Incubadora LAB-LINE), muestreando cada 24 h hasta 164 h.

1.3 Determinación de crecimiento microbiano por el método de turbidez.

El crecimiento microbiano se determinó por el método de turbidez a una longitud de onda de 590 nm, empleando un espectrofotómetro (SPECTRO UNICAM GENESYS 8). Los análisis fueron realizados por triplicado.

1.4 Determinación de proteína celular por el método de Lowry modificado por Peterson.

De la solución obtenida de los 50 mL del caldo nutritivo, se tomó una muestra de 1 mL (suspensión celular diluida) y se le agregó 1 mL de la solución A, se dejó reposar

por 10 minutos, transcurrido el tiempo de reposo, se adicionaron 0.5 mL del reactivo de Folin (1:5), se agitó y se dejó reposar por 30 minutos.

Finalmente se leyó en un espectrofotómetro (SPECTRO UNICAM GENESYS 8) a una longitud de onda de 750 nm. El experimento fue realizado por triplicado y analizado mediante el programa UNL (Statistics, 2008).

La técnica requiere la preparación de los siguientes reactivos:

SOLUCIÓN A: 0.6 g SDS (dodecil sulfato de sodio) disueltos en 18 mL de agua destilada, 6 mL de NaOH 0.8 N, 6 mL de solución B.

SOLUCIÓN B: Disolver 5 mL de Na₂CO₃ (20%), 1mL de CuSO₄·5H₂O (1%), 1mL de Tartrato de Na y K (2%) en 3 mL de agua destilada.

Los resultados fueron convertidos a concentración de proteína mediante el empleo de una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (Tabla 4).

Tabla 4. Curva de calibración de proteínas por el método de Lowry

No. Tubo	Albúmina (12.5 mg/100 ml)	Agua destilada (ml)	Dilución de albúmina (mg/ml)
Blanco	0	1.0	0.00
1	0.1	0.9	1.25 X 10 ⁻²
2	0.2	0.8	2.50 X 10 ⁻²
3	0.3	0.7	3.75 X 10 ⁻²
4	0.4	0.6	5.0 X 10 ⁻²
5	0.5	0.5	6.25 X 10 ⁻²
6	0.6	0.4	7.50 X 10 ⁻²

7	0.7	0.3	8.75×10^{-2}
8	0.8	0.2	1.00×10^{-1}
9	0.9	0.1	1.13×10^{-1}
10	1.0	0	1.25×10^{-1}

Etapas II. Optimización del pH del medio de cultivo para la producción de la quitosanasa.

2.1 Mantenimiento y proliferación de microorganismo

De la cepa previamente identificada *Aeromonas* sp PA8 se sembró en tubos y fueron incubados a una temperatura de 37 °C, posteriormente se realizó una tinción de Gram para su identificación y observación microscópica.

2.2 Preparación del medio de cultivo específico

En un matraz de 250 mL se preparó el medio mineral (Tabla 5), el cual fue esterilizando a 120 °C/15 Lb durante 15 minutos y de manera independiente se filtraron los oligosacáridos de quitosán con membranas de celulosa de 0.45 µm estériles, (MILLER HA, filter unit 0.45 µm).

Tabla 5. Componentes del medio de cultivo específico para la producción de una quitosanasa.

COMPONENTE	CANTIDAD (%)
Cloruro de sodio (NaCl)	0.5
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	0.3
Cloruro de potasio (KCl)	0.5
Oligosacáridos de quitosán	1
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.001

Fuente: Charles-Rodríguez, 2008.

2.3 Siembra en medio de cultivo específico

Se preparó el medio específico de la manera antes señalada y se ajustó el pH con hidróxido de sodio (NaOH). Se probaron los pH's de 6.0, 7.0 y 8.0, posteriormente se inocularon 0.5 mL de suspensión celular, y finalmente se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h de fermentación.

2.4 Determinación de crecimiento microbiano por el método de turbidez (ver metodología 1.3)

2.5 Determinación de proteína celular en medio específico por el método de Lowry modificado por Peterson (ver metodología 1.4)

2.6 Determinación de proteína extracelular

Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 25 minutos, el sobrenadante fue separado para la determinación de la proteína mediante el método de Lowry modificado por Peterson, leyendo a una longitud de onda de 750 nm, siguiendo la metodología 1.4.

ETAPA III: Optimización de la temperatura (32°, 37° y 42°C) de incubación para la producción de la quitosanasasa extracelular.

3. Mantenimiento y proliferación de microorganismo

De la cepa previamente identificada *Aeromonas* sp PA8 se sembró en tubos y fueron encubados a una temperatura de 37 °C, posteriormente se llevó a cabo una tinción de Gram para su identificación.

3.1 Preparación del medio de cultivo específico

En un matraz de 250 mL se preparó el medio mineral (tabla 4) a un pH de 7.0. El medio fue esterilizando a 120 °C/15 Lb durante 15 minutos y de manera independiente se filtraron los oligosacáridos de quitosán con membranas de celulosa estériles de 0.45 µm (MILLER HA, filter unit 0.45 µm).

3.2 Siembra en medio de cultivo específico

En 100 mL del medio de cultivo se inocularon 0.5 mL de suspensión celular, los cuales fueron incubados a temperaturas de 32°, 37° y, 42°C, con una agitación de 150 rpm (INCUBADORA LAB-LINE). La cinética fue monitoreada cada 24 h por un tiempo de 168 h de fermentación.

3.3 Determinación de crecimiento microbiano por el método de turbidez.

El crecimiento microbiano se llevo a cabo mediante el método del turbidez (Ver metodología 1.3 de la Etapa I).

3.4 Determinación de proteína celular en medio específico por el método de Lowry modificado por Peterson.

La determinación de proteína celular se llevo a cabo mediante el método de Lowry modificado por Peterson (ver metodología 1.4 de la Etapa I).

3.5 Determinación de proteína extracelular

La determinación de proteína extracelular se llevó a cabo mediante el método de Lowry modificado por Peterson (ver metodología 1.5 etapa II).

ETAPA IV: Estudio de actividad enzimática del extracto obtenido, mediante cinéticas de viscosidad y/o liberación de azúcares reductores.

De las muestras recolectadas a las diferentes temperaturas (32°, 37° y, 42 °C) y pH's (6.0, 7.0 y 8.0) se emplearon para la determinación de actividad quitosanasasa

mediante la técnica de azúcares reductores propuesta por Somogy (1952) y Nelson (1944).

4.1 Cinética enzimática

En tubos se colocaron 240 µl de sustrato (quitosán), adicionando 10 µl del extracto enzimático (quitosanasa) obtenido a los diferentes tiempos de fermentación, se incubó a 40 °C deteniendo la reacción con 240 µl del reactivo de Somogy. La cinética se monitoreó por los tiempos 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 min. Una unidad de actividad quitosanasa (U) se define como la cantidad de azúcares reductores liberados en mg/mg de proteína en 60 minutos a 40°C empleando quitosán al 2%.

4.2 Cuantificación de la actividad enzimática

La actividad quitosanasa se monitoreó mediante la liberación de azúcares reductores. La técnica consiste en adicionar 10 µl de muestra y 250 µl de reactivo 1 (Somogy), posteriormente se encubaron en baño María durante 10 min. Se retiró del baño María y se dejó reposar a temperatura ambiente, en seguida, se agregaron 250 µl del reactivo 2 (Nelson) y se agitó, se adicionaron 4 mL de agua destilada agitando vigorosamente. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (SPECTRO UNICAM GENESYS 8) a una longitud de onda de 690 nm.

La técnica de Somogy-Nelson requiere la preparación de:

- Reactivo 1 (Somogy):

Solución A: 25 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3), 25 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 20 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 200 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4) se disolvieron en agua destilada y se aforó a 1 litro.

Solución B: en 200 mL de agua destilada se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Una vez preparado las dos soluciones se mezcló 1 mL de la solución B en 25 mL de la solución A.

- Reactivo 2 (Nelson):

Solución A: en 450 mL de agua destilada se disolvió 21 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y 25 g de molibdato de amonio ($(\text{CNH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Solución B: 3 g de arsenito de sodio pentahidratado ($\text{NaHASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

El reactivo de Nelson se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforó a 500 mL. Posteriormente se calentó a 55 °C durante 30 min.

Para transformar la absorbancia en concentración se empleó una curva patrón empleando glucosa a 500 ppm como estándar (Tabla 6).

Tabla 6. Curva de calibración de glucosa 500 ppm para azúcares reductores

Ppm	μl Glucosa	μl agua	Absorbancia
0	0	250	0
50	25	225	0.13
100	5	200	0.255
150	75	175	0.48
200	100	150	0.667
300	150	100	1.001

Resultados y Discusión

Etapas I. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células de *Aeromonas* sp. PA8.

1. Cultivo y conservación del microorganismo (*Aeromonas* sp. PA8)

Se realizó una tinción de Gram del microorganismo proporcionado y al observar la morfología microscópica se pudo notar que la cepa se tiñó de color rojo-rosa (Figura 4), lo cual nos indica que es un microorganismo Gram negativo, las paredes de este microorganismo son más delgadas y con mayor cantidad de lípidos en comparación con las bacterias Gram positivas. La morfología microscópica demostró que se trata de un microorganismo en forma de bacilo alargado. Los microorganismos de este género son bacterias anaerobias facultativas, oxidasa y catalasa positivas. Presentan un metabolismo capaz de reducir los nitratos a nitritos, fermentan la D-glucosa y los carbohidratos, además de que poseen un flagelo polar (Bergey, 2000).

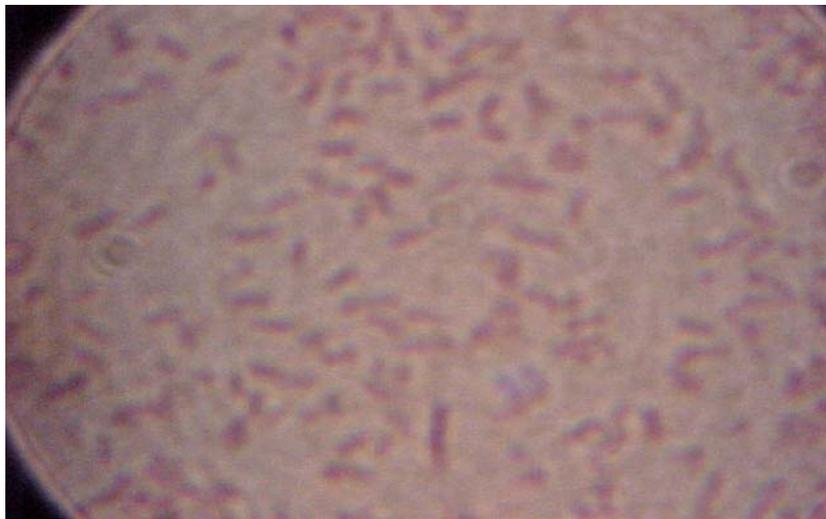


Figura 4. Morfología microscópica del microorganismo *Aeromonas* sp. PA8 mediante tinción de Gram.

1.1 Curva de crecimiento en caldo nutritivo

Se realizó una curva de crecimiento en caldo nutritivo para conocer el comportamiento del microorganismo en un medio simple comercial como el caldo nutritivo.

La figura 5 muestra la curva de crecimiento de *Aeromonas* sp. PA8 en caldo nutritivo donde presenta una fase exponencial en las primeras 24 h de cultivo con una velocidad específica de crecimiento de 0.0021 OD/h.

Durante esta fase los microorganismos crecen y se multiplican a una velocidad exponencial, gracias al proceso de fisión binaria, ya que en esta etapa del cultivo celular existe abundancia de nutrientes, por lo que los microorganismos son capaces de orientar sus procesos metabólicos principalmente a la multiplicación y crecimiento celular.

Su tasa de crecimiento es constante durante este periodo donde el microorganismo dobla su número a intervalos regulares. La población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas durante esta fase; por lo tanto, los cultivos en fase exponencial son usados en estudios bioquímicos y fisiológicos (Prescott, 1996).

El comportamiento detectado en el microorganismo cultivado corresponde a la curva típica de crecimiento microbiano, donde podemos observar una etapa de crecimiento exponencial o logarítmico (0-24h), posteriormente una fase estacionaria que dura de las 24 h hasta poco antes de las 72 h, puesto que la variación en la turbidez detectada no fue significativa; y finalmente una fase de descenso o de muerte celular.

Estos resultados coinciden con los presentados por Charles-Rodríguez en el 2008, donde reporta que los microorganismos del género *Aeromonas* sp. PA8 presentan su fase exponencial a partir de las 12 h de cultivo en caldo nutritivo.

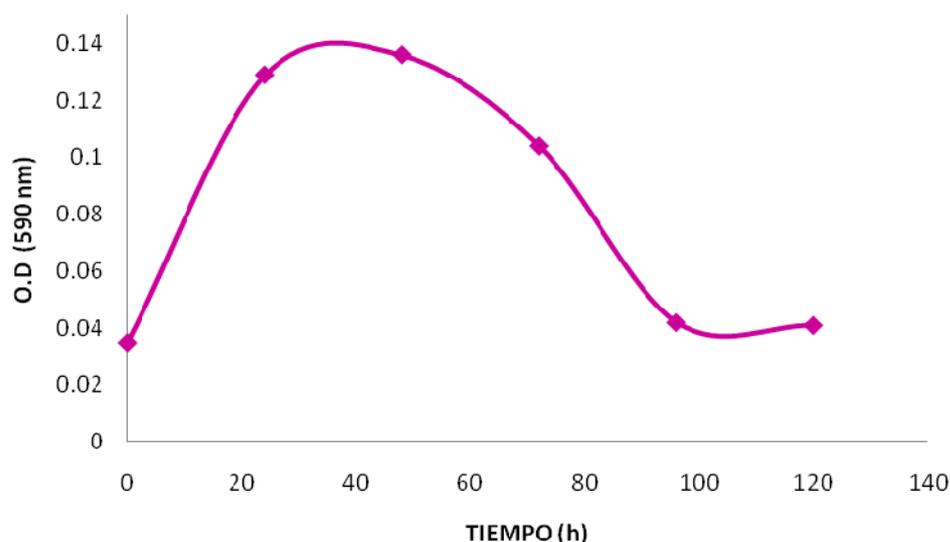


Figura 5. Cinética de crecimiento microbiano de células de *Aeromonas* sp. PA8 cultivadas en caldo nutritivo a 37°C.

1.2 Determinación de proteína celular

Cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz se dispersa, parte se refleja y parte se absorbe. Esta dispersión puede ser medida por turbidimetría ya que proporcionará un resultado en base a la concentración de proteína concreta, ya que se compara la cantidad de la luz dispersada o la tasa de aumento de la dispersión con los valores de estándares protéicos conocidos (Gorina, 1980).

El método se basa en la reacción de las proteínas presentes con el reactivo de Folin-Cicolteu para dar un complejo de color azul, debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína. La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y enlaces peptídicos y puede variar según la clase de proteína.

La figura 6 muestra el contenido de proteína celular presentado por *Aeromonas* sp. PA8, donde se puede observar que la concentración de proteína no presenta cambios significativos en la concentración de proteína celular a partir de las 24 h, obteniendo su máximo a las 96 h de fermentación con un valor de 0.2726 mg/ml.

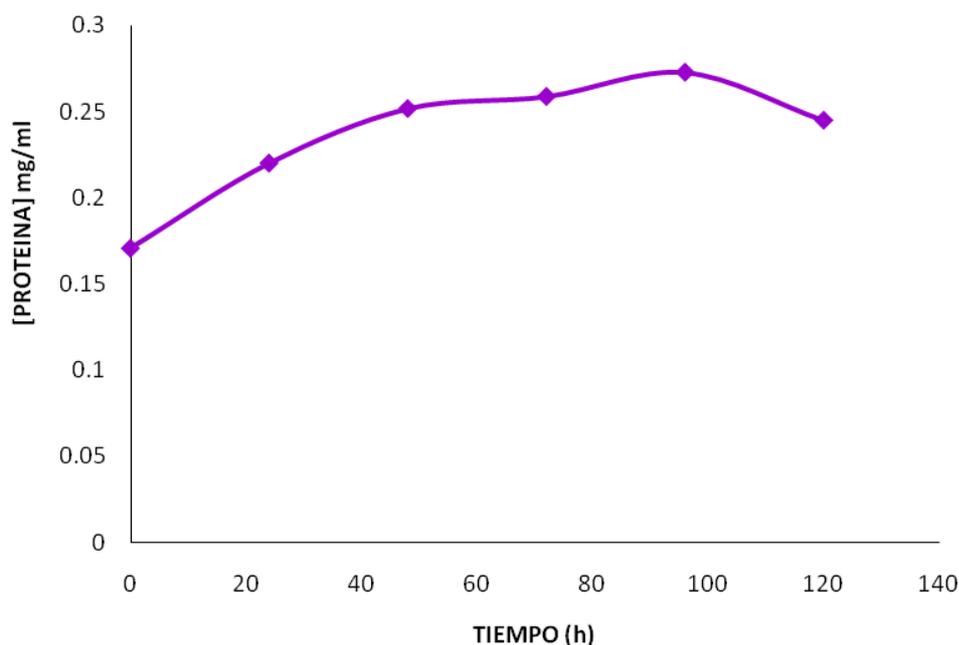


Figura 6. Concentración de proteína celular de *Aeromonas* sp. PA8 en caldo nutritivo.

Comparando los datos obtenidos en este análisis con los de crecimiento microbiano, vemos que la cantidad de proteína se eleva de manera constante desde el inicio del estudio, confirmando los datos obtenidos anteriormente donde el crecimiento comienza desde el inicio del cultivo y se mantiene en fase estacionaria hasta las 72 horas para posteriormente comenzar un descenso en la cantidad de células presentes; sin embargo, en esta última etapa del cultivo no se detectó un descenso importante en la concentración de proteína, probablemente debido a que aunque las células comienzan a morir, las proteínas se encuentran aun presentes y pueden ser detectadas por la técnica analítica empleada.

Debemos considerar que la concentración de proteína detectada en las alícuotas tomadas durante el estudio cinético de crecimiento de *Aeromonas* sp. PA8, se consideran como proteínas totales, es decir, incluye la proteína de las células recolectadas y cualquier otra proteína que se encuentre en el medio de cultivo, por ejemplo, enzimas extracelulares y restos de microorganismos muertos, por lo que la comparación de la concentración de proteína presente en las muestras y la determinación de turbidez en función del tiempo es importante para tener un panorama adecuado de lo que está sucediendo en el medio de

cultivo mientras se realiza la incubación a las condiciones mencionadas anteriormente. Al mismo tiempo se puede observar que los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en experimentos anteriores; ya que Charles-Rodríguez (2008) reportó que *Aeromonas* sp.PA cultivada en caldo nutritivo presentó una fase exponencial desde los primeros minutos y se extendió hasta las 72 h de cultivo con una velocidad específica de crecimiento de 0.007 OD/h. Los límites de temperatura de crecimiento para *Aeromonas hydrophila* son de 0°-45°C con un óptimo de 28-35°C; por ser un psicrófilo, es posible observar incrementos de 1-3 log a 5°C en tanto que a 28°C pueden tener incrementos de hasta 7 log en 24 h. En caldo nutritivo este microorganismo presenta un tiempo de generación de 0.40 h a 28 °C; sin embargo, si se aumenta la temperatura se alarga este periodo presentando 0.53 h a 37°C y 1.21 h a 42°C (Palumbo, 1985).

ETAPA II: Optimización del pH del medio de cultivo específico para la producción de una quitosanasa extracelular.

1. Curva de crecimiento en medio específico

Se preparó un medio de cultivo empleando como única fuente de carbono oligosacáridos de quitosán obtenidos y caracterizados en el laboratorio (Charles-Rodríguez, 2008) para la producción de la enzima quitosanasa. Durante la fermentación para la producción de la enzima se analizaron 3 diferentes pH's (6.0, 7.0 y 8.0).

La determinación del pH óptimo al cual se produce la mayor cantidad de enzima juega un papel importante en la estandarización de los procesos biotecnológicos, ya que además de proporcionar mejores rendimientos en la inducción de la actividad enzimática de interés, se estudia el comportamiento del microorganismo a diferentes condiciones de crecimiento. Hay que tomar en cuenta que cualquier proceso enzimático posee un pH óptimo al cual se lleva a cabo favorablemente la catálisis de una reacción obteniéndose la mejor actividad posible por lo que este parámetro debe calcularse cuidadosamente.

En la figura 7 se presentan los resultados obtenidos de la curva de crecimiento empleando diferentes pH's en el medio específico; donde se puede observar que a pH 6.0 que no existe una variación significativa durante las primeras horas de incubación ($\mu=0.0008$ OD/h), no es hasta las 120 h cuando se observa un ligero incremento en la turbidez del cultivo, la cual se mantiene de manera constante hasta el final de la cinética de crecimiento.

En el caso de la cinética de crecimiento empleando el pH 7.0 presenta una fase de adaptación que es cuando el microorganismo es introducido en el medio de cultivo, el número de células no se incrementa usualmente de manera inmediata, por otro lado se da una fase de adaptación de manera corta cuando es un cultivo nuevo y vigoroso y este es transferido a un medio fresco; a las 48 h se tiene un incremento celular, después de las 120 h se observa una fase exponencial, extendiéndose hasta las 168 h de fermentación ($\mu=0.0018$ OD/h), mientras que para el pH 8.0 se observa un incremento en la concentración de células a partir de las 72 h ($\mu=0.0001$ OD/h); de las 120 h a las 192 h se presenta una fase estacionaria ya que no hay variación significativa en las lecturas obtenidas.

Reportes en la literatura mencionan que empleando oligosacáridos de quitosán comerciales de bajo peso molecular bajo las mismas condiciones del medio de cultivo utilizadas en la presente investigación, *Aeromonas* sp. PA8 presenta una fase exponencial a las 48 h de fermentación con una velocidad específica de crecimiento de 0.0041 OD/h a pH de 7.0 (Charles-rodríguez, 2008).

En el caso del género *Aeromonas* sp la tolerancia a pH bajo es escasa. No es probable que este microorganismo sea un problema en alimentos con $\text{pH}<6$ o a concentraciones de sal del 3% o mayor (Palumbo, 1998). El pH óptimo para desarrollarse según Palumbo (1995) es a un pH de 6.5 a 7.2, ya que a pH de 5.5 el crecimiento se retrasa y a 4.5 el número de células viables se extingue, debido a que el contenido de glucosa en el medio permite un proceso fermentativo con decremento concurrente de pH (Palumbo, 1988).

Comparando los resultados obtenidos con los de la literatura podemos mencionar que el uso como fuente de carbono de oligosacáridos de quitosán de bajo peso molecular altamente purificados y caracterizados son asimilados más fácilmente por el microorganismo, lo que se traduce en una relación directa entre el tamaño de oligosacáridos de quitosán empleados y el crecimiento microbiano tomando en cuenta que se obtienen mejores resultados empleando oligosacáridos de quitosán de bajo peso molecular

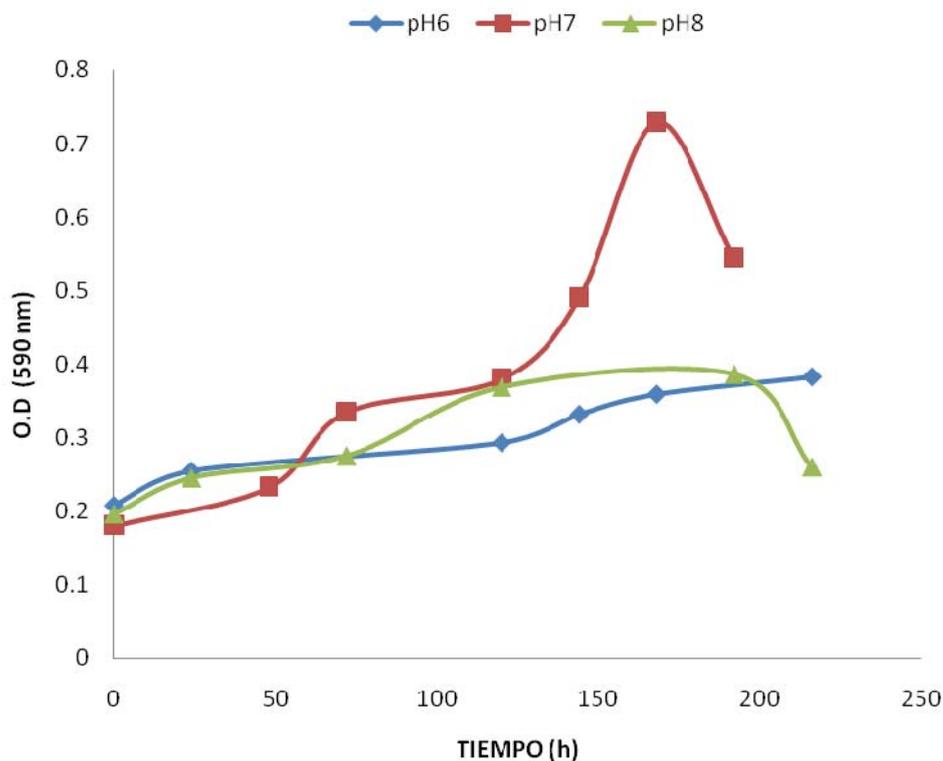


Figura 7. Gráfica comparativa de crecimiento microbiano de *Aeromonas* sp PA8 empleando medio específico a diferentes pH's.

1.1 Determinación de proteína celular

En la figura 8 se muestra el contenido de proteína celular en medio de cultivo específico a diferente pH, donde se puede observar que a pH 6.0 y 7.0 se obtiene la máxima concentración de proteína a las 48 horas con un valor de 0.2344mg/mL y 0.2312 mg/mL respectivamente, las variaciones en contenido de proteína celular se mantienen sin cambio a lo largo del proceso de fermentación (144 h). Esto no se observó al emplear medio de cultivo específico a pH 8, donde la concentración de proteína detectada mostró un aumento ligero pero constante desde el inicio de la cinética hasta registrar su valor máximo a las 120 horas (0.2312 mg/mL) para posteriormente comenzar a disminuir gradualmente.

En estudios previos de este sistema de fermentación, se empleó un medio de cultivo específico con oligosacáridos de quitosán de tipo comercial como única fuente de carbono (0.5 mg/ml) con pH de 7.0 obteniendo la mayor concentración de proteína celular a las 72 h con un valor de 0.4526 mg/ml (Oviedo, 2008); por lo que estos resultados son 1.9 veces mayores a los obtenidos empleando pH de 6.0 y 7.0.

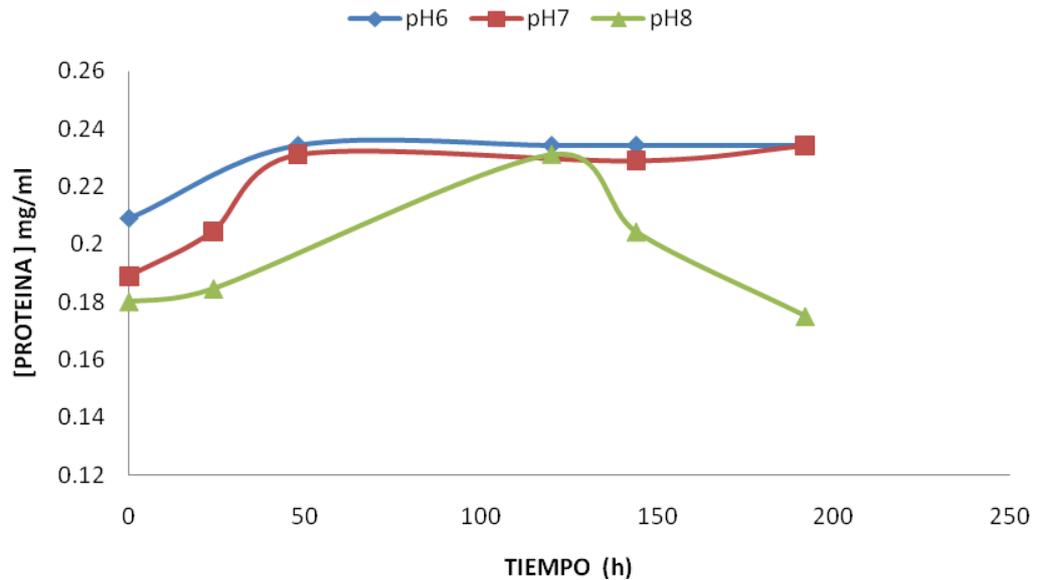


Figura 8. Gráfica comparativa del contenido de proteína celular de *Aeromonas* sp PA8 en medio específico empleando diferentes pH's.

1.2 Determinación de proteína extracelular

El contenido de proteína extracelular refleja la concentración de enzima producida durante el proceso de cultivo e inducción, por lo que se obtendrán datos de producción de enzima en función de los parámetros a analizar en este proyecto de manera que se optimice la producción de la misma empleando las condiciones adecuadas para este proceso.

La figura 9 muestra los resultados del contenido de proteína extracelular en medio específico a diferentes pH's. La mayor producción de proteína extracelular se observa en las fermentaciones con pH 6.0 con un valor de 0.409 mg/mL a las 168 h, sin embargo, a pH de 7.0 se observa la mayor concentración de proteína a las 72 h 0.4015 mg/mL, para fines de tiempos en el proceso obtenemos la misma cantidad de proteína extracelular a pH de 6.0 y de 7.0 por lo que es conveniente utilizar pH de 7.0 ya que es donde se obtiene en menor tiempo la proteína extracelular. La producción de proteína a pH de 8.0

se puede observar un aumento constante desde un inicio de la cinética hasta las 168 h donde se obtiene un valor de 0.4018 mg/mL. Hay que considerar para fines de costos, al emplear pH de 8.0 se utiliza una mayor cantidad de reactivo hidróxido de sodio (NaOH) que se utiliza para volver el pH base, por lo que este se tarda mas en obtener un mayor producción de la proteína. Charles, Rodríguez (2008) obtiene la mayor producción de proteína a las 92 h con un valor de 0.989 mg/ml, por otro lado reportes de la literatura mencionan que utilizando oligosacaridos de tipo comercial con un porcentaje de 0.5 % de nitrato de sodio y aun pH de 7.0 se obtiene hasta 0.087 mg/mL a las 96 h, mientras que con un porcentaje de 0.3 % de nitrato obtiene a las 120 h un valor de 0.0853 mg/mL (Oviedo, 2008).

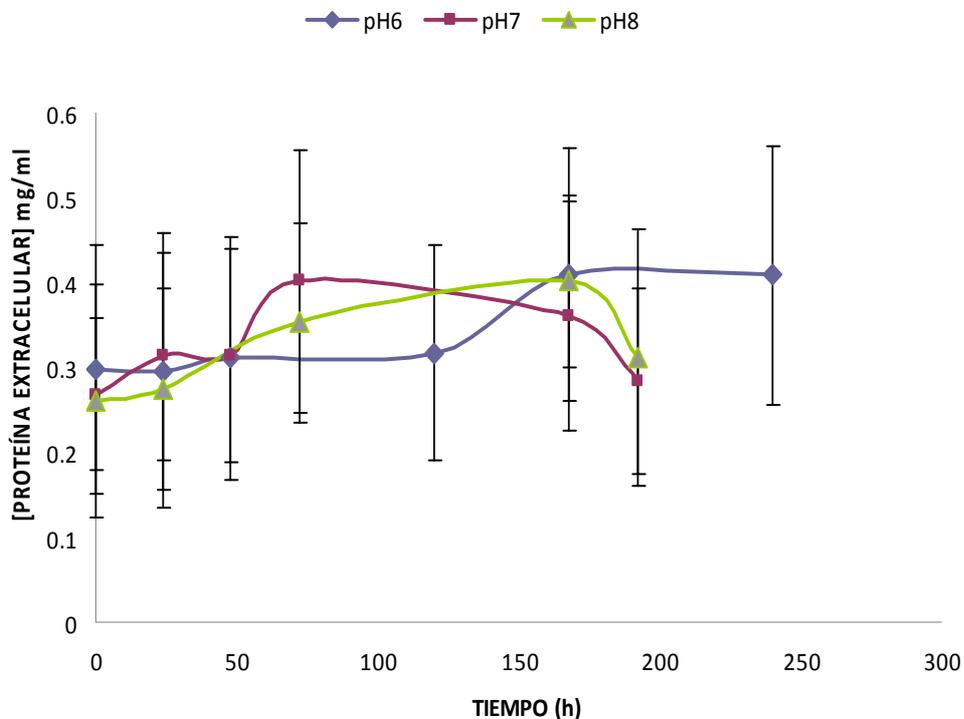


Figura 9. Gráfica comparativa del contenido de proteína extracelular de *Aeromonas* sp. PA8 en medio específico a diferentes pH's.

ETAPA III: Optimización de la temperatura de incubación para la producción de la quitosana extracelular.

1. Curva de crecimiento en medio específico

El crecimiento de los microorganismos es afectado enormemente por la naturaleza física y química de su ambiente, un factor importante para la influencia de la temperatura sobre el crecimiento microbiano es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas a la temperatura, debido a que cada reacción se incrementa, el metabolismo es más activo a temperaturas altas, y el microorganismo crece más rápido, siendo temperaturas suficientemente altas son letales. Por lo que observar la curva de crecimiento permite observar el comportamiento microbiano a temperaturas altas y bajas.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos de la curva de crecimiento a diferentes temperaturas en medio específico donde se observa que *Aeromonas* sp. PA8 a la temperatura de 37°C presenta su fase exponencial en las primeras 24 h de incubación y posteriormente disminuye su velocidad de multiplicación para entrar en fase estacionaria a partir de las 72 horas. El mismo comportamiento en el crecimiento exponencial se observó al aplicar la temperatura de 32 °C, pero posterior a las 24 h se observó una breve fase estacionaria y una disminución constante de la turbidez detectada en el resto de la cinética.

Cuando se aplica una temperatura de 42°C, se puede apreciar en la curva de crecimiento que no hay desarrollo factible del microorganismo, puesto que las lecturas detectadas se mantuvieron sin variación alguna desde el inicio hasta el fin de la cinética microbiana, lo que nos muestra que el microorganismo no se desarrolla favorablemente a esta temperatura de crecimiento y bajo estas condiciones de cultivo en el medio.

Reportes en la literatura mencionan que microorganismos del género *Aeromonas* sp tienen su óptimo crecimiento a los 32°C, sin embargo, es importante mencionar que las condiciones climáticas del valle de Cuatrociénegas son muy variables y que dependen de la época del año de muestreo ya que los microorganismos predominantes serán aquellos que logran adaptarse a ellas (Mauricio-Benavides, 2007).

Tomando en cuenta lo antes mencionado podemos decir que el desarrollo de *Aeromonas* sp PA8 empleando un medio específico con oligosacáridos de quitosán como fuente de carbono, se desarrolla mejor empleando una temperatura de incubación de 37°C, la cual si se disminuye 5 grados tiene un efecto considerable en el desarrollo del

microorganismo después de las 24 horas de incubación; mientras que a temperaturas superiores a los 40 °C el crecimiento microbiológico es negativo bajo estas condiciones de cultivo.

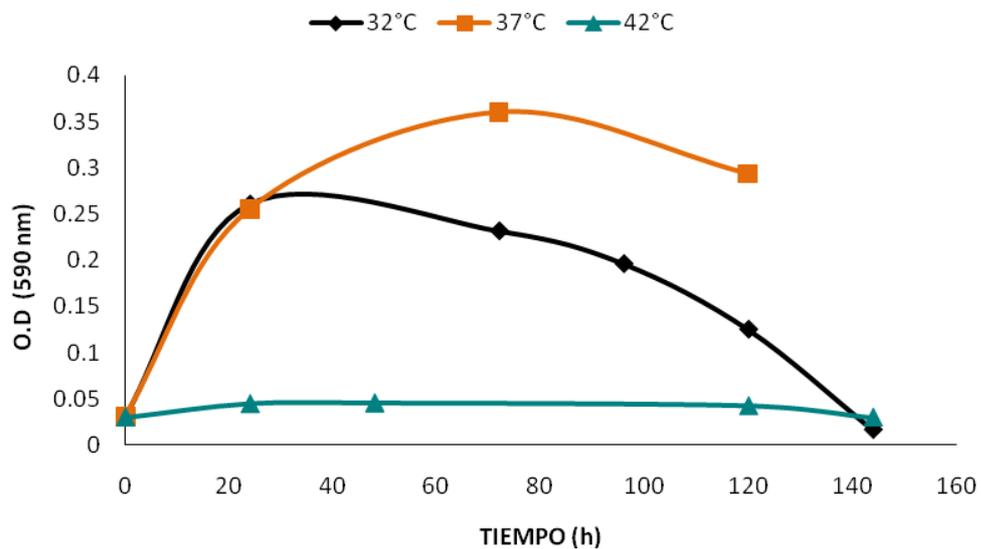


Figura 10. Gráfica comparativa del crecimiento microbiano de *Aeromonas sp. PA8* en medio de cultivo específico a diferentes temperaturas de incubación.

1.1 Determinación de proteína extracelular

El efecto de la temperatura de incubación mostro tener un efecto significativo en la concentración de proteína extracelular. En la figura 11 se observa el contenido de proteína extracelular a diferentes temperaturas, donde podemos observar al aplicar temperaturas de incubación de 32° y 42°C, no se presenta una variación en la concentración de proteína extracelular, manteniéndose los valores de 0.419 y 0.205 mg/mL respectivamente; mientras que a temperatura de 37°C se observa un incremento en al concentración de proteína extracelular a las 72 h de incubación (0.410 mg/mL) para posteriormente bajar de manera gradual hasta las 120 h de fermentación.

Charles-Rodríguez (2008) produjo una quitosanasa extracelular empleando oligosacáridos de quitosán comerciales de bajo peso molecular a una temperatura de 37°C obteniendo un máximo de 0.98 mg/mL de proteína extracelular; estos resultados sugieren que al emplear oligosacáridos de quitosán comerciales y de grado analítico facilitan las condiciones para la producción de la enzima, sin embargo, el empleo de oligosacáridos de quitosán sin purificar obtenidos en el laboratorio representan una alternativa para la producción de la enzima quitosanasa.

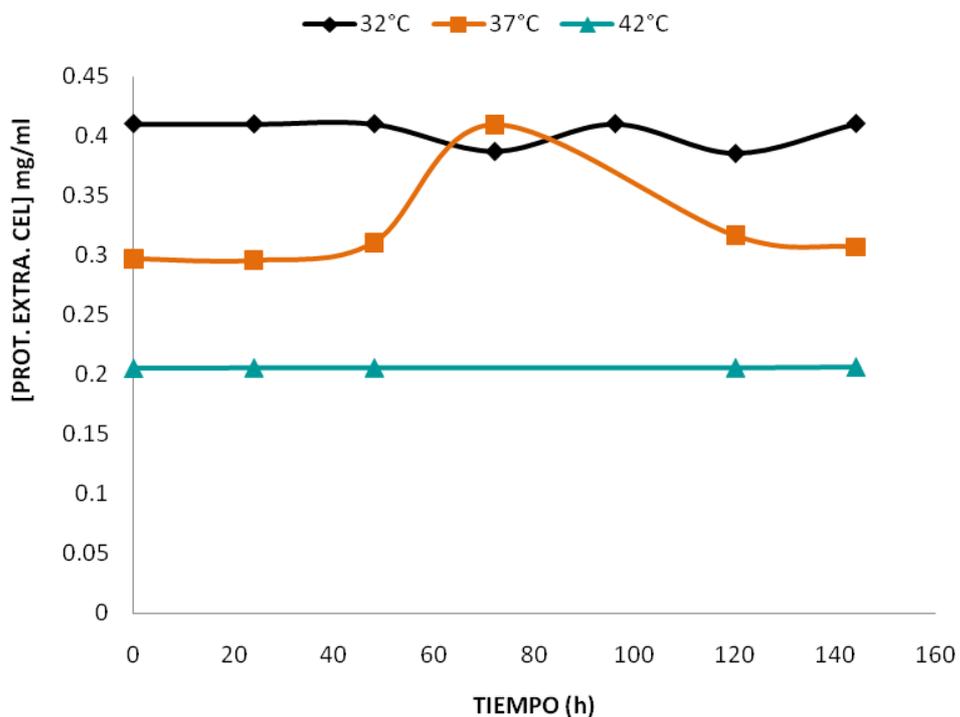


Figura 11. Gráfica comparativa del contenido de proteína extracelular en cultivos de *Aeromonas* sp. PA8 en medio específico empleando distintas temperaturas de incubación.

Considerando los datos obtenidos, tenemos que al aplicar una temperatura de incubación de 37 °C, se observa un incremento en la cantidad de proteína extracelular a las 72 horas de incubación, comparando estos resultados con los obtenidos en la curva de crecimiento por turbidez tenemos que la mayor cantidad de proteína extracelular (que podría ser traducida como enzima) se da al final del la fase de crecimiento exponencial y poco antes de entrar a fase estacionaria.

ETAPA IV: Estudio de la actividad enzimática del extracto obtenido, mediante cinéticas de viscosidad y/o liberación de azúcares reductores.

1. Cuantificación de la actividad enzimática a diferentes pH's

Charles-Rodríguez (2008) observó que *Aeromonas* sp. PA8 disminuye la viscosidad del quitosán en un 95 % empleando una quitosanasa extracelular, concluyendo que este proceso es una fuente alternativa para la producción eficiente de oligosacáridos de quitosán.

La figura 12 muestra la actividad quitosanasa a diferentes pH's, se puede observar que *Aeromonas* sp. PA8 cultivada en medio específico a pH 6.0 produce más rápidamente la enzima quitosanasa excretándola al medio de cultivo, la mayor actividad enzimática se detecta a las 24 h de fermentación, se obtiene un valor de 0.0642 U/mg por cada 0.296 mg/mL de proteína, para el pH 7.0 se observó que *Aeromonas* sp. PA8 tardó más tiempo en producir la enzima quitosanasa registrando su máxima actividad enzimática a las 120 h en poca cantidad con un valor de 0.0234 U/mg, por cada 0.7 mg/mL de proteína, mientras que para el pH 8.0 presenta actividad siendo mínima la cantidad, la mayor actividad quitosanasa se registró a las 48 h de fermentación con un valor de 0.030 U/mg, siendo el pH 6.0 quien obtiene la máxima producción de actividad, sin embargo a pH 7.0 y 8.0 presentan actividad pero en menor cantidad y a mayor tiempo.

La literatura menciona que al realizar una cinética para evaluar el efecto de la disminución de la viscosidad del quitosán mediante el empleo de extractos enzimáticos obtenidos a temperatura de 40°C, se demostró que *Aeromonas* sp. PA8 a las 14 h, redujo en un 100 % la viscosidad del quitosán transformándolo en oligosacáridos de quitosán de diferentes pesos moleculares (Charles-Rodríguez, 2008).

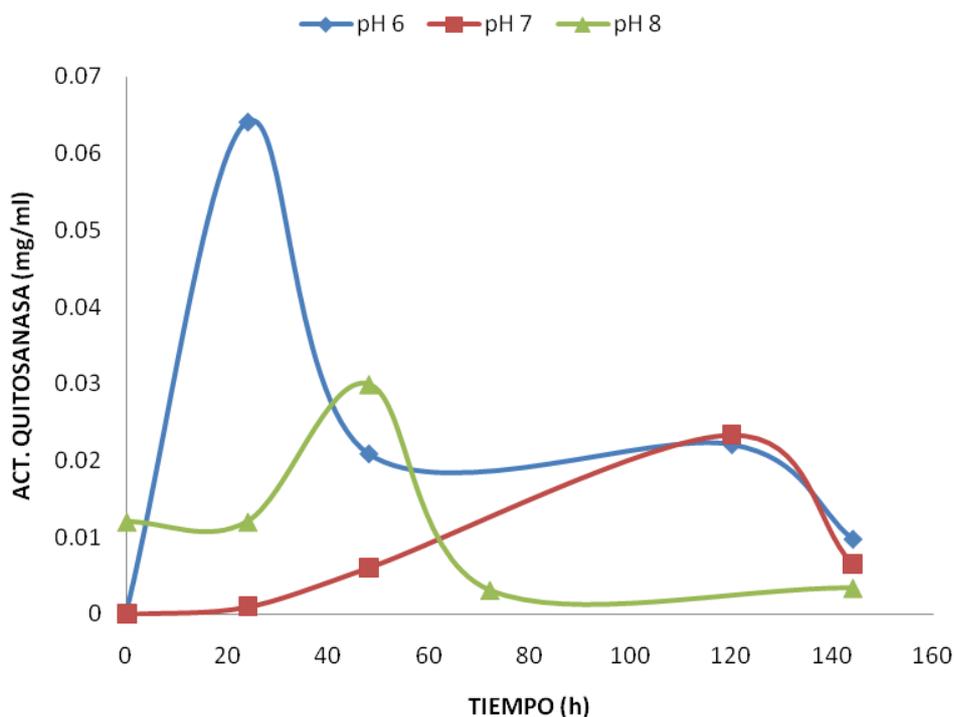


Figura 12. Gráfica comparativa de la actividad quitosanasa de *Aeromonas* sp PA8 en función del pH del medio de cultivo específico probado.

En la tabla 7 muestra las velocidades iniciales de formación de producto, proteína extracelular y actividad quitosanasa a diferentes pH's, donde a pH de 6.0 se obtiene la mayor velocidad, por lo tanto, se tiene una mayor concentración de proteína extracelular y una mayor actividad enzimática, lo cual no significa que al tener una mayor concentración de proteína extracelular se obtendrá una mayor actividad, se podrá tener poca concentración de proteína y tener actividad, como es el caso del pH 8.0 donde presenta poca concentración de proteína y la obtiene en menor cantidad. Mientras que a pH de 7.0 se observa una concentración de proteína de 0.277 mg/mL presentando baja actividad quitosanasa.

Tabla 7. Relación de velocidad inicial de formación de producto, proteína extracelular y actividad quitosanasa a diferentes pHs.

pH	Vo (OD/ppm)	Proteína extracelular (mg/ml)	Actividad enzimática (U/mg)
6.0	0.019	0.296	0.064
7.0	0.0065	0.277	0.023
8.0	0.008	0.266	0.029

1.1 Cuantificación de la actividad enzimática de temperatura 32°, 37°, 32 °C

En la figura 13 se muestra el contenido de actividad quitosanasa donde se puede ver que *Aeromonas* sp. PA8 a temperatura de 37°C produce la mayor cantidad de enzima quitosanasa a las 24 h a una velocidad de 0.0027 OD/ppm obteniendo un valor de 0.0642 U/mg, por cada 0.4101mg/mL de proteína, a las 48 h reduce su actividad produciendo la enzima en menor cantidad permaneciendo estable hasta las 72 h; a temperatura de 32°C no hay actividad enzimática, mientras que a temperatura de 42°C presenta una reducción casi total de la enzima.

En la literatura se menciona que conforme la temperatura va aumentando, la energía térmica de la cadena polipeptídica se incrementa y comienza a predominar sobre las fuerzas que mantienen la estructura nativa de la enzima. En estas condiciones la proteína se desnaturaliza y la actividad se pierde (Voet, 1999).

Oviedo (2008) empleando oligosacaridos producidos y caracterizados a nivel laboratorio y con un porcentaje de 0.3% de nitrato de sodio obtiene la máxima cantidad de actividad quitosanasa a las 96 h con un valor de 0.090 U/mL de proteína.

Existen varios microorganismos que han sido empleados para la producción de quitinasas y quitosanasas, utilizando diferentes fuentes de carbono. Choi en el 2003 observó que *Aeromonas* J-5003 produce quitinasa quien permanece estable a un pH de 6.0-10.0 y a una temperatura de 37°C, esta enzima es inactivada aun pH acido. También observó que la misma cepa produce la enzima quitobiosa manteniéndose estable a pH de 7.0-9.0, teniendo una actividad enzimática mayor del 80% a una temperatura de 37°C.

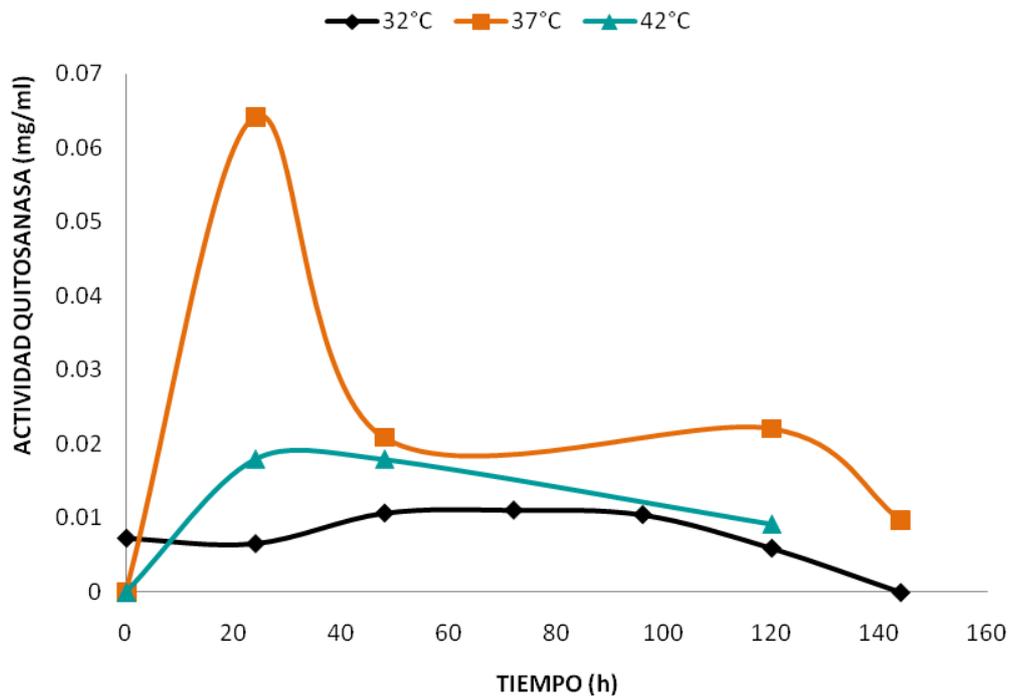


Figura 13. Gráfica comparativa de la actividad quitosanasa de *Aeromonas* sp PA8 en función de la temperatura de incubación.

La velocidad (V_0) de una reacción enzimática se puede medir por la variación de la cantidad de sustrato transformado, o la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. En la tabla 8 muestra las relaciones de las velocidades iniciales de formación de producto, proteína extracelular y actividad quitosanasa a diferentes temperaturas, donde presenta una mayor velocidad inicial a temperatura de 37°C, mientras que a temperatura de 32°C muestra poca velocidad, una muy alta concentración de proteína y poca actividad enzimática, esto se debe a que la actividad enzimática se ve afectada por factores externos como la temperatura, que sea capaz de alterar las fuerzas estabilizadoras de la proteína.

Tabla 8. Relación de velocidad inicial de formación de producto, proteína extracelular y actividad quitosanasa a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Vo (OD/ppm)	Proteína extracelular (mg/ml)	Actividad Enzimática (U/mg)
32	0.0027	0.4101	0.0065
37	0.019	0.2961	0.0641
42	0.018	0.2060	0.0017

Conclusiones

- Se determinó que *Aeromonas* sp. PA8 cultivada en caldo nutritivo presenta una fase exponencial en las primeras 24 h de fermentación con una velocidad específica de crecimiento de 0.0021 OD/h.
- La aplicación de oligosacáridos de quitosán de mediano peso molecular (30-100 kDa) obtenidos en nivel laboratorio, son una alternativa eficiente para ser empleados como única fuente de carbono en la producción de la enzima quitosanasa extracelular en procesos microbianos fermentativos.
- Se demostró que *Aeromonas* sp. PA8 representa una fuente alternativa para la producción de la enzima quitosanasa; la cual puede ser empleada en las hidrólisis del quitosán para la obtención de oligosacáridos de quitosán altamente solubles en agua con alto valor comercial.
- Se definió que al emplear medios específicos de inducción a pH de 6 y temperaturas de incubación de 37°C se obtiene la mayor actividad enzimática.
- Se determinó en las cinéticas enzimáticas que el extracto enzimático obtenido presenta buenas propiedades hidrolíticas sobre el quitosán obteniéndose valores máximos de 0.0642 U/mg de proteína a las 24 h de fermentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta, N., *et al.*, Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass and Bioenergy*, 1993. **5**: p. 145-153.
2. Agullo, E., Rodriguez, M. S., V & Albertengo, L. Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience* 3. 512-530 (2003).
3. Alfonso, C., Martinez, M. J. & Reyes, F. Purification and properties of two endo-chitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation. *FEMS microbial. Lett.*, 95, 187-94 (1992).
4. Araki, Y. & Ito, E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*, enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.*, 55, 71-8 (1975).
5. Austin, P.R., *et al.*, Chitin: new facets of research. *Science*, **212**(4496): p. 749-753 (1981).
6. Beaney, P., J. Lizardi-Mendoza, and M. Healy, Comparison of Chitins Produced by Chemical and Bioprocessing Methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2005.
7. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA. Pág 341-350
8. Braconnot, H., Sur la Nature des Champignons. *Ann. Chi. Phys.*, (1811).
9. Cauchie, H.M., An attempt to estimate crustacean chitin production in the hydrosphere, in *Advances in Chitin Science*, A. Domard, G.A.F. Roberts, and K.M. Vårum, Editors. 1998, Jacques André Publisher: Lyon. p. 32-39.
10. Capon B. Foster RL (1970). *The preparation of chitin oligosaccharides*. *J. Chem. Soc (C)*. 12: 1654-1655.
11. Chandi, T. and C.P. Charma, Chitosan as a biomaterial. *Artif. Cells, Artif. Org.*, 1990. **18**(1): p. 1-24.
12. Charles-Rodriguez, A.V., *et al.*, 2008. Chitosan production by new bacterial sources. *Research Journal of Biological Science*.
13. Choi, Chan-Ho, Yang Jeon and Yung-Bum Seo. 1999. Effect of chitosan Surface Treatment on the Antibacterial properties of Paper. *Journal of Korea TAPPI* 30(4).
14. Devlieghere, A. Vermeulen and J. Debevere. (2004). Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21: 703-714.

15. Domard, A., and M. Rinaudo. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int J Biol Macromol* 5: 49-52.
16. Fenton, D.M & Eveleing, D.E. Purificación and mode of action of chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.*, 126, 151-65 (1981).
17. Francesco C. (2002). International Symposium on Natural Products from Marine Microorganisms. Griifswald, Germany.
18. Gallardo, A., *et al.*, Chitosan Based Microcomposites - From Biodegradable Microparticles to Self-Curing Hydrogels, in *Biodegradable Systems in Tissue Engineering*, J.S.R. R. Reis, Editor. 2005, CRC Press: Boca Ratón. p. 145-162.
19. Gorina, I. Rapid method for measuring protein content microbial cells. *Appl. Biochem. And Microbiol.* (1980).
20. Goycoolea, F.M. (2004). About the gelation of chitosan-glycerol phosphate system. III Simposio Iberoamericano de Quitina (III SIAQ), Cordoba España.
21. Grenier, J., Benhamou, N. & Asselin, A. Colloidal gold-complexed chitosanase: a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2007-15 (1991).
22. Grenier, J., Benhamou, N. & Asselin, A. Some pathogenesis related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 3, 401-7 (1990).
23. Greene RV, Griffin HL, Cotta MA (1995) Tektran, Agricultural Research Service, United States Departamen of Agriculture, Whashington, DC
24. Hedges, A. & Wolfe, R. S. Extracellular enzyme from *Myxobacter* AI-1 that exhibits both B-1-4 glucanase and chitosanase activities. *J. Bact.*, 120, 844-53 (1974).
25. Hirano, S., *et al.*, Chitin and chitosan for use as novel biomedical materials, in *Advances in Biomedical Polymers*, L.G. Gebelein, Editor. Plenum: New York. p. 285-297 (1981).
26. Ishihara, C., *et al.*, Anti-viral activity of sulfated chitin derivatives against Friend murine leukaemia and herpes simplex type-1 viruses. *Vaccine*, 11(6): p. 670-674 (1993).
27. Jeon, Y.J, Kim. S. k. Continuous Production of Chitooligosaccharides using a dual reactor System. *Process Biochem*, (2000).

28. Jeon, Y-J., Kim, S-K. 2001. Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharide N-conjugated with asparagines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11:281-286.
29. Joo, D.S., Lee, J. S., Kim, O. S., Cho, S. Y. (2002). Preparation condition of chitooligosaccharides by cellulose using response surface methodology. *J. Korean Fish. Soc.*
30. Jung WJ, An KN, Jim YL, Park RD, Lim KT, Kim KY, Kim TH (2003). Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. *Soil Biol., Biochem.*, 35: 1261-1264.
31. Karasuda, S., Tanaka, S., Kajihara, H., Yamamoto, Y. Koga, D. (2003). Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67, 221-224.
32. Kauss, H., Jeblick, W. & Domard, A. (1989). The degrees of polymerization and *N-acetylation* of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharathus roseus*. *Planta*, 178, 385-92.
33. Kato, Y, Hiraku, Onishi and Yoshiharu Machida (2003) Depolymerization of *N-succinyl-chitosan* by hydrochloric acid. 90, 71-79.
34. Kim, K.W., et al., *Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and carboxymethylated chitosan*. *J. Food Prot.*, 2003. **66**(8): p. 1495-1498.
35. Kim, Sung-Hyun, Jae-Woon Nah, Jeong-sun Oh, Ki-Dong Song. Effect of molecular weight of chitosan of flocculation of suspended solids in Rodhamine 6G sodium Dodecyl Sulfate System. *Journal of the Korean Chemical Society*. (1998).
36. Kittur, F.S.; K.V. Harish Prashanth; K. Udaya Sankar; R.N. Tharanathan. 2002. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl Derivates by Differential Scanning Calorimetry. *Carbohydrate Polymers*. 49, 185-193.
37. Loredó, Treviño., A., Producción de Oligosacáridos de quitosán por vía enzimática y su capacidad fungistática en tortillas de maíz, ph.D.diss. Universidad de Coahuila, 2004.
38. Marcinkiewicz, J., A. Polewska, and J. Knapczyk, Immunoadjuvant properties of chitosan. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **39**(1-2): p. 127-132 (1991).
39. Mauricio-Benavides, J.E, et al. (2007). Acceso y potenciamiento de la biodiversidad microbiana del Valle de Cuatrocienegas, Coahuila para biocatálisis, ingeniería

- celular y nuevos procesos. 2° congreso internacional de investigadores de Cuatrociénegas.
40. Mayer, J., Willey, B., Henderson. (1989). Physical properties of films produced from the biopolymers *pollulan* and chitosan produced by *Aureobasidium pollulan* and *M. rouxii*. Washinton, D. C: Abstracts of annual Meeting of the Am . Soc. For Microbiology.
 41. Mima, S. (1983). Hingly deacetylated chitosan and its properties. J Of Aplied Polymer Science. 28 (6) : 1909-1917.
 42. Monaghan, R. L., Eveleing, D. E., Tewari, R. P. & Reese, E. T. Chitosanase, a novel enzyme, Nature New Biol., 245, 78-80 (1973).
 43. Murao S, T Kawada, H Itoh, H Oyama and T Shin. Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus* TK-22. Biosci Biochem 56: 368-369 (1992).
 44. Muzarelli and M.G. Peter, Editors. European Chitin Society: Grottammare. (1997) p. 475- 489.
 45. Muzzarelli, R.A.A. Methods of the determination of the Degree of Acetylation of chitin and chitosan, In chitin Handbook, y M.G.P.R.A.A. Muzzarelli, Editor, Euoepan chitin Society (1997).
 46. Muzzarelli, R.A.A., *Chitin*. The Polysacharides, ed. G.O. Aspinal. Vol. 3. New York: Academic Press (1985).
 47. Nanjo, F., Katsumi, R., Sakai, K. Purification and characterization of exo-B-D-glucosaminidase, a novel type of enzyme, from *Nocardia orientalis*. J. Biol. Chem., (1990) 265, 10088-94.
 48. Nelson, T.E 1994. Aphotometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemestry. 153:375-381.
 49. No, H.K. and P. Meyers, (1997) Preparation of chitin and chitosan, in Chitin Handbook, R.A.A.
 50. Osswald, W. F., Shapiro, J. P., MacDonald, R. E., Niedz, R. P. & Mayer, R. t. (1993). *Some citrus chitinases also possess chitonase activities. Experientia*, 49, 888-92.
 51. Oviedo Campos F.J, Optimización del medio de cultivo para la obtención de una quitosanasa extracelular producida por *Aeromonas* sp. Licenciatura. UAAAN, 2008.
 52. Palumbo, S.A. 1998, The growth of *Aeromonas hydrophila*, K144 m group pork at 5 °C. Internat. J. Food Microbiol. 7:41-48.

53. Palumbo, S.A., Williams, A.C., Buchanan, R.L and Phillips J.G. 1987. Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila* J. Food prot. 50: 761-764.
54. Palumbo, S.A, Morgan, D.R, and Buchanan R.L. 1985. Influence of temperature, NaCl and Ph on the growth of *Aeromonas hydrophila* J. Food sci. 50: 1417-1421.
55. Pantaleone, D., M. Yalpani, and M. Scollar, Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. Carbohydr. Res., 1992. **237**: p. 325-332.
56. Park, R-D., Jo, Y-Y., Jin, Y-L., Kim, K-Y, Shim, J-H, Kim, Y-W. 2002. Variation of antifungal activities of chitosan on plant pathogens. Journal of Microbiology and Biotechnology. 12:84-88.
57. Peniche, C., *et al.*, Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. Macromol. Biosci., 2003. **3**: p. 511-520.
58. Prado, et al., Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología. México D.F, Universidad, Autónoma Metropolitana, 1999.
59. Price, J. S. & Storck, R. (1975). *Production, purification and characterization of an extracellular chitosanase from Streptomyces*. J. Bact., 124, 1574-85.
60. Qin, C., *et al.*, Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. Int. J. Biol. Macromol., 2002. **31**(1-3): p. 111-117.
61. Roberts, G.A.F., Chitin Chemistry. 1992, London: The Macmillan Press Ltd.
62. Samuels, R. J. (1981). Solid state characterization of the structure of chitosan films. J. polymer. Sci. Polymer Phys. Ed., 19 (7): 1081-1105.
63. Sandford, P.A. (1989). Chitosan : commercial uses and potential applications. In chitin and chitosan, ed. G. Skajak-Braek, T. Anthonsen and P.A. Sandford. Elsevier, London, 51-86.
64. Somashekar, D., Joseph, R. Chitosanases-properties and applications; a review. Bioresource technology, (1996).
65. Somogy, M. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry (1952)
66. Sugano, M., et al., A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. Am. J. Clin. Nutr., 1980. **33**(4): p. 787-793.
67. Sashiwa H, Fujishima S, Yamano N, Kawasaki N, Nakayama A, Muraki E, Hiraga K, Oda K, Aiba S. (2002). Production of N-acetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-23330. Carbohydr Res 337:761-763.

68. Shimosaka, M., Nagawa, M., Ohno, Y. & Okazaki, M. (1993). Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* purification and some properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 231-5.
69. Schindler, M., Mirelman, D. & Sahon, S. (1997), Substrate induced evolution of *lysosymes*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 482, 386-92.
70. Tamai Y, Miyatake K, Okamoto Y, Takamori Y, Sakamoto K, Minami S. Enhanced healing of cartilaginous injuries by N-acetyl-Dglucosamine and Carbohydrr Polym 54 : 251-262. (2003).
71. Vílchez Susana. Nuevos tratamientos de lana con enzimas. Universidad de Barcelona, 2005.
72. Wan, J, Khaterin, A.M. Creber, Brant, Peppley., V. Tam, Bui. (2003). Ionic conductivity of chitosan membranes. 44,147-154.
73. Wells. W (1999) [http: // www. Accessexcellence.org/](http://www.Accessexcellence.org/)
74. Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, A., Ando, A. & Fuji, T. (1988). Phurification and properties of chitosanase from *bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, 25-70.