

Universidad Autónoma Agraria

“Antonio Narro”



División de Ciencia Animal

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Estudio de la actividad quitosanasa de células de *Bacillus* sp. aisladas de ambientes semi-desérticos extremos para la producción de oligosacáridos de quitosán

Por

Pedro Pascual Yescas

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista Saltillo, Coahuila México

Junio 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

“Estudio de la actividad quitosanasa de células de *Bacillus* sp. aisladas de ambientes semi-desérticos extremos para la producción de oligosacáridos de quitosán”

POR

Pedro Pascual Yescas

TESIS

Que se somete a la consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

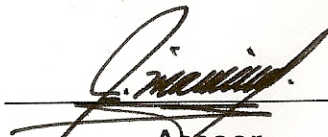
El trabajo realizado ha sido dirigido por el siguiente comité:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez



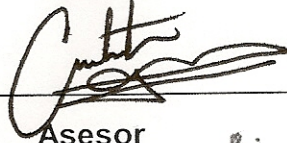
Director

M.C. Juan Enrique Mauricio Benavides



Asesor

M.C. Antonio Francisco Aguilera Carbo



Asesor



ING. JOSÉ RODOLFO PEÑA ORANDAY
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo Coahuila, Junio, 2009

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

INDICE	Pag.
Resumen	1
	2
Capítulo I	
INTRODUCCIÓN	2
Antecedentes	2
Justificación	4
Hipótesis	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
	6
Capítulo II	
REVISION DE LITERATURA	6
1. Cuatrociénegas	6
1.1 Generalidades	6
2. Microorganismos	8
2.1 Bacterias Gram Positivas	10
2.2 Bacterias Gram Negativas	10
2.3 Extremófilos	10
2.3.1 Características generales	11
3. Genero <i>Bacillus</i>	12
3.1 Características generales	12
3.2 Morfología	13
3.3 Especies	14
3.3.1 <i>Bacillus anthracis</i>	14
3.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	14
3.3.3 <i>Bacillus subtilis</i>	14
3.4 Metabolismo microbiano	15
3.5 Enzimas que producen	16
3.5.1 Amilasas	16
3.5.2 Proteasas	16

3.5.3 Pectinasas	17
3.5.4 Celulasas	17
3.5.5 Lipasas	17
3.5.6 Gluco isomerasas	18
3.5.7 Quitinasas	18
4. Quitina	19
4.1 Estructura	20
4.2 Fuentes de obtención	20
4.3 Potencial industrial	21
4.4 Mercado mundial	21
5. Quitosán	22
5.1 Estructura	22
5.2 Obtención	23
5.3 Solubilidad del quitosán	25
5.4 Aplicaciones	26
5.4.1 Agricultura	26
5.4.2 Medicina	26
5.4.3 Tratamientos de aguas residuales	27
5.4.4 Cosméticos	27
5.4.5 Biosensores	28
5.4.6 Industria alimentaria	28
5.4.7 Industria papelera	28
5.4.8 Tecnología de membranas	29
5.4.9 Industria textil	29
5.4.10 Propiedades antimicrobianas del quitosán	29
6. Derivados de quitina y quitosán	29
6.1 Oligosacáridos de quitosán	30
6.1.1 Obtención	30
6.1.2 Principales aplicaciones	30
6.1.2.1 Liberacion de fármacos	31
6.1.2.2 Estimulación del mecanismo de defensa en plantas	31

6.1.2.3 Estimulación al crecimiento celular y regeneración de tejidos	31
6.1.2.4 Prevencion y tratamiento de ulcera gástrica	32
6.1.2.5 Acción antitumoral	32
7. Quitosanasas	32
7.1 Microorganismos que producen quitosanasa	35
7.2 Modo de acción	37
7.3 Efecto del pH inicial y la temperatura	38
	39
Capítulo III	
MATERIALES Y METODOS	39
Etapa I. Estudio cinético de crecimiento microbiano de 5 cepas de <i>Bacillus sp.</i> aisladas del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila	39
1.1 Aislamiento del Valle de Cuatrociénegas Coahuila, de las 5 cepas de <i>Bacillus sp.</i>	39
1.2 Curva de crecimiento	40
1.3 Determinación de proteína celular por el método de Lowry modificado por Peterson	40
Etapa II. Selección de cepas bacterianas con actividad quitosanasa	41
2.1 Cultivo y proliferación de los microorganismos	41
2.1.1 Preparación del medio específico	41
2.1.2 Curva de crecimiento en medio específico	42
2.2 Determinación de proteína extracelular por el método de Lowry	43
Etapa III. Estudio de la actividad enzimática de los extractos obtenidos	43
3.1 Cuantificación de actividad enzimática	43
3.1.1 Preparación de sustrato	44
3.1.2 Cinética enzimática	44
3.2 Producción de oligosacáridos de quitosán	44

Capítulo IV	45
RESULTADOS Y DISCUSION	45
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65
ANEXOS	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de satélite del area de Cuatrociénegas y zonas adyacentes	7
Figura 2. Fotografía de la poza de la Becerra (estromatolitos)	8
Figura 3. Diferentes condiciones ambientales de crecimiento de microorganismos extremófilos	12
Figura 4. Estructura química de la quitina, quitosan y quitano	20
Figura 5. Producción de la quitina y sus derivados a nivel mundial	22
Figura 6. Esquema de la obtención de quitina y quitosan	25
Figura 7. Morfología microscópica de las células aisladas del Valle de Cuatrociénegas teñidas mediante la técnica de Gram	46
Figura 8. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PG-3 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento	47
Figura 9. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PG-4 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento	48
Figura 10. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células de PC-5 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento	49
Figura 11. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PC-6 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular c) Determinación de velocidad específica de crecimiento	

	50
Figura 12. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células de LPG-23 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento	
	52
Figura 13. Grafica comparativa de las curva d crecimiento microbiano en caldo nutritivo de 5 cepas de <i>Bacillus sp.</i> Aisladas del Valle de Cuatrociénegas Coahuila	53
Figura 14. Grafica comparativa del contenido de proteína celular del cultivo de las diferentes cepas de <i>Bacillus sp</i> en caldo nutritivo	55
Figura 15. Grafica comparativa de las concentraciones de proteína extracelular obtenidas del cultivo de los 5 <i>Bacillus</i> en medio específico con oligosacaridos de quitosan	57
Figura 16. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático de <i>Bacillus</i> PG-3 en función del tiempo de fermentación en medio específico	59
Figura 17. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático de <i>Bacillus</i> PG-4 en función del tiempo de fermentación en medio específico	60
Figura 18. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático de <i>Bacillus</i> PC-5 en función del tiempo de fermentación en medio específico	60

Figura 19. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático de *Bacillus* PC-6 en función del tiempo de fermentación en medio específico

61

Figura 20. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático de *Bacillus* LPG-23 en función del tiempo de fermentación en medio específico

61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas de algunos microorganismos pertenecientes del genero <i>Bacillus</i>	13
Tabla 2. Características de crecimiento a diferentes temperaturas para microorganismos del genero <i>Bacillus</i>	15
Tabla 3. Enzimas producidas por microorganismos del genero <i>Bacillus sp.</i>	19
Tabla 4. Contenido de quitina en crustáceos , insectos, moluscos y hongos	23
Tabla 5. Localización y códigos de los microorganismos aislados del Valle de Cuatrociénegas por Mauricio-Benavides (2007).	39
Tabla 6. Curva de calibración de proteínas por el método de Lowry	41
Tabla 7. Composición química del medio de cultivo específico para la producción de quitosanas extracelular	42
Tabla 8. Curva de calibración de glucosa 500 ppm para azúcares reductores	43
Tabla 9. Análisis comparativo de los datos de proteína celular, extracelular y velocidad de crecimiento específica de las 5 cepas de <i>Bacillus</i> estudiadas	58
Tabla 10. Análisis comparativo de velocidad inicial de formación de producto (AR) de los extractos enzimáticos obtenidos de los 5 <i>Bacillus</i> analizados	63

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por haberme encendido esa luz que me alumbro el camino cuando me encontraba en la oscuridad y permitirme lograr una meta mas en mi vida y por esa sabiduría que puso en mi para seguir por el buen camino.

A MI ALMA MATER

Por haberme cobijado bajo su techo durante mi estancia en ella así por los conocimientos que me forjo para la vida profesional.

A LA DRA. ANAVERONICA CHARLES RODRIGUEZ

Con cariño y respeto por brindarme su amistad y porque siempre esta dispuesta a apoyarnos incondicionalmente para que el presente trabajo llegara su fin de la mejor manera. Gracias doctora.

AL DR. JUAN ENRIQUE MAURICIO BENAVIDEZ

Por su valiosa amistad y apoyo incondicional así como por su tiempo en la revisión y sugerencias del trabajo.

AL DR. TONY

Por su valioso tiempo invertido en la revisión del trabajo y por haberme brindado su amistad.

A TODOS LOS MAESTROS

Por haber compartido conmigo el conocimiento que posee cada uno de ellos de una manera incondicional y desinteresada gracias a todos ellos.

DEDICATORIA

CON MUCHO CARIÑO, RESPETO Y AMOR A MI MADRE:

Sra. Clementina Yescas Francisco

Por todo ese apoyo incondicional que siempre me ha brindado, por su esfuerzo para hacerme de una carrera profesional, por sus sabios consejos y sus buenas palabras de aliento que siempre los voy a tener presentes, que Dios me la cuide por mucho mas tiempo

A MI HERMANA:

Reina Pascual Yescas por darme esa confianza y creer en mí, por su apoyo moral e incondicional para lograr una meta más en mi vida.

Con cariño a Ventura Moreno (la gorda), Ricardo Álvarez (el tornillo) por se como mis hermanos en las diferentes circunstancias, así también a Alonso Álvarez (la chuleta) por su sincera amistad, a Clelita López por encontrar en ella una amistad diferente así como a Marbella Romero, Luis Alberto Pérez un amigo muy especial, Nayeli Robles por ser una amiga especial al escucharme, Laura Martínez, Bonifacio Antonio, Zurisaday, José Eduardo Pérez, Abraham Rivera, Freddy Enrique (el balón) un amigo muy apreciado, Francisco Cortez, Aglael Castro a todos ellos por su amistad y los momentos de convivencia.

A todos los antes mencionados por haberme apoyado de alguna u otra forma para terminar este trabajo gracias.

RESUMEN

El valle de Cuatrociénegas Coahuila es una región de una gran variedad de especies endémicas lo cual ha permitido enfocar estudios para nuevas investigaciones con aplicaciones biotecnológicas.

Los oligosacáridos de quitosán obtenidos de la quitina mediante métodos químicos, físicos y enzimáticos han ganado interés en las diferentes áreas como lo son en la industria de alimentos, cosméticos, agricultura, entre otros, debido a que no son tóxicos y son biodegradables.

El empleo de microorganismos para la producción de oligosacáridos de quitosán es una alternativa para sustituir el método químico, pero se requieren más investigaciones ya que existen pocos reportes en la literatura enfocados en la producción de enzimas quitosanasas a partir de microorganismos.

El objetivo de este trabajo fue el de producir y cuantificar la actividad quitosanasas de cinco cepas del género *Bacillus* sp. provenientes de ambientes extremos del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

Se desarrolló un proceso enzimático para la producción de oligosacáridos de quitosán mediante el diseño de un medio de cultivo para la producción de una quitosanasas extracelular empleando como única fuente de carbono oligosacáridos de quitosán de mediano peso molecular (30-100 kDa).

Las cinco cepas aisladas de la Poza de los Güeros y la Poza del Centro del valle de Cuatrociénegas, fueron capaces de producir una quitosanasas de manera extracelular, y fueron eficientes en la producción de oligosacáridos de quitosán. El extracto enzimático del *Bacillus* sp presentó una actividad de 0.035 U/mL de proteína para el PG-3, 0.035 U/mL de proteína para PG-4, 0.25 U/mL de proteína en PC-5, y una actividad de 0.45 U/mL de proteína para PC-6 y 0.009 U/mL de proteína para el LPG-23 respectivamente.

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El proyecto “Estudio de la actividad quitosanasa de células de *Bacillus* sp. aisladas de ambientes semi-desérticos extremos” propone la producción de una enzima de gran demanda a nivel mundial a partir de microorganismos aislados de ambientes extremos del valle de Cuatrociénegas, Coahuila, México.

La quitina, segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Katsushiro, *et al.*, 2002) es degradada por enzimas con actividad quitinolítica llamadas “quitinasas”, estas son producidas por varios microorganismos así como por plantas, invertebrados, protozoarios, hongos, bacterias, inclusive virus (Brurberg, *et al.*, 2000, Patil, *et al.*, 2000 y Kopecny y Hodrová, 1998). Es muy abundante en crustáceos, insectos y hongos. La quitina es blanca, firme, inelástica, es un polisacárido nitrogenado y por lo tanto es uno de los principales contaminantes de las zonas costeras (Kumar, *et al.*, 2002).

El quitosán es el producto derivado de la N-deacetilación de la quitina (Gupta *et al.*, 2000). Químicamente el quitosán es una sustancia similar a la celulosa pudiendo obtenerse de la N-deacetilación de la quitina mediante métodos químicos (Shin, 1993) y enzimáticos (Lee, 2000).

La quitina y el quitosán son de gran interés comercial, su contenido de nitrógeno es elevado (6.89 %) comparado con sustitutos de celulosa sintética (1.25%) (Kailash, *et al.*, 2000).

El desarrollo de las aplicaciones comerciales de la quitina, quitosán y sus derivados, se ha expandido recientemente, y se espera que siga en aumento conforme se conozcan y determinen su potencial ya que ha ido en aumento.

La enzima quitosanasa se emplea para la producción de los oligosacáridos de quitosán. Estos oligosacáridos han tenido un aumento de interés debido a que

pueden ser empleados en áreas como la farmacéutica, médica, alimentaria, cosmética, etc.

Las quitosanasas han sido encontradas en una gran variedad de microorganismos incluyendo bacterias y hongos. Las quitosanasas de plantas las cuales proveen un sistema de defensa contra reacciones de ataques por hongos patógenos, han sido recientemente estudiadas por Nogawa, *et al.*, (1997).

La mayoría de las bacterias y hongos secretan quitosanasas extracelularmente (Monaghan, 1973), mientras que las plantas lo hacen de manera intracelular (Grenier, 1991). Escasa información en la literatura menciona el uso de enzimas quitosanasas para la producción de oligosacáridos de quitosán, ya que la forma reportada más común de obtenerlos es el método químico o físico, por lo que presentan un área de oportunidades mediante la producción y la caracterización de quitosanasas microbianas para la producción de oligosacáridos de quitosán altamente solubles en agua.

Palabras clave: quitosanasas, ambiente extremo, actividad enzimática.

Justificación

El campo de producción de oligosacáridos de quitosán por las vías tanto química como enzimática se encuentra en un nivel de subdesarrollo en nuestro país.

Pocas investigaciones muestran el interés del aprovechamiento de los residuos de la industria pesquera para la producción de quitosán y sus derivados.

Los oligosacáridos de quitosán son de gran importancia en la industria, por lo que a nivel mundial, existe una gran demanda en un mercado con alto grado de explotación principalmente en áreas como cuidado de la salud, alimentación y bebidas, recubrimiento de alimentos, cosméticos, agricultura, tratamiento de aguas, separación e inmovilización y cultivo celular; además de ser los únicos derivados de la quitina y quitosán que son solubles en agua, lo que amplía sus aplicaciones en diversas áreas.

La aplicación de nuevos procesos de producción de estos compuestos tiene gran importancia; siendo los microorganismos una fuente alternativa y viable para la producción de la enzima quitosanasa.

En la actualidad la producción de oligosacáridos de quitosán por métodos químicos son costosos y altamente contaminantes, por lo que se propone el empleo de un método biológico, amigable con el medio ambiente para la obtención de los mismos.

El valle de Cuatrociénegas, Coahuila ha sido objeto de diversas investigaciones debido a sus características de condiciones extremas medioambientales, las cuales hacen que los microorganismos aislados de este ecosistema sean de interés para la producción de enzimas más resistentes a factores externos medioambientales.

Hipótesis

Es posible la obtención de una quitosanasa extracelular a partir de células de *Bacillus* sp, aisladas de ambientes extremos del valle de Cuatrociénegas, Coahuila para ser empleada en la producción de oligosacáridos de quitosán altamente solubles en agua.

Objetivo General

Obtención de una quitosanasa extracelular de 5 cepas de *Bacillus* sp. provenientes de ambientes semi-desérticos extremos del valle de Cuatrociénegas, Coahuila para la producción de oligosacáridos de quitosán.

Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento microbiano en función del tiempo de 5 cepas de *Bacillus* sp. aisladas del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.
- Seleccionar las cepas bacterianas con actividad quitosanasa.
- Diseñar un medio de cultivo específico para la producción de quitosanasa.
- Determinar el contenido de proteína extracelular de los extractos enzimáticos obtenidos.
- Determinar la actividad quitosanasa de los extractos obtenidos de los cultivos celulares.

Capítulo II

Revisión de literatura

1. Cuatrociénegas

El valle de Cuatrociénegas localizado en la zona central de Coahuila, se considera el humedal más importante del desierto Chihuahuense y uno de los más importantes en México. En este valle subsisten una gran cantidad de especies endémicas, por lo que el 7 de noviembre de 1994 fue declarada área natural protegida en la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna (Espinoza, *et al.*, 2005).

1.1 Generalidades

El Valle de Cuatrociénegas se encuentra ubicado en el estado mexicano de Coahuila, tiene una altura de 740 m snm, el valle está rodeado por montañas de hasta 3000 m de altitud. Es considerado una reserva ecológica debido a que en él existe flora y fauna única, y otras especies endémicas (Espinoza, *et al.*, 2005).

El Área de Protección de Flora y Fauna de Cuatrociénegas tiene una superficie de cerca de 85,000 ha y se localiza entre las coordenadas 26°45'00" y 27°00'00" de latitud norte y 101°48'49" y 102°17'53" de longitud oeste (Figura 1). Es parte del municipio de Cuatrociénegas, Coahuila, que cuenta con una población de 13,465 habitantes (Espinoza, *et al.*, 2005).

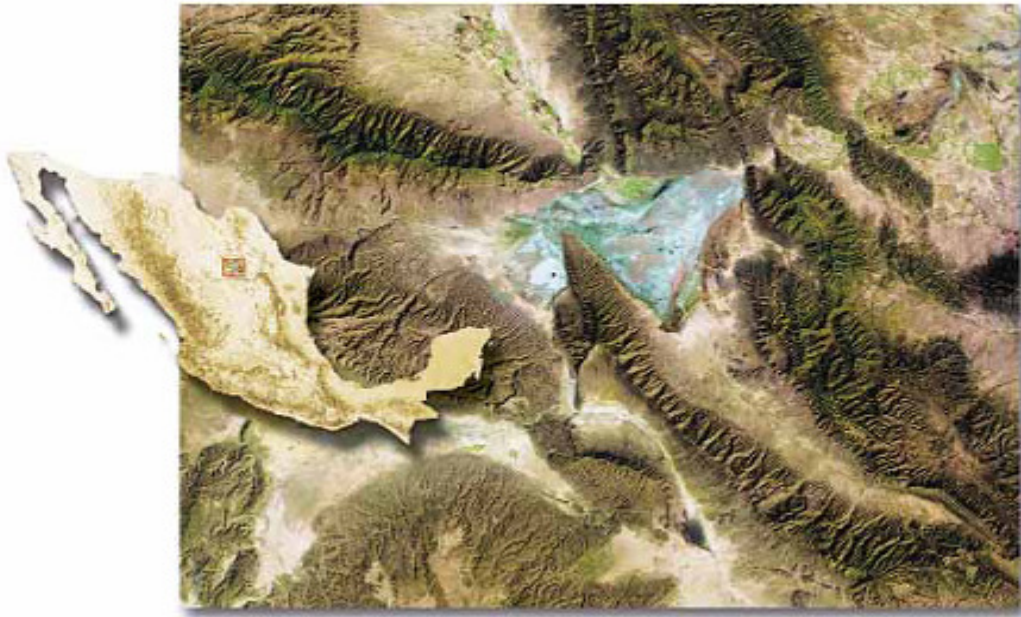


Figura 1. Imagen de satélite del área de Cuatrociénegas y zonas adyacentes.

Varias pozas distribuidas a lo largo del valle como la Poza de la Becerra, la Poza Azul, la Poza del Churintze han sido protegidas por el hombre ya que estudios anteriores han señalado que contienen gran cantidad de especies de vida marina y microbiológicas (estrematolitos) únicas (Souza, 2004).

Recientes investigaciones han documentado que la biodiversidad que existe en dicho valle incluye 70 especies endémicas de vertebrados acuáticos, distribuidos a lo largo y ancho del ecosistema terrestre. Estos ecosistemas acuáticos incluyen la vida y existencia de estrematolitos y de otras comunidades microbianas que forman parte importante de la cadena alimenticia (Minckly, 1992).

El color azul verdoso de las pozas se debe a algas microscópicas llamadas estromatolitos (Figura 2). Los estromatolitos no son algas microscópicas sino comunidades microbianas dentro de las cuales hay algas microscópicas o cianobacterias. El color azul también puede deberse a pigmentos que producen dichas comunidades (Souza, 2004).



Figura 2. Fotografía de la Poza de la Becerra (estromatolitos).

2. Microorganismos

Son todos aquellos diminutos seres vivos que individualmente son demasiado pequeños, que no se pueden ver a simple vista. Estos grupos incluyen todas las bacterias, hongos (levaduras y hongos filamentosos), virus, protozoos y algas microscópicas (Brock, 2003).

Normalmente tendemos a asociar a estos pequeños organismos, con infecciones, enfermedades como el SIDA o deterioro de alimentos. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos contribuyen de una forma crucial en el bienestar de la tierra ayudando a mantener el equilibrio de los organismos y en el medio ambiente. Los microorganismos de agua dulce y salada son la base de la cadena alimentaria de los océanos, lagos y ríos; los microorganismos del suelo destruyen los productos de desecho e incorporan el gas nitrógeno del aire en compuestos orgánicos, así como reciclan los productos químicos en el suelo, agua y aire; ciertas bacterias y algas juegan un papel importante en la fotosíntesis (proceso que genera nutrientes y oxígeno a partir de la luz solar y CO₂ siendo un proceso crítico para el mantenimiento de la vida), los hombres y algunos animales que dependen de las bacterias que habitan en sus intestinos para llevar a cabo la digestión y síntesis de algunas vitaminas como la K y algunas del complejo B (Comerio, *et al.*, 2007).

Los microorganismos también tienen aplicaciones industriales ya que se utilizan en la síntesis de productos químicos como son: acetona, ácidos orgánicos, enzimas, alcohol y muchos medicamentos.

La industria alimentaria también emplea microorganismos en la producción de vinagre, bebidas alcohólicas, aceitunas, mantequilla, queso, yogurt y pan. Además las bacterias y otros microorganismos ahora pueden ser manipulados para producir sustancias que ellos normalmente no sintetizan a través de la técnica llamada Ingeniería Genética. Las bacterias pueden producir importantes sustancias terapéuticas como insulina, hormona de crecimiento humana entre otras, como en el caso de las carnes en donde bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Microbacterium*, transforman algunos aminoácidos libres: de los azufrados (cisteína y cistina) se generan anhídrido sulfuroso, indol del triptófano y amonio de muchos otros (Badui, 1999).

Las bacterias pueden ser clasificadas de acuerdo a tinción, ya que esta dependerá de la composición química de la pared celular de las mismas como a continuación se menciona.

2.1 Bacterias Gram positivas

Las células son esféricas, en forma de bacilos filamentosos. La reproducción celular se da generalmente por fisión binaria, algunas producen esporas como forma resistente (endosporas y esporas). Son procariotas no fotosintéticas, quimiosintéticas heterótrofas que incluyen a las aerobias, anaerobias, anaerobias facultativas y microaerofilicas (Bergey, 2000).

2.2 Bacterias Gram negativas

Son procariotas que poseen una pared celular compleja. Contienen una delgada capa de peptidoglicano (contiene ácido murámico presente en todas las bacterias) y una variedad de otros componentes entre la capa del peptidoglicano. La forma de las células pueden ser esférica, ovalada, bacilos lineales o curvos, helicoidales o filamentosos, algunas de estas formas pueden ser encapsuladas. Su reproducción la llevan a cabo mediante fisión binaria, aunque *Pleurocapsales* muestra fisión múltiple. Los miembros de esta división pueden ser fototróficos o no fototróficos (litotróficos y heterotróficos) que incluyen las bacterias aeróbicas, anaeróbicas, anaerobia facultativa y microaerofílicas (Bergey, 2000).

2.3 Extremófilos

El termino extremófilo fue usado por primera vez por Macelroy en 1974, un ambiente extremo es relativo ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otro organismo. Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperatura muy elevadas de 55-121°C o muy bajas de -2-20°C, alta salinidad NaCl de 2-5M, o pH arriba de 8 (Ramirez, *et al.*, 2006).

La biodiversidad microbiana actualmente es empleada en la industria de la biotecnología ya que enzimas termofílicas de temperaturas de hasta 350-400 °C se comportan como moléculas proteicas estables. El Valle de Cuatrociénegas alberga especies que se encuentran bajo condiciones extremas de medio ambiente, como lo son: las altas concentraciones de sal, baja concentración de fosforo, altas temperaturas, etc., (Mauricio-Benavides, 2007).

2.3.1 Características generales

Existen muchos microorganismos que crecen en ambientes donde hay condiciones extremas, por ejemplo, bacterias que crecen a temperaturas por encima de los 105°C, los cuales se pegan en las paredes de las chimeneas submarinas, otras de ellas crecen en ambientes extremadamente salinos, como las recientemente encontradas en una laguna hipersalina de las Bahamas que son capaces de crecer en presencia del 74 % de *NaCl*. También se podrían mencionar microorganismos que crecen en condiciones muy ácidas o muy alcalinas o en condiciones muy frías (Castro, 1997). Actualmente se definen diferentes grupos de organismos extremófilos de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se desarrollan preferentemente (Figura 3). La mayor parte de estos pertenecen a un nivel bajo de organización siendo la mayoría de estructura celular procarionte, miembros de los actuales dominios *Archaea* y *Bacteria*.

Dentro de este variado mundo de microorganismos extremófilos, los psicrófilos son uno de los grupos que se ha centrado más la atención en los investigadores de los últimos años, estos se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo con el grado de adaptación a las bajas temperaturas:

- a) Psicrófilos estrictos u obligados (aquellos que pueden crecer a 0 °C presentan una velocidad de crecimiento optima a menos 15°C y no pueden crecer a temperaturas mayores de 20°C).

- b) Psicrófilos facultativos o psicrotolerantes: microorganismos que pueden crecer a 0°C pero que presentan temperaturas óptimas superiores a los 15°C (Comerio, *et al.*, 2007).

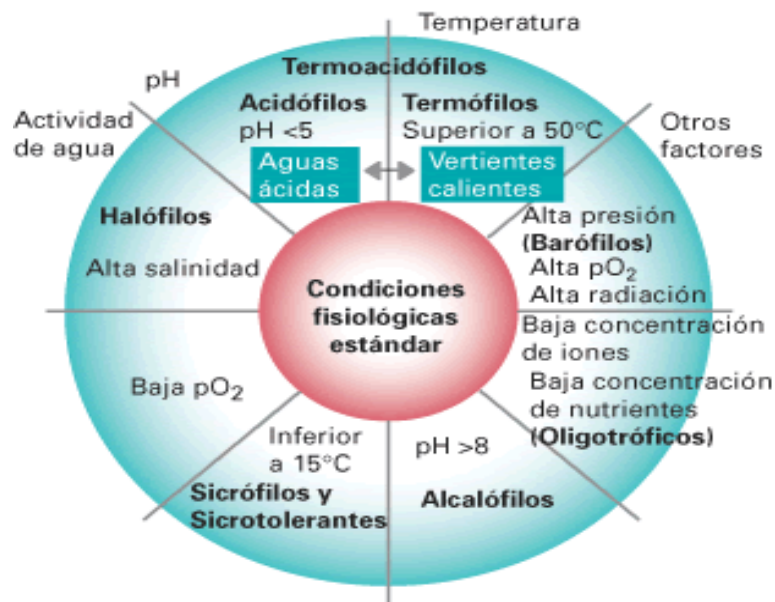


Figura 3. Diferentes condiciones ambientales de crecimiento de microorganismos extremófilos.

3. Género *Bacillus*

Este género está formado por bacilos Gram positivos rectos productores de esporas, aerobios o anaerobios facultativos, muy ubicuos en la naturaleza y capaces de sobrevivir en condiciones extremas (Gomes, 2008).

3.1 Características generales

Son bacilos Gram positivos, aerobios e inmóviles, miden de 1-3 hasta 4 µm, forman esporas resistentes al calor, a cambios ambientales y a desinfectantes químicos por periodos de tiempos moderados; las cuales pueden ser destruidas por tiempos de 10 minutos a ebullición.

Se agrupan formando cadenas, la mayoría son saprófitos que prevalecen en el suelo, agua, aire y diversos vegetales.

Producen esporas elipsoidales, cilíndricas, con paredes centrales delgadas, esporangios no claramente abultados. Crecen a pH 6.0, y producen acetilmetilcarbinol (Breed, *et al.*, 1957).

3.2 Morfología

La tabla 1 muestra algunas características de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* sp. El género de *Bacillus* comprende distintas bacterias productoras de esporas. La mayor parte de los miembros de este género son microorganismos saprófitos como por ejemplo *B. cereus* y *B. subtilis* que prevalecen en el suelo, agua, aire y sobre otros vegetales (Salomon E. *et al.*; 2001).

Tabla 1. Características morfológicas de algunos microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*.

Microorganismo	Características
<i>Bacillus subtilis</i>	Hidrolizan almidones
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>aterrimus</i>	Pigmentos negros o solamente carbohidratos
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>niger</i>	Pigmento negro o solamente tirosina
<i>Bacillus pumilus</i>	No hidrolizan almidón no forman nitritos
<i>Bacillus coagulans</i>	No crecen a pH 6.0
<i>Bacillus firmus</i>	Caseína digerida. No forman ureasa
<i>Bacillus lentus</i>	Caseína no digerida. Produce ureasa

Fuente: Salomon, *et al.*; 2001

3.3 Especies

Entre las especies bacterianas de interés industrial están las del ácido acético (*Gluconobacter* y *Acetobacter*) que pueden convertir el etanol en ácido acético, el género *Bacillus* es productor de antibióticos (gramicidina, bacitracina, plimixina), proteasas e insecticidas (Cheremisinoff, 1944).

Existen más de 34 especies de este género pero las más importantes para el hombre son el *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*.

3.3.1 *Bacillus anthracis*

B. anthracis posee una cápsula de ácido glutámico, un agente polipeptídico capsular, un agente somático en su pared celular, una toxina de carbunco con componentes termolábiles. Las colonias no hemolíticas de 4-5 mm de diámetro con apariencia de vidrio esmerilado y bordes irregulares, se extienden sobre el medio de cultivo (Realpe, 2002).

3.3.2 *Bacillus cereus*

Es un bacilo formador de esporas responsable de intoxicaciones alimentarias siendo su hábitat natural el suelo; contamina con frecuencia cereales, leche, cremas pasteurizadas y especias entre otros alimentos (Gomes, 2008).

3.3.3 *Bacillus subtilis*

En 1872 Ferdinand Cohn halló y nombró a una bacteria como *Bacillus subtilis*, dicho organismo representaría a un largo y diverso género de bacterias las cuales fueron agrupadas dentro de la familia de Bacillaceae.

La familia Bacillaceae está integrada por seis géneros de bacterias formadoras de endosporas. Los *Bacillus* se distinguen de las demás bacterias formadoras de endosporas por ser estrictamente aeróbicos o aerobios facultativos y usualmente positivos a la catalasa (Sneath, 1986).

3.4 Metabolismo microbiano

El término metabolismo se refiere al conjunto de reacciones que tienen lugar en la célula teniendo tres funciones específicas:

- Obtener energía química del entorno, almacenarla para luego utilizarla en diferentes funciones celulares.
- Convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana.
- Formar y degradar moléculas necesarias para funciones celulares específicas.

La tabla 2 muestra algunas de las características en el metabolismo de microorganismos pertenecientes a éste género.

Tabla 2. Características de crecimiento a diferentes temperaturas para microorganismos del género *Bacillus*

Temperatura	Descripción
Hipertermófilos	Su temperatura óptima de crecimiento esta por encima de los 80°C y el máximo crecimiento de cultivos puros se ha llegado a dar entre 110 y 113°C.
Termófilos	Crece por encima de los 45°C
Mesófilos	Temperatura alrededor de 37°C frecuentemente capaces de crecer en rangos de alrededor de 25-45°C.
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5°C y con temperaturas máximas de 20°C. frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 10°C
Facultativos	Temperatura optima de 15°C llegando a alcanzar los 20°C y también capaces de crecer hasta por debajo de los 0°C

Fuente: Ramírez *et al*, 2006.

Varias enzimas termoestables son requeridas en la industria de detergentes, alimentos, textiles, piel, papel y farmacéutica. En la industria de los detergentes y jabones para la ropa se utilizan biocatalizadores que quiten las manchas a bajas temperaturas, mientras que en tratamientos de esterilización de ropa para quirófano se prefiere un jabón que tenga biocatalizadores que funcionen a altas temperaturas. La industria de los cueros y las pieles requieren enzimas que degraden las proteínas de la piel de los animales en condiciones de alta salinidad, en cada caso se empleara enzimas provenientes de diferentes termófilos. (Ramírez, *et al*, 2006).

3.5 Enzimas que producen

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria son enzimas extracelulares de origen microbiano destacando (Tabla 3). Los microorganismos del género *Bacillus* sp son capaces de producir un sin número de enzimas, dentro de las que destacan:

3.5.1 Amilasas

Son aquellas enzimas que degradan el almidón. Se utilizan en la obtención de azúcares fermentables en la cervecería y en la obtención de bebidas alcohólicas, así como también en la modificación de la harina de panadería.

Destacan las α -amilasas producidas por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae* y las glucoamilasas son producidas por *Aspergillus niger* (Walker y Whelan, 1960).

3.5.2 Proteasas

Producidas por algunas bacterias aisladas de sedimentos marinos, entre estos microorganismos se encuentran *Vibrio* sp. y *Pseudomonas aeuroginosa* (Florez, 2006), *Alteromonas* sp. (Sawave, 1997), *Aeromonas* sp. (Kuk, 2005).

3.5.3 Pectinasas

Se utilizan en la producción de zumos de frutas y elaboración del vino, estas enzimas elevan el rendimiento del zumo obtenido disminuyendo la viscosidad; mejoran la extracción del color de las pieles, frutas y vegetales macerados. Son producidas por hongos *Aspergillus* y *Bacillus* que se encuentran dentro de la familia enzimática identificadas como PL1 son las más numerosas y presentan pesos moleculares de entre 30-50 kDa, la única familia que pertenece la pectina liasa de *Bacillus* descritas hasta la fecha (Sakamoto *et al*, 1996), PL2, PL3 de peso molecular de 20-25 kDa, PL9 contiene 2 pectato liasas que presentan un peso molecular superior a 75 kDa y PL10 con peso molecular de 35 y 140 kDa (Soriano, 2004).

3.5.4 Celulasas

Las enzimas celulíticas producidas por las bacterias del género *Bacillus* presentan básicamente actividad de endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa; pero tienen una característica particular, en especial la producida por *Bacillus subtilis* y es la resistencia a ser inhibida por la glucosa o celobiosa (Ahmed, *et al*, 2001; Ovando-Chacon y Waliszewski, 2005; Carrillo, 2003).

3.5.5 Lipasas

La mayor parte de las lipasas son producidas por bacterias patogénicas, como por ejemplo la fosfolipasa C es un mejor determinante patogénesis de muchas bacterias Gram negativas, respectivamente han sido clonados dos grandes lipasas a partir de *A.hydrophila* y también encontradas en *E.coli* ambas lipasas son de 70 kDa (Pamberton, 1997).

3.5.6 Glucoisomerasa

Convierte la glucosa en fructosa y se utiliza para la obtención de jarabes de maíz ricos en fructosa, se obtiene de *Bacillus coagulans*, *Streptococcus rubiginosus*, *Ectinoplanes missouriensis* y *Flavobacterium arborescens*, (Cheremisinoff, 1944).

3.5.7 Quitinasas

La digestión enzimática es realizada mediante dos pasos: primero la quitina es hidrolizada extracelularmente por una endo- y exo-quitinasa que se encargan de romper la cadena polimérica formando un polímero más pequeño denominados oligosacáridos, principalmente diacetilquitobiosa, la cual puede ser posteriormente transformada dentro de la célula e hidrolizada a N-acetilglucosamina por una acetilglucosamina (Ashori, 2005). *Aeromonas* sp produce gran cantidad de diferentes quitinasas extracelulares, se reporta también que *Bacillus circulans* produce quitinasa A1 (Watanabe, 1990).

Tabla 3. Enzimas producidas por microorganismos del género *Bacillus* sp.

	Enzima	Aplicación
Microorganismos termófilos	Proteasas	Detergentes, alimentos, elaboración de cerveza y panadería
	Glicosil-hidrolasas (amilasas, glucoamilasas, glucosidasas, celulasas, xilanasa)	Almidón, celulosa, quitina, pectina y procesamiento de textiles
	Quitinasas	Modificación de alimentos y productos para la salud
	Lipasas, estereasas	Detergentes, reacciones estéreo-específicas
	ADN-polimerasas Deshidrogenasas	Biología molecular Reacciones de oxidación

Fuente: Ramírez *et al*, 2006.

4. Quitina

La quitina (del griego *tunic*: envoltura) se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza después de la celulosa, siendo el segundo polisacárido más abundante. Sus fuentes principales son el exoesqueleto de muchos crustáceos, alas de insectos, paredes celulares de hongos, algas entre otros (Lárez, 2006).

La quitina fue encontrada por primera vez en 1811 por el profesor Henri Braconnot, en 1830 la aisló de insectos y le dio el nombre de quitina, el descubrimiento del quitosán en 1859 por Rouget supuso una investigación intensiva sobre estos compuestos.

4.1 Estructura

Es un amino-polisacárido catiónico, compuesto principalmente por N-Acetil-D-Glucosamina (GlcAc) unido por enlaces β -(1-4). El peso molecular de este polisacárido puede ser tan alto como 10^6 Da (Rudrapatnam, 2003). El grado de N-acetilación y el grado de polimerización son dos de los parámetros importantes que determinan el peso molecular así como de sus diferentes aplicaciones (Figura 4).

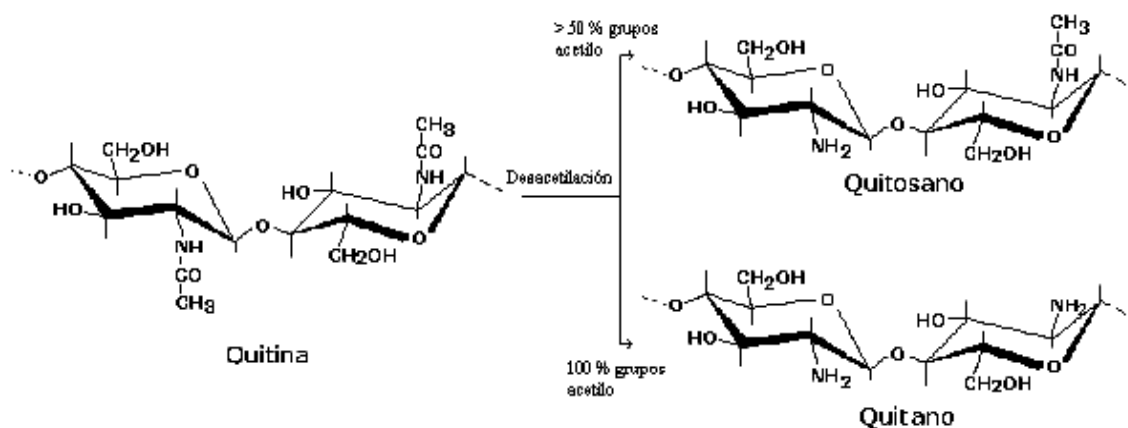


Figura 4. Estructura química de la quitina, quitosán y quitano.

4.2 Fuentes de obtención

La producción mundial de camarones, llamados también quisquillas, langostinos o gambas, se ha estabilizado en 1.5 millones de toneladas anuales, siendo India, China, Estados Unidos, Tailandia, Indonesia, México, Malasia, Japón, Vietnam y Brasil los diez principales países en la pesca de camarón.

México se localiza como el sexto productor con una captura anual de 73 mil toneladas, pero sólo el 5.7% proviene del cultivo por lo que grandes cantidades de caparazones es desechada en las marisquerías del país (Conde, 2007).

4.3 Potencial industrial

Como es el polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa su utilización en México es muy comprometedor, como lo ha sido en Japón, en donde alrededor de 250 empresas explotan la producción de la quitina.

La actividad industrial de procesado de los productos de la pesca, especialmente de crustáceos (langosta, buey de mar, centolla, cigala, langostino, gamba, entre otros) y cefalópodos (calamar) generan en la actualidad una gran cantidad de residuos que suponen un grave problema medioambiental. Los residuos de procesados de marisco contienen en general un 14-35% de quitina asociada con proteína (30-40%), lípidos, pigmentos y depósitos de calcio, estimándose por tanto una producción mundial anual de quitina en los residuos de unas 120000 toneladas (Caprile, 2005).

4.4 Mercado mundial

Liderando el mercado se encuentra Estados Unidos y Japón como lo muestra la Figura 5. Según estudios realizados por la Sociedad Asiática de Quitina (1996) el mercado mundial de quitosán en 1994 era de 1000 toneladas de las cuales 800 ton eran utilizadas en Japón, esto demuestra la gran importancia de este país como productor y consumidor (Caprile, 2005).

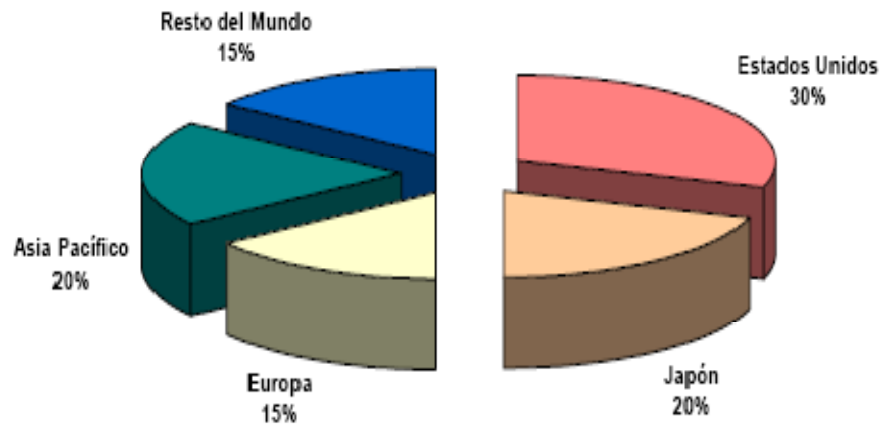


Figura 5. Producción de la quitina y sus derivados a nivel mundial.

5. Quitosán

5.1 Estructura

El quitosán es un producto natural derivado de la quitina. Químicamente el quitosán es una sustancia natural muy similar a la celulosa ya que se obtiene de la N-deacetilación de la quitina pudiendo ser mediante métodos químicos, físicos y/o enzimáticos (Synoiewick, 2003). Dos de los parámetros más importantes que influyen en la aplicación de dicho polímero son: el grado de polimerización y el grado de deacetilación, los cuales dependen del peso molecular (Tabla 4). El peso molecular de este polisacárido puede ser tan alto como 10^6 Da (Rudrapatnam, 2003).

Tabla 4. Contenido de quitina en crustáceos, insectos, moluscos y hongos

Tipo	Contenido de quitina (%)
Crustáceos	72.1 ^c
Cáncer (cangrejo)	64.2 ^b
Carcinus (cangrejo)	35.0 ^b
Paralithodes (King cangrejo)	14.0 ^a
Callinectes (cangrejo azul)	69.1 ^c
Crangon (camaron)	28.0 ^d
Camarón Alasakan	69.8 ^c
Nephrops (langosta)	60-67 ^c
Homarus (lanosta)	58.3 ^c
Insectos	
Periplaneta (cockroach)	2.0 ^d

a) Peso cuerpo húmedo, b) peso orgánico de cutícula, c) peso total de cutícula seca, d) peso seco de pared celular (Rudrapatnam, 2003).

5.2 Obtención

El quitosán es un polisacárido natural obtenido por deacetilación de la quitina. 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) (Peniche, 2006).

La obtención del quitosán se produce por la desacetilación de la quitina y se puede realizar mediante procesos químicos y enzimáticos (Vilches, 2005).

El proceso químico se puede llevar acabo de dos formas: homogénea y heterogénea.

La desacetilación homogénea comienza con un pre-tratamiento de hinchamiento y la eventual disolución completa de la quitina en frío (-0°C) mediante la utilización de una relación de quitina a NaOH de 1:10 (p/p).

Luego se somete a desacetilar a temperaturas cercanas a la del medio ambiente durante periodos largos de tiempo. Esto permite que 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 en algunos casos se lleva a cabo en soluciones acuosas concentradas de bases como NaOH o KOH, bajo condiciones severas (100-160°C); en las condiciones en que se pueden llevar a cabo pueden reducir la longitud de la cadena, por este motivo es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo aislando el producto en cada etapa (Mim, *et al.*, 1983). Para disminuir la pérdida del peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante (Domard y Rinaudo, 1983).

En 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, hecho muy apreciado para aplicaciones biomédicas (Figura 6).

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 la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de quitina insoluble y por lo tanto es necesario un pre-tratamiento (Vilches, 2005).

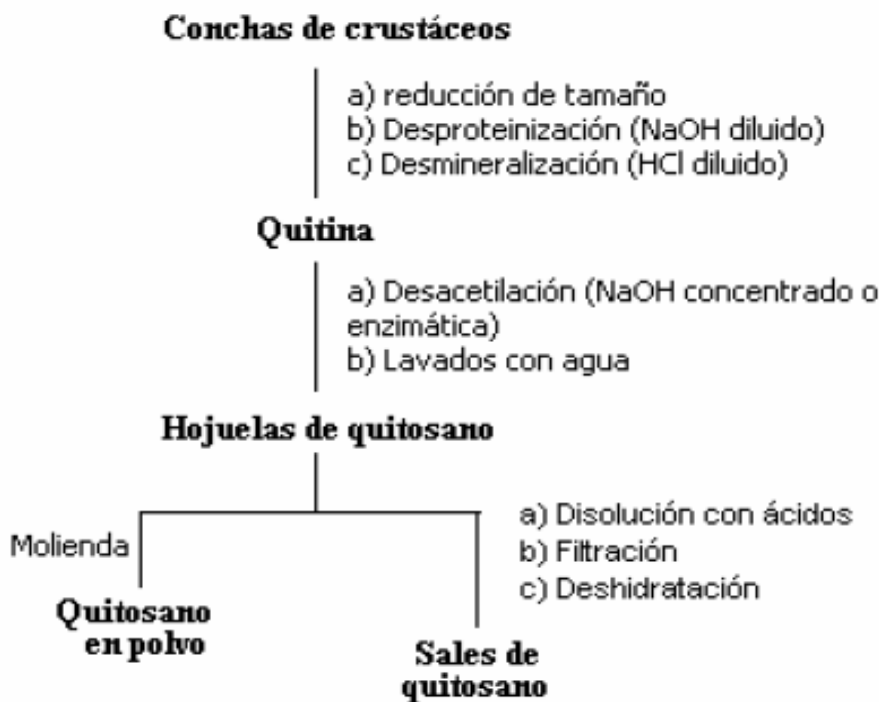


Figura 6. Esquema de la obtención de quitina y quitosán.

5.3 Solubilidad del quitosán

La presencia de grupos amino a lo largo de la cadena de quitosán permite la disolución de esta macromolécula en disoluciones de ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos. En medios ácidos diluidos tiene lugar el siguiente equilibrio: $\text{NH}_2 + \text{HA} \rightleftharpoons \text{NH}_3^+ + \text{A}^-$. Al adquirir carga positiva la amina, el quitosán aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas formando sales ya que el pK_a del grupo amino del quitosán es 6.5 (Tommeras, *et al.*, 2001).

El quitosán es soluble en ácidos inorgánicos como el clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico y perclórico diluidos. En cambio es insoluble en ácido sulfúrico diluido. También es insoluble en la gran mayoría de disolventes

orgánicos. El quitosán al igual que la quitina es insoluble en agua (Charles-Rodríguez, 2008).

5.4 Aplicaciones

A continuación se comentara algunas de las aplicaciones que tiene actualmente este material en nuestro país:

5.4.1 Agricultura

En el área de agricultura se emplean como:

- Recubrimiento de semillas con películas de quitosán para su conservación durante el almacenamiento.
- Sistemas liberadores de fertilizantes.
- Agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas (Lárez, 2006).

5.4.2 Medicina

Hoy en día se sabe que la quitina y el quitosán han sido usados desde la antigüedad para acelerar el saneamiento de heridas. Los antepasados de los coreanos usaban la quitina en el tratamiento de abrasiones (obteniéndola a partir de las plumas de calamar) y los antepasados de los mexicanos aplicaban quitosán para la aceleración de la cicatrización de heridas (obteniendo de las paredes celulares de algunos hongos). En la actualidad entre los usos médicos más sencillos de estos materiales se mencionan los siguientes:

- Producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina.
- Producción de gasas y vendajes tratados con quitosán.
- Cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras (Lárez, 2006).

5.4.3 Tratamientos de aguas residuales

Es una de las áreas más importantes debido a que el quitosán y la quitina son sustancias ambientalmente amigables. Entre los usos que se hacen en la actualidad con estos biomateriales y algunos de sus derivados, en este campo tenemos:

- Coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad.
- Floculante para la remoción de partículas coloidales solidas y aceites de pescado.
- Captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas. Algunos copolímeros de injerto de quitosán muestran alta efectividad para remover metales pesados especialmente los ácidos alquenodioicos (Kin, *et al.*, 1997).

5.4.4 Cosméticos

Se emplea en:

- Fabricación de capsulas para adelgazar (atrapa grasas = Outfat).
- Aditivo bactericida en jabones, champús, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, etc.
- Agente hidratante para la piel, debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la resequedad.
- Además el quitosán forma una película que ayuda a dosificar otros principios activos.

5.4.5 Biosensores

Son numerosas las aplicaciones del quitosán en este campo, especialmente como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico. Algunos ejemplos son:

- Sensor para glucosa en sangre, basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre el quitosán, usando adicionalmente Azul de Prusia.
- Sensor para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales basado en la inmovilización de la enzima tirosina.
- Sensores basados en la inmovilización de nanopartículas espacialmente ordenadas (Wu, 2005).

5.4.6 Industria alimentaria

Se emplea como aditivos en los alimentos, por sus propiedades como espesantes, gelificantes y emulsificantes, se utilizan como mejoradoras de textura ya que fijan agua y grasa (ej: quitina cristalina). También como estabilizantes del color, como agente que previene la precipitación en el vinagre, como aditivos con características nutricionales (fibra dietética), en galletas y pan previene la disminución del volumen de la masa, como aditivo para la alimentación animal (hasta el 10% en alimentos para pollos) aumenta el crecimiento (Teisaire, *et al.*, 2007).

5.4.7 Industria papelera

Se emplea en la elaboración del papel, aumento del rendimiento de la pulpa y de la capacidad de retención de agua, como adhesivo, tratamiento de superficie en el papel (mayor resistencia y mejor fijación de la tinta), papel fotográfico, separación de productos y recuperación de componentes (Teisaire, 2007).

5.4.8 Tecnologías de membranas

Para la separación de componentes (filtros moleculares), en columnas cromatográficas, como absorbentes de encapsulación, para el control de permeabilidad, en osmosis inversa, electrodiálisis, quitina magnética y aislamiento de lisozima (Teisaire, 2007).

5.4.9 Industria textil

El quitosán se utiliza como agente para evitar el encogimiento de los tejidos y como fijador del color y para comunicar propiedades antiestáticas a las fibras sintéticas (Gacen, 1996).

5.4.10 Propiedades antimicrobianas del quitosán

La actividad antimicrobiana del quitosán depende de factores como el tipo de quitosán (grado de desacetilación, peso molecular), del pH del medio, de la temperatura, etc. El quitosán es capaz de inhibir algunas bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio* ssp 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).

6. Derivados de la quitina y quitosán

La quitina es un polisacárido uniforme que contiene grupos amino, el cual puede ser biosintetizado y biodegradado, ya que su uso no contamina el medio ambiente. El quitosán es un producto de la deacetilación de la quitina. El carboximetil-quitosán se obtiene mediante el uso de cloro etánico obteniendo un grado de sustitución por arriba del 90% (Tang, 2004).

6.1 Oligosacáridos de quitosán

Los oligosacáridos son polímeros de hasta de 20 monosacáridos. La unión tiene lugar mediante enlaces glucosídicos. Se ha establecido arbitrariamente un límite de 20 unidades para definir a los oligosacáridos (Tombs, 1998). Los oligosacáridos de 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 una hidrólisis enzimática del quitosán con el empleo de la enzima quitosanasa (Park, 2002).

6.1.1 Obtención

Los métodos de obtención de los oligosacáridos de quitosán han sido bien documentados a través del tiempo. Los principales métodos que se han desarrollado son: a) empleo de enzimas: como celulasas (Joo, 2002) y quitosanasas (Lee, 2000, 2002); b) empleos de métodos químicos como uso de reacciones con nitrato de sodio (Ha, 2000); y c) métodos físicos, como ultrafiltración (Charles-Rodríguez, 2008).

6.1.2 Principales aplicaciones

Numerosas aplicaciones del quitosán dependen de su peso molecular. El quitosán altamente polimerizado (2000-5000 Da), obtenido directamente del proceso de desacetilación de la quitina, tiene un amplio rango de propiedades funcionales; puede ser empleado como biomaterial, aditivo, agente floculante en la industria textil, en cosméticos, en materiales biomédicos y alimentos (Sanford, 1989).

6.1.2.1 Liberación de fármacos

Microesferas de complejos polielectrolíticos formados por quitosán y polímeros de cargas opuestas tienen la habilidad de liberar fármacos y otras moléculas orgánicas. Dichas microesferas son biodegradables y biocompatibles por lo que hace una forma conveniente para acarrear fármacos en un organismo (Filipovic-Grcic, 1993).

6.1.2.2 Estimulación del mecanismo de defensa en plantas

Las quitinasas son expresadas en muchas especies de plantas, incluso cuando no se encuentra presente la quitina o el quitosán en sus tejidos. Estas enzimas se encargan de proteger a la planta de infecciones por hongos patógenos que contienen en sus paredes celulares la quitina. El quitosán puede ser considerado como un promotor en el crecimiento de la planta, además de eliminar metales pesados en la producción de maíz; lo que garantiza su empleo en el suelo ya que su uso en la agricultura estimula los mecanismos de defensa de la planta contra infecciones, lo que le da una gran ventaja sobre los biocidas químicos (Hirano, 1990).

6.1.2.3 Estimulación al crecimiento celular y regeneración de tejidos

En una herida, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, siglas en inglés) es liberado para estimular el crecimiento celular. La presencia de quitosán puede acelerar la activación de la tirosinquinasa, lo cual constituye el primer paso de la señal mitogénica de la transducción del PDGF (Muzzarelli, 1989).

6.1.2.4 Prevención y tratamiento de ulcera gástrica

Se ha comprobado que el quitosán de bajo peso molecular (25-50 kDa) muestra una mejor capacidad para prevenir el daño de la mucosa gástrica inducido por el etanol (Ito, 2000).

6.1.2.5 Acción antitumoral

El quitosán puede estimular algunos componentes del sistema inmunológico de animales como los linfocitos T, macrófagos y las células “natural killer” (Suzuki, 1986).

7. Quitosanasas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas, son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos (Salomon, *et al.*, 2001).

Las quitinasas son endo- β -1,4-N-acetilglucosaminidasas que hidrolizan los enlaces β -1,4-glicosídicos de quitinas, quitodextrinas y quitosán parcialmente acetilados de forma aleatoria (Ohtakara, 1988). Están presentes en hongos, insectos, algunas bacterias y en plantas superiores. Las bacterias producen quitinasas para digerir la quitina y utilizarla como fuente de carbono y energía, mientras que en las plantas las quitinasas están involucradas en mecanismos de defensa frente a patógenos que contienen quitina. Las quitosanasas han sido definidas por la Comisión de Enzimas como enzimas que tienen la capacidad de endo-hidrolizar los enlaces β -1,4 entre los residuos de N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina en el quitosán parcialmente acetilado.

Monaghan en 1973 reportó la existencia de una quitosanasas la cual hidroliza al quitosán pero no la quitina. El quitosán generalmente es un compuesto N-acetilado, cerca del 10-20% de quitosán N-acetilado ha sido usado como sustrato para ensayos empleando quitosanasas; por otro lado, el quitosán ha sido empleado como sustrato soluble para un ensayo con una quitinasa

evaluando la producción de oligómeros producidos por el método del viscosímetro (Tracey, 1995). Sin embargo, la diferencia entre quitinasa y quitosanasa sobre el modo de acción del quitosán se sigue estudiando.

Se han reportado que el quitosán N-acetilado incrementa o disminuye la velocidad de reacción de acuerdo al grado de deacetilación y por consiguiente es posible identificar los oligosacáridos producidos.

En un estudio llevado a cabo con células de *Aeromonas hydrophila* a partir de quitosán hidrolizado se cree que la velocidad de acción desciende de acuerdo al grado de deacetilación va aumentando, pero con quitosán no hidrolizado hace que la enzima se divida en (GlcNAc)₅ y (GlcNAc)₆ se concluye así que la quitinasa a partir de este microorganismo no está asociado la actividad quitosanasa sin embargo el quitosán parcialmente N-acetilado se hidroliza por acción de la quitinasa, de acuerdo a estas diferencias que hay entre quitosanasa y quitinasa se sigue estudiando de acuerdo a su modo de acción sobre el quitosán parcialmente N-acetilado (Mitsutomi *et al.*, 1990).

Las quitinasas comúnmente son generadas por varios microorganismos. Para el uso de quitina como fuente de carbono para el crecimiento microbiano se requieren de tres tipos de enzimas: una endo-quitinasa, una exo-quitinasa y β -N-acetilglucosamidasa. La base genética para la producción de quitinasa por bacterias se ven reflejadas con investigaciones mediante el aislamiento de genes (Ueda, *et al.*, 1998).

El quitosán es hidrolizado principalmente por las quitinasas y las quitosanases, aunque también puede ser hidrolizado por enzimas comerciales como glucanasas, pectinasas, lipasas y algunas proteasas.

Se han utilizado celulasas, pectinasas, lipasas y proteasas para depolimerizar el quitosán. Entre las proteasas podemos destacar a la papaína, una proteasa particularmente atractiva debido a su origen vegetal. Otra proteasa que depolimeriza de forma eficiente el quitosán es la pronasa, una serin proteasa obtenida partir de *Streptomyces griseus*, obteniéndose quitosán de bajo peso

molecular, oligómeros y monómeros. La máxima despolimerización con pronasa tiene lugar a pH 3.5 y 37°C (Kumar, 2004).

Reportes en la literatura mencionan que *Bacillus circulans* MH-K1 y *Streptomyces griseus* UHT 6037 son productores de heteroquitoligosacaridos los cuales en la reducción final dejan residuos de D-glucosamina, así como oligosacaridos-D-glucosamina (Mitsutomi, 1992; Mitsutomi, *et al*, 1995).

Las quitosanasa se pueden categorizar de acuerdo a sus características específicas en la hidrólisis (Fucamiso, *et al*, 1997).

Las quitinasas y quitosanasa no están disponibles para aplicarlas a escala industrial, además su costo es muy elevado. La depolimerización del quitosán se puede realizar con enzimas inespecíficas (Terbojevich, *et al.*, 1996; Muzzarelli, *et al.*, 1994; Muzzarelli, *et al.*, 1997).

Las quitosanasa 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 quitosanasa.

En función de la especificidad del sustrato las quitosanasa 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).

Las quitosanasa representan una clase de enzimas hidrolíticas que se encuentran en bacterias, hongos y plantas. La diferencia entre quitinasas y quitosanasa no es clara ya que ambas tienen la capacidad de degradar el quitosán de diferentes grados de acetilación (Ohtakara, *et al*, 1988, Oswald, *et al*, 1994). Las quitinasas atacan preferentemente a polímeros altamente N-acetilados, es decir, son más eficientes con quitosán de bajo contenido de grupos N-acetilados. Las quitosanasa se pueden distinguir de las quitinasas por su bajo peso molecular aparente (Grenier, 1990).

7.1 Microorganismos que producen quitosanasas

La cepa de *Streptomyces* sp 6, produjo una quitosanasa celular inducida con glucosamina; dicha enzima fue purificada homogéneamente por Sephadex G-100 (carboximetil celulosa), esta enzima hidrolizó al quitosán pero no a la quitina, ya que mediante la cromatografía solamente detectó la di- y tri-glucosamina. Se obtuvo una máxima actividad a los 25°C y un pH entre 4.5 y 6.5. La hidrólisis del quitosán se alcanzó dentro de este rango con un máximo a 60°C. En dicho rango la inhibición se logró en concentraciones solubles de quitosán superior a los 0.5g/L y el K_m calculado por la ecuación de Lineweaver-Burke fue de 0.688g/L a un pH de 5.5. Dicha enzima previene la germinación de esporas en suspensión de la cepa *Muccor* (Price, 1975).

En un aislamiento de la cepa de *Aeromonas schubertii* se utilizó quitina en polvo para la producción de una quitinasa. Las proteínas extracelulares fueron purificadas por filtración con sulfato de amonio, una vez purificadas, estas fueron analizadas por SDS-PAGE con y sin glicol quitina resultando ser resistentes al SDS. La enzima obtenida tenía un peso molecular de 75 kDa, con una K_m de 0.29 nM $1s^{-1}$; esto fue obtenido usando quitina coloidal azufrada como sustrato, por lo que un tratamiento con etanol de esta enzima podría incrementar significativamente la actividad quitinolítica (Shang, *et al.*, 2004).

Otras quitinasas obtenidas mediante fracciones de sus puntos isoelectricos presentaron un peso molecular desde 30-38 y 110 kDa. Se recolectaron proteínas (pH de 4.8) con gran actividad quitosanasa y se cree que son de naturaleza ácida. Se realizó una prueba empleando quitina coloidal azufrada como sustrato, la cual es recomendada por su amplio rango de lineamiento en comparación con el método convencional de azúcares (Shang, *et al.*, 2004).

Las quitinasas son capaces de hidrolizar la quitina a oligómeros y monómeros de N-acetil- β -D-glucosamina. Muchos organismos son aptos para la producción de quitinasas, muchas bacterias como *Bacillus lichiniformis*, *Nocardia orientalis*, *Serrattia marcescens*, *Vibrio alginolyticus* y muchas especies de hongos como *Talaromyces emersonii*, *Streptomyces cinereoruber*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma harcianum* tienen ciertas propiedades para la producción de las mismas (Hsin, 2004).

Un estudio con *Aeromonas* sp. No. 10S-24 produjo una gran cantidad de quitinasas, la identificada como I-VIII y la β -N acetilglucoaminidasa fueron purificadas y aisladas de los sobrenadantes, las cuales codificaban para los genes de la quitinasa II y III, donde se determinaron las secuencias de nucleótidos de dichas enzimas expresadas en *E. coli* (Sutrisno, *et al.*, 2001).

Al emplear una enzima quitinolítica de *Aeromonas* sp 10S-24 se obtuvo una gran cantidad de oligosacáridos mediante la hidrólisis N-acetilada de quitosán utilizando una quitinasa II. Se utilizaron varios sustratos para determinar el sustrato específico para la purificación de las enzimas. Para ello se llevó a cabo un ensayo usando ácido acético NaOH al 0.1 M, buffer a pH 4.0 a una temperatura de 37 °C por 15 minutos (Sutrisno, *et al.*, 2001).

Se ha reportado que *Aeromonas* sp. GJ-18 produjo una quitinasa extracelular en un medio que contenía quitina disuelta. La actividad de la quitinasa fue más alta cuando el medio se mantuvo a una temperatura de 30 °C, la máxima actividad enzimática fue a los 5 días de incubación ya que conforme pasaron los días, la actividad fue disminuyendo. Dicha bacteria fue aislada de zonas costeras y se tiene que posee una gran actividad quitinolítica. Esta cepa fue empleada para la preparación de enzima cruda la cual contenía N-acetil-D-glucosaminidasa y N,N-diacetil quitobiohidrolasa. La N-acetil-D-glucosaminidasa es inactivada a temperaturas superior a los 50 °C, pero la N,N-diacetil quitobiohidrolasa resultó estable a esta temperatura.

Se ha reportado que a una temperatura de 45 °C la N-acetil-D-glucosamina produjo un mejor producto hidrolítico (94%) con un rendimiento de 74% a los 5 días y por otro lado a 55 °C se da un producto de 86% con rendimiento de 35%, por lo que se concluyó que el rango óptimo de temperatura acierta que por arriba de los 50 °C se inactiva la N-acetil-D-glucosamina (Kuk, *et al*, 2005).

Una bacteria aislada de las zonas costeras de Busan identificada como *Aeromonas* sp. J-5003 por su morfología, características bioquímicas y de cultivo, fue reportada capaz de producir dos enzimas quitinolíticas: la quitinasa y la quitobiasa. Para la producción de la quitinasa, la mayor parte de los componentes del medio de cultivo fueron quitina coloidal al 0.5%, glucosa 0.2%, extracto de levadura 0.25% y peptona al 0.25%; mientras que para la producción de quitobiasa fueron quitina coloidal 0.5%, galactosa y triptona 0.2%. Las condiciones óptimas de temperatura y pH para la producción de quitinasa y quitobiasa a partir de *Aeromonas* sp. J-5003 fueron de 30 °C y pH de 7.0 (Yong, *et al.*, 2003).

7.2 Modo de acción

Las enzimas quitinolíticas juegan un papel importante en reacciones fisiológicas, procesos de bioconversión de desechos, desmineralización de quitina en suelos y ambientes marinos, así como en protección vegetal en contra de hongos parásitos. Se ha demostrado que la producción de quitinasas utilizando desechos ricos en quitina se incrementa notablemente cuando el microorganismo productor asimila a la quitina como fuente de carbono y nitrógeno (Matsumoto, *et al.*, 2004).

7.3 Efecto del pH inicial y la temperatura

De acuerdo a las condiciones de crecimiento de *Aeromonas* sp. J-5003 a pH de 3.0-5.0; inhibe su crecimiento, ya que su producción se da únicamente a un pH de 7.0. La actividad se mantiene a pH de 8.0 con aproximadamente del 87% de conversión. Por lo general, las quitinasas producidas por bacterias presentan una mejor actividad en el rango de pH neutro (Huang, *et al.*, 1996; Kang, *et al.*, 1998; Monreal, 1969).

Capítulo III

Materiales y Métodos

El presente trabajo se diseñó en etapas de investigación para producir y cuantificar la actividad quitosanasa de células del género *Bacillus* sp. aisladas del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

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.

➤ ETAPA I: Estudio cinético de crecimiento microbiano de 5 cepas de *Bacillus* sp. aisladas del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

1.1 Aislamiento de las 5 cepas de *Bacillus* sp. del valle de Cuatrociénegas, Coahuila

Los cinco microorganismos estudiados fueron aislados por Mauricio-Benavides, *et al.*, en el 2007. En la tabla 5 se presentan los códigos de los microorganismos y el origen del aislamiento. Estos microorganismos fueron cultivados en agar nutritivo a una temperatura constante de 37°C. Se llevo a cabo una tinción de Gram para confirmar la identidad de las cepas estudiadas.

Tabla 5. Localización y códigos de los microorganismos aislados del valle de Cuatrociénegas por Mauricio-Benavides (2007).

Microorganismo	Localización	Muestra	Código
B1	Poza de los Güeros	Agua	PG-3
B2	Poza de los Güeros	Agua	PG-4
B3	Poza del Centro	Agua	PC-5
B4	Poza del Centro	Agua	PC-6
B5	Poza de los Güeros	Sedimento	LPG-23

1.2 Curva de crecimiento

En 50 mL de caldo nutritivo a pH 7.0 se inocularon 0.5 mL de suspensión celular (cada uno de los 5 *Bacillus* sp.) y se incubaron a 37°C con una agitación de 150 rpm (Lab line, Incubator Shaker). Se tomaron alícuotas en tubos Eppendorf de 1.5 mL a tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h. Las muestras fueron conservadas en refrigeración hasta su uso.

La curva de crecimiento se determinó mediante el método de turbidimetría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm usando un espectrofotómetro (Genesys 8). El análisis se llevo a cabo por duplicado.

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

Se colocó 1mL de la suspensión celular con 1mL de reactivo A y se dejaron reposar en un lapso de 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se le adicionaron 0.5 ml de reactivo de Folin 1:5, se agitó cuidadosamente y se dejó reposar por 30 minutos para finalmente leer a una longitud de onda de 750 nm. Todas las lecturas se llevaron a cabo por duplicado. La preparación de los reactivos se llevo a cabo de la siguiente manera:

Reactivos.

Solución A: 0.6 g de SDS disueltos en 12 mL de agua destilada, 6 mL de NaOH 0.8N, 6 mL de solución B.

Solución B: 5 mL de NaCO₃ al 20%, 1 mL de CuSO₄ .5H₂ O al 1%, 1 mL de tartrato de sodio y potasio y 3 mL de agua destilada.

Se preparó una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (Sigma) como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. 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	1.25×10^{-2}
2	0.2	0.8	2.50×10^{-2}
3	0.3	0.7	3.75×10^{-2}
4	0.4	0.6	5.0×10^{-2}
5	0.5	0.5	6.25×10^{-2}
6	0.6	0.4	7.50×10^{-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}

➤ ETAPA II: Selección de cepas bacterianas con actividad quitosanasa

2.1 Cultivo y proliferación de los microorganismos

2.1.1 Preparación del medio específico

Para cada una de las cepas se utilizaron oligosacáridos de quitosán de mediano peso molecular (30-100 kDa) como única fuente de carbono en una concentración de 10 g/L obtenidos en el laboratorio (Charles-Rodríguez, 2008).

Se preparó un medio mineral a pH 7.0, el cual fue esterilizado a 120°C/15 lb durante 15 minutos. La fuente de carbono (OQ) fue adicionada una vez que el medio se encontraba a temperatura ambiente, los OQ fueron esterilizados bajo luz ultravioleta por 6-12 h y posteriormente filtrados por filtros de celulosa de 0.45 µm

(Millipore, 0.45 μm) para su posterior adición al medio. La composición del medio de cultivo se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Composición química del medio de cultivo específico para la producción de quitosanasa extracelular

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

2.1.2 Curva de crecimiento en medio específico

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 50 mL de medio líquido con un inóculo inicial de 0.5 mL, se incubaron (Lab line, Incubator Shaker) a 37°C con una agitación de 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 1.5 mL en tubos Eppendorf a tiempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h de fermentación; dichas muestras se conservaron a -5°C para posteriormente analizarlas mediante la técnica de turbidostato leyendo a una longitud de onda de 590 nm. Este procedimiento se siguió para cada uno de los 5 bacilos. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

2.2 Determinación de proteína extracelular por el método de Lowry modificada por Peterson

Las muestras obtenidas a los diferentes tiempos fueron centrifugadas a 12,000 rpm (Biofuge Heraeus centrifuge) por 15 minutos. El sobrenadante fue separado y empleado como extracto enzimático a diferentes tiempos de fermentación para la determinación de proteína mediante el método de Lowry modificado por Peterson (ver metodología 1.3). Este ensayo se realizó para cada uno de los 5 bacilos estudiados.

➤ ETAPA III: Estudio de la actividad enzimática de los extractos obtenidos

3.1 Cuantificación de actividad enzimática

La actividad quitosanasa se determinó mediante la liberación de azúcares reductores teniendo como patrón una curva de calibración (tabla 8) (Somogyi-Nelson, 1956) empleando quitosán como sustrato.

Tabla 8. 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

3.1.1 Preparación de sustrato

Se pesó 1.25 g de quitosán (Amicogen, Corea del Sur) para posteriormente disolverlos en 25 mL de buffer ácido acético acetato de sodio (AAANa) 50 mM con pH de 5.0.

3.1.2 Cinética enzimática

Se colocaron 240 μ L de sustrato, se le agregó 10 μ L de extracto enzimático obtenido a los diferentes tiempos de fermentación. La producción de oligosacáridos de quitosán se monitoreó a tiempos de 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos a temperaturas de $39\pm 2^{\circ}\text{C}$. Todas las cinéticas se llevaron a cabo por duplicado.

3.2 Producción de oligosacáridos de quitosán

El producto obtenido de la cinética enzimática se cuantificó mediante la liberación de azúcares reductores. La técnica consiste en colocar 250 μ L de muestra con 250 μ L de reactivo 1 (Somogy), hervir en un baño de agua por 10 minutos. Después de retirar del agua hirviendo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 250 μ L del reactivo 2 (Nelson). Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente por 10 minutos para finalmente agregar 4 mL de agua destilada. Las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 690 nm en un espectrofotómetro (Geneys 8) (anexo 1).

Capítulo IV

Resultados y Discusiones

- ETAPA I: Estudio cinético de crecimiento microbiano de 5 cepas de *Bacillus* sp. aisladas del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

1.1 Aislamiento del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila de las 5 cepas de *Bacillus* sp.

El aislamiento e identificación de los microorganismos, del género *Bacillus* sp., realizada por Mauricio-Benavides *et al.*, 2007 se corroboró mediante tinción de Gram (Figura 7). Los microorganismos fueron aislados de la Poza de los Güeros a 102°10'36'' de longitud y 26°51'36'' de latitud, mientras que la Poza del Centro está localizada a 102°09'15'' de longitud y 26°50'44'' de latitud. Todos los microorganismos pertenecen al cepario del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Las células del género *Bacillus* son microorganismos Gram positivos esporulados en forma de bastoncillos, la mayoría de los miembros de este género son microorganismos saprofitos como por ejemplo el *B.cereus* y *Bacillus subtilis* que prevalecen en el suelo, agua, aire y sobre otros vegetales (Salomón. *et al*, 2001), la figura 7 muestra las fotografías de las células de Bacilos que fueron aisladas del Valle de Cuatrociénegas las cuales fueron codificadas como PG-3, PG-4, PC-5, PC-6 y LPG-23, este género obtiene la fuente de energía y nutrición de medios sintéticos que contengan azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes etc., como única fuente de carbono, amoníaco como única fuente de nitrógeno, gracias a su capacidad de degradar estos compuestos se pueden emplear en tratamientos de aguas etc (Brock *et al*, 1991).



Figura 7. Morfología microscópica de las células de *Bacillus* sp. aisladas del valle de Cuatrociénegas teñidas mediante la técnica de Gram

Como podemos observar, las características microscópicas detectadas en las cepas empleadas, corresponden a morfologías típicas de los microorganismos reportados de la familia de *Bacillus*, dentro de las características que se pueden mencionar esta la presencia de esporas intracelulares, comúnmente polares. (Bergey, 2000)

1.2 Curva de crecimiento

Con la finalidad de estudiar el comportamiento y desarrollo de los microorganismos empleados se realizó una cinética de crecimiento microbiano a cada cepa, siguiendo la metodología mencionada previamente. Una curva de crecimiento microbiano normal por lo general presenta cuatro fases: a) adaptación o lag, b) fase exponencial o log, c) latencia o estacionaria y d) fase de muerte celular.

La cepa PG-3 mostró una fase de adaptación en las primeras 24 h alcanzando su fase exponencial al final de las mismas (24-48 h). Se detectó una breve fase estacionaria ya que inmediatamente el microorganismo entró en fase de muerte celular con una disminución gradual en la lectura de turbidez detectada (Figura 8a). Tomando en cuenta lo anterior y comparándolo con los datos de proteína celular obtenidos (Figura 8b) podemos ver que la máxima producción de biomasa celular se observó a las 48 h con una velocidad específica de crecimiento de 0.002 OD/h (Figura 8c).

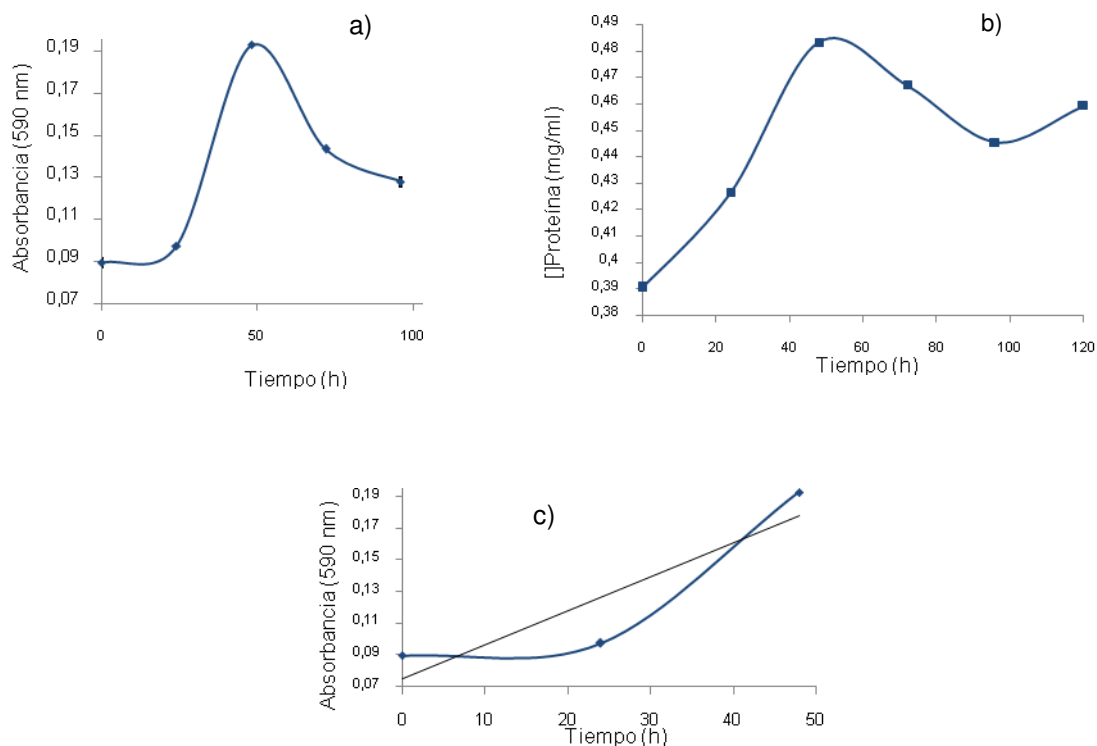


Figura 8. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PG-3 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular, y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento

La figura 9 muestra el crecimiento en caldo nutritivo del PG-4 donde se puede observar que alcanzó su fase exponencial en las 96 h; tomando en cuenta el comportamiento general, esta fase no se presenta hasta las 96 h, sino desde el inicio de la cinética y termina hasta las 96 h aproximadamente; sin embargo, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.0026 OD/h.

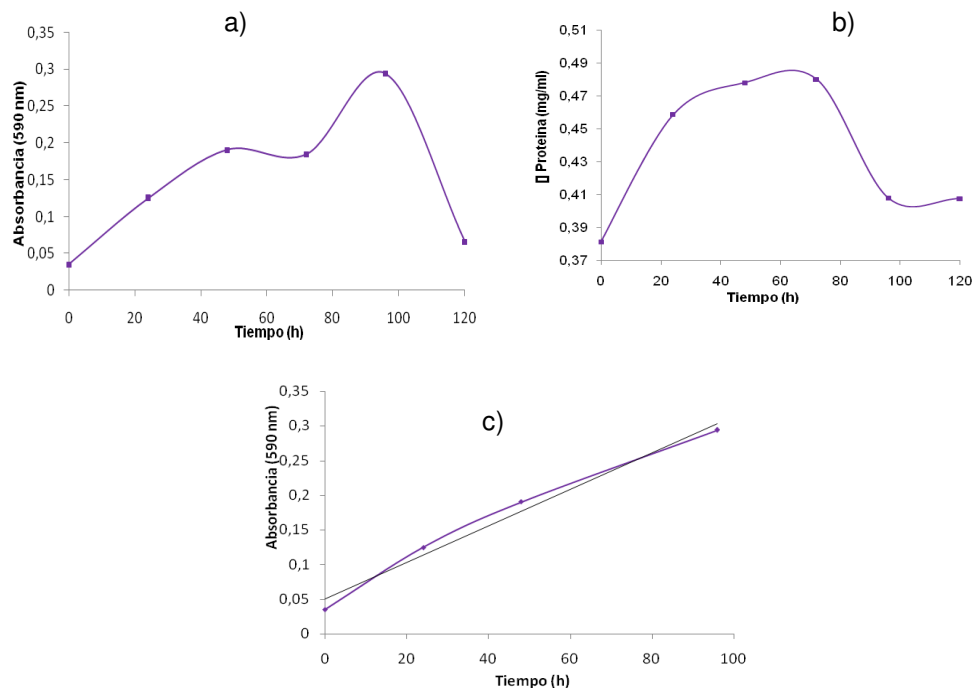


Figura 9. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PG-4 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular, y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento

La curva de crecimiento en el PC-5 al igual que PG-4, no presentó una fase de adaptación (figura 10) entrando de lleno en su fase de crecimiento exponencial, la cual duró hasta las 48 h, tiempo al cual comenzó un descenso en las lecturas

detectadas de turbidez, indicando el inicio de la fase de muerte celular comparando esta grafica con la de determinación de proteína nos muestra que la máxima producción se da a las 96 h con una cantidad de 0.4800 mg/mL de biomasa celular, lo que significa que el microorganismo a pesar de que entro en muerte celular por agotamiento de nutrientes, el Bacilo iba secretando proteína hasta su completa fase de decadencia como se muestra en la figura 10b.

Se reporta e la literatura que la especie de *Bacillus* de bacterias Gram positivas producen hasta de 1-4 mg/mL de proteína como el caso del *Bacillus subtilis* (Hemila, 1989). La velocidad especifica de crecimiento de 0.0023 OD/h muy similar a los dos bacilos PG-3 y PG-4 (Figura 10c).

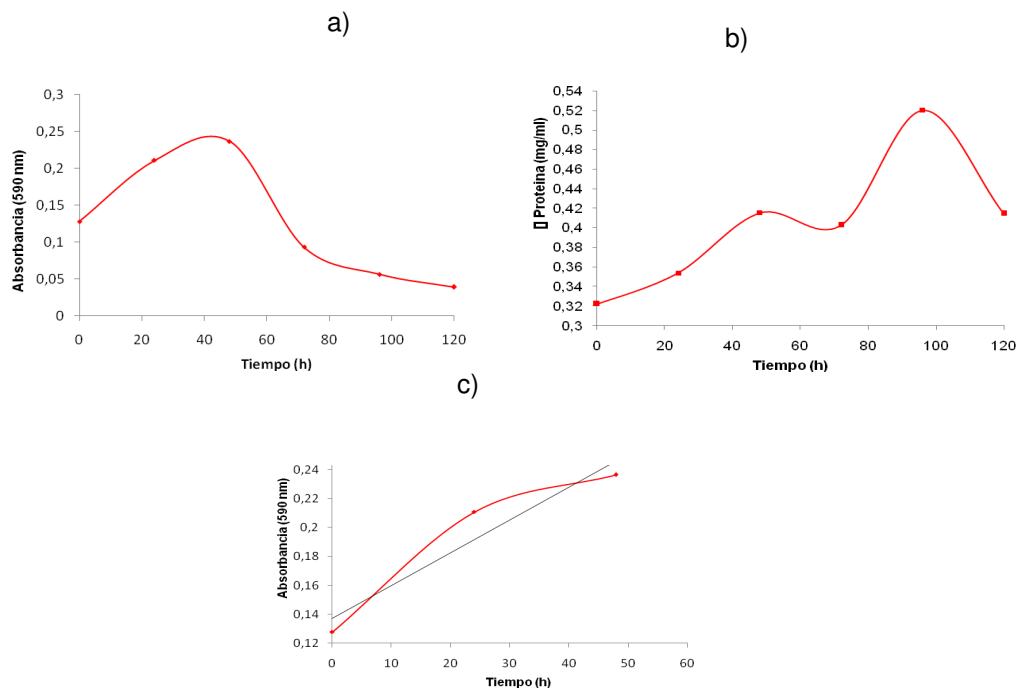


Figura 10. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PG-5 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular, y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento

El bacilo PC-6 no presenta una fase de adaptación ya que desde las primeras 24 h se puede apreciar un crecimiento exponencial alcanzando su máxima fase a las 48 h y la razón se debe a que dicho bacilo a generado los metabolitos para la digestión de los nutrientes del medio, alcanzando su máxima producción celular a las 96 h (figura 11b), y haciendo una comparación con la (figura 11b) de determinación de proteína muestra una semejanza con el Bacilo PG-3 ya que la máxima producción de proteína es en las 48 h con una cantidad de 0.4697 mg/mL. Se observó una velocidad específica de crecimiento de 0.002 OD/h (figura 11c).

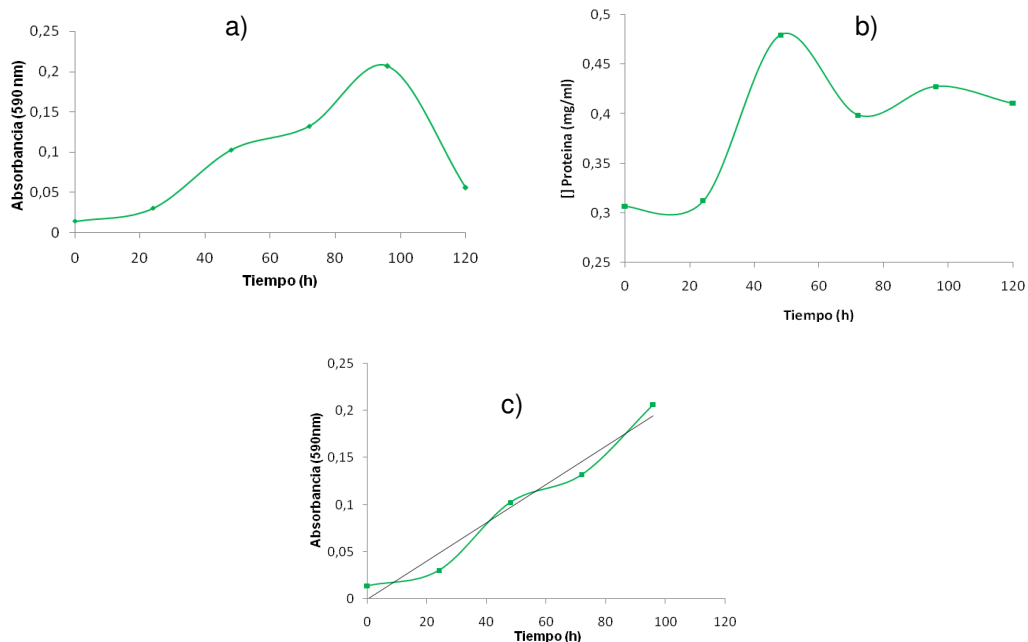


Figura 11. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células PC-6 en caldo nutritivo a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular, y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento

En la figura 12 se muestra el comportamiento de LPG-23 no presenta fase de adaptación, detectándose un crecimiento exponencial desde el inicio, lo cual es indicativo de una fácil asimilación de los nutrientes del medio de cultivo, alcanzando así su máximo para posteriormente entrar en una relativa fase estacionaria hasta las 96h, puesto que hubo un ligero descenso, pero no tan marcado como se aprecia después de este tiempo, donde la fase de muerte celular se hizo presente en las 48 h con una velocidad específica de crecimiento de 0.0044 OD/h.

Considerando la gráfica de concentración de proteínas, vemos que hubo un incremento gradual y constante de la cantidad de proteína presente desde el inicio hasta las 96 horas, esto va en relación con lo determinado en la gráfica de turbidez, ya que aunque a las 48h se detiene su crecimiento exponencial, durante la fase estacionaria sigue habiendo multiplicación de células aunque en menor escala y muchas otras tienden a morir, por lo que al determinar la cantidad de proteína presente se cuantifica en las células vivas, como las muertas, además de la proteína extracelular presente en el medio.

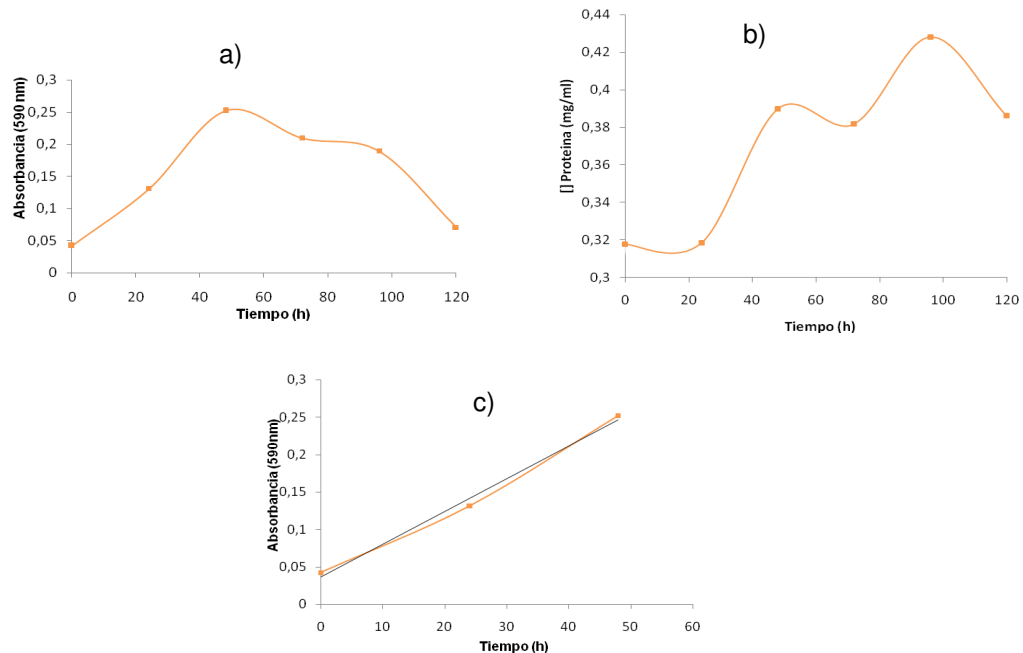


Figura 12. Estudio cinético de crecimiento microbiano de células LPG-23 en caldo nutritivo
a) Curva de crecimiento por turbidez, b) Curva cinética de cuantificación de proteína celular, y c) Determinación de velocidad específica de crecimiento

Como se puede apreciar en la figura 13 todas las cepas inician su crecimiento casi inmediatamente a excepción de la cepa PG-3, la que tuvo una fase de adaptación de 24 h. Tomando en cuenta que el medio de cultivo empleado contiene nutrientes fácilmente asimilables y empleados para el cultivo de un gran número de microorganismos, sin embargo se debe tomar en cuenta que estas bacterias fueron aisladas de un ambiente poco convencional, por lo que sus preferencias nutricionales pueden variar y lo que para nosotros son las mejores condiciones de crecimiento, para ellos no lo son. Esto puede explicar el porqué uno de los microorganismos empleados presentó una fase de adaptación al medio para después desarrollarse exponencialmente.

Las cepas PC-6 y PG-4 presentaron comportamientos muy similares, con tiempos de fase de crecimiento exponencial similares, alcanzando su máximo a las 96h. Tomando en cuenta los datos obtenidos podemos decir que el comportamiento de los microorganismos analizados en su mayoría es diferente en cuanto a su crecimiento, lo cual puede ser de importancia para analizar la capacidad de los microorganismos para la asimilación de los nutrientes indicando que cada uno de estos tienen un metabolismo diferente.

Reportes en la literatura de cepas del género *Bacillus* muestran una fase exponencial a partir de las 16 h como es el caso de *Bacillus subtilis* identificado como AF 1 (Podile *et al*, 1985).

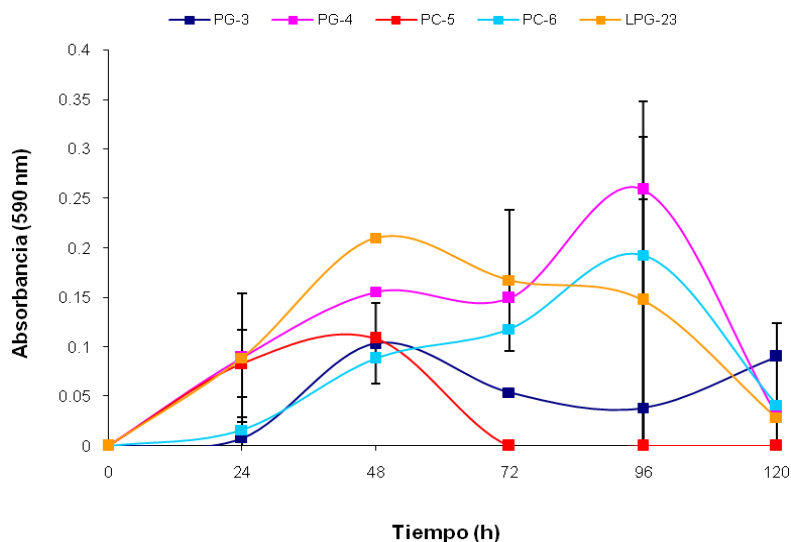


Figura 13. Grafica comparativa de las curvas de crecimiento microbiano en caldo nutritivo de 5 cepas de *Bacillus* sp. aisladas del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

1.3 Determinación de proteína celular por el método de Lowry modificado por Peterson

Los resultados obtenidos durante esta etapa de la investigación se presentaron de manera individual para cada cepa en la etapa anterior con la finalidad de comparar el comportamiento de los microorganismos tomando tanto curvas de turbidez como de proteína celular, por lo que solo se realizara a continuación un estudio comparativo de los datos de proteína obtenidos en las 5 cepas empleadas.

La figura 14 muestra el contenido de proteína celular para las 5 cepas empleadas en el estudio cinético en la cual se observa una similitud en el PG-3, PC-6 ya que ambas alcanzan su máxima producción de biomasa celular a las 48 h, mientras que el PC-5 y LPG-23 producen mayor cantidad de biomasa a las 96 h a excepción de la cepa PG-4 a las 72 h. De acuerdo a lo mencionado y con la curva de turbidez estos resultados son semejantes en algunas de las cepas como es el caso del PG-3 y la cepa PG-4 ya que las diferencias no son significativas, mientras que el PC-5, PC-6 y LPG-23 tienen diferentes comportamientos.

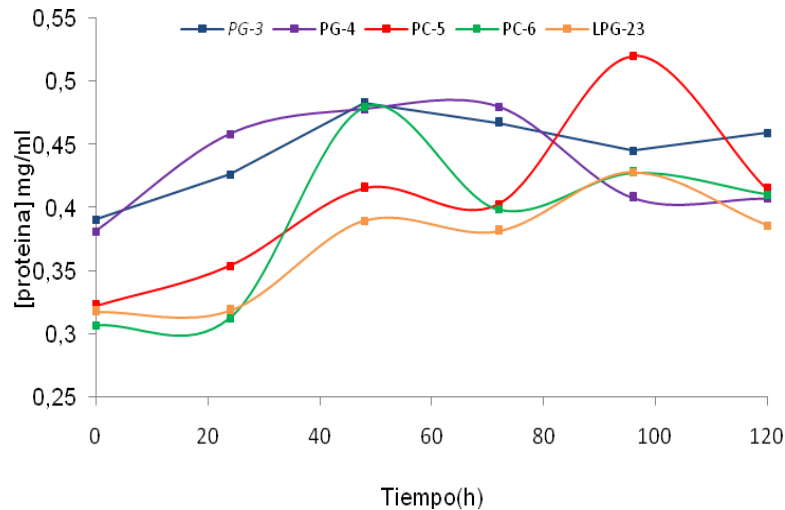


Figura 14. Gráfica comparativa del contenido de proteína celular del cultivo de las diferentes cepas de *Bacillus* sp en caldo nutritivo.

ETAPA II. Selección de cepas bacterianas con actividad quitosanasa

2.1 Cultivo y proliferación de los microorganismos

2.1.1 Curva de crecimiento

Los resultados de curva de crecimiento microbiano en medio específico por la técnica de turbidez, no se presentaron debido a que no se obtuvieron datos confiables y que concordaran con los obtenidos por proteína, ya que muchas de las lecturas se salieron de rangos de detección (cerca de cero), sin embargo la discusión y análisis de los datos de crecimiento se realizó con las curvas de proteína celular.

2.2 Determinación de proteína extracelular por el método de Lowry modificado por Peterson

En la figura 15 se muestra una gráfica comparativa de la concentración de proteína extracelular determinada para los 5 bacilos analizados, como se puede observar, la producción de proteína extracelular se incrementó de manera constante en todos los casos, a excepción del bacilo PC-6 que mostró un incremento en las primeras 24 horas solamente, después se mantuvo la misma concentración con cambio significativo.

La cepa PG-3 no comenzó a registrar variación de proteína extracelular hasta después de las 72 horas, para incrementar este valor de manera constante y obtener los más altos valores detectados de proteína a las 148h; un comportamiento similar se observó en la cepa LPG-23 con la diferencia de que el retardo de producción de proteína extracelular fue de 24 horas solamente, sin embargo el incremento fue constante a partir de este tiempo. El *Bacillus* PG-4 también tuvo un comportamiento parecido a los 2 bacilos mencionados anteriormente, con un letargo en la producción de proteína extracelular de 48h y posteriormente un incremento constante pero menos pronunciado que el caso de PG-3.

La cepa PC-5 también tardó 24 horas en presentar incremento en proteína extracelular, sin embargo el incremento de la misma en función del tiempo es acelerada y comparable con la que presentó PG-3, esto hasta las 96h donde la concentración de proteína comenzó a descender, siendo esta cepa la única que registro este fenómeno dentro del tiempo que la cinética duró. Obteniéndose así la máxima producción de proteína extracelular, la cual fue de 0.49 mg/L para PG-3, 0.42 mg/mL para PG-4, 0.429 mg/mL para PC-5, 0.406 mg/mL para PC-6 y 0.461 mg/mL para LPG-23. La literatura menciona que la cantidad de proteína

extracelular (quitosanasa) en *Bacillus cereus* fue de 1.998 mg/mL y de 1.989 mg/mL para el caso de *Aeromonas* sp. (Charles-Rodríguez, 2008).

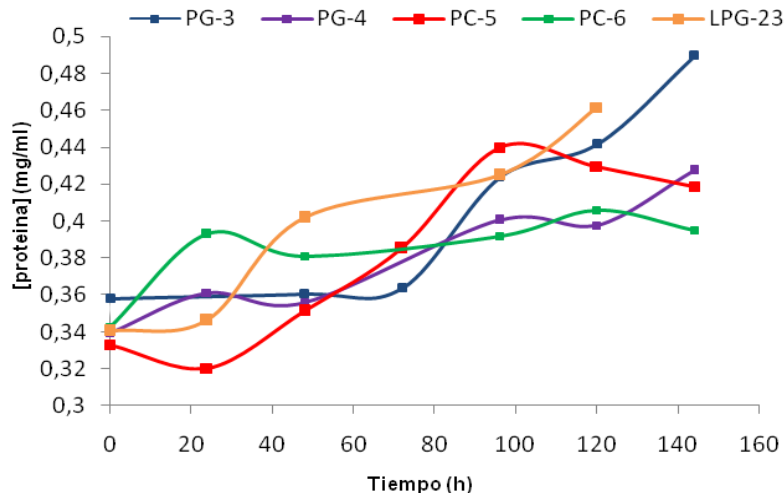


Figura 15. Grafica comparativa de las concentraciones de proteína extracelular obtenidas del cultivo de los 5 *Bacillus* sp en medio específico con oligosacáridos de quitosán

Tomando en cuenta los datos obtenidos, se realizó un estudio comparativo de los diferentes valores de proteína calculados y la velocidad de crecimiento específica calculada para todas las cepas (tabla 9). Como podemos observar, la velocidad de crecimiento específica es similar en todas las cepas a excepción de la cepa LPG-23 que dobla el valor de μ obtenida para el resto de los microorganismos, después de 72 h de fermentación. En la mayoría de los casos la mayor producción de proteína extracelular se presenta en las fases finales de crecimiento exponencial y previo a entrar en fase estacionaria, a diferencia de la cepa PC-6, ya que durante el inicio de la fase log, se comienza a producir la mayor concentración de proteína extracelular. La relación de proteína celular de cada cepa, se realizó en etapas anteriores (ver 1.2.1).

Tabla 9. Analisis comparativo de los datos de proteina celular, extracelular y velocidad de crecimiento especifica de las 5 cepas de *Bacillus* estudiadas

Cepa	Fase exponencial	Max. prod. de proteína celular	Max. prod. de proteína extracelular	Valor μ (OD/h)
PG-3	48 h	48 h	48 h	0.002
PG-4	96 h	72 h	72 h	0.002
PC-5	48 h	96 h	48 h	0.002
PC-6	96 h	48 h	24 h	0.002
LPG-23	48 h	96 h	72 h	0.004

De acuerdo con la tabla anterior tambien podemos apreciar las diferentes horas de fermentacion para la maxima produccion de proteina celular en las diferentes cepas analizadas, como se observa existe una similitud en el bacilo PG-3 y PC-6 ya que ambas alcanzan una maxima produccion a las 48h, al igual que las cepas PC-5 y LPG-23 que presentan la maxima a las 96h de fermentacion, mientras que el PG-4 se comporta diferente ya que lo alcanza a las 72h con lo cual se tiene que unas de estas cepas lo presentan en las fases finales a escepcion del PC-5 y LPG-23 que lo prsentan en las 48 h de la fase exponencial maxima.

ETAPA III. Estudio de la actividad enzimática de los extractos obtenidos, mediante azucares reductores

3.1 Producción de oligosacáridos de quitosán

En la figura 16 se muestra la cinética de actividad enzimática del extracto de la cepa PG-3 donde se observa un incremento en la actividad de 0.035 U/mg de proteína, a las 168 h de fermentación ya que durante las primeras 96 h no se obtuvo actividad manteniéndose a 0.005 U/mg de proteína.

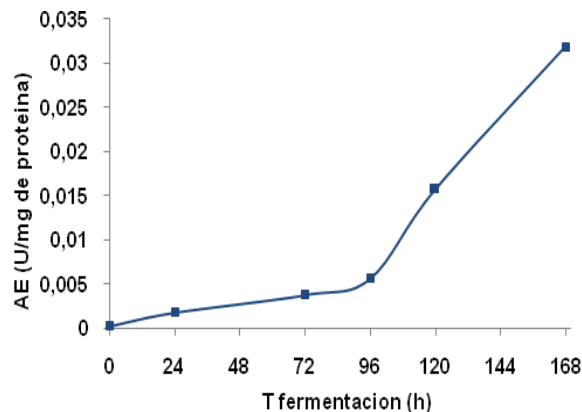


Figura 16. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático del *Bacillus* PG-3, en función del tiempo de fermentación en medio específico

Como se puede observar en la figura 17 en el bacilo PG-4, se presentó un comportamiento de campana de Gauss a lo largo del tiempo de fermentación teniendo un máximo de actividad 0.035 U/mg de proteína a las 72 h de fermentación según reportes en la literatura se obtiene una actividad quitinasa máxima de 0.32 $\mu\text{mol/ml}$ a un periodo de tiempo de reacción de 30 minutos (Guo *et al*, 2004).

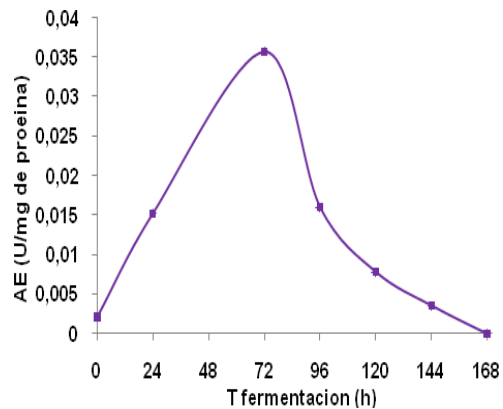


Figura 17. Grafica comparativa de actividad enzimatica quitosanasa del extracto enzimático del *Bacillus* PG-4, en función del tiempo de fermentación en medio específico.

En la figura 18 se muestran los datos de la cinética de actividad enzimática del extracto obtenido del *Bacillus* PC-5 donde se puede observar claramente que la mayor actividad se obtiene al emplear el extracto de 168 h de fermentación con una cantidad de 0.25 U/mg de proteína

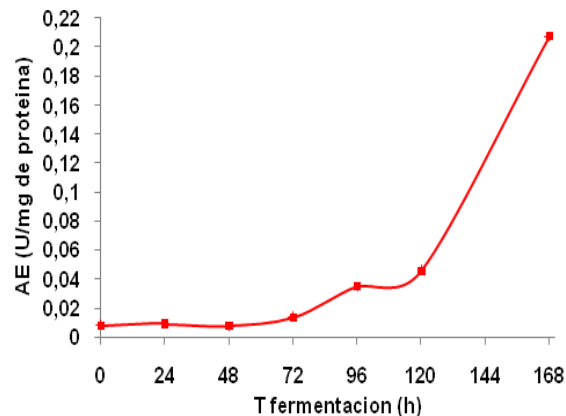


Figura 18. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático del *Bacillus* PC-5, en función del tiempo de fermentación en medio específico

Para el extracto enzimático obtenido de células del *Bacillus* PC-6 tenemos un comportamiento de campana de Gauss donde el punto máximo de actividad enzimática de extracto se obtiene a las 96 h de fermentación con 0.45 U/mg de

proteína, comportándose de una manera estable en las primeras 72 h de fermentación con un producto de actividad de 0.05 U/mg de proteína.

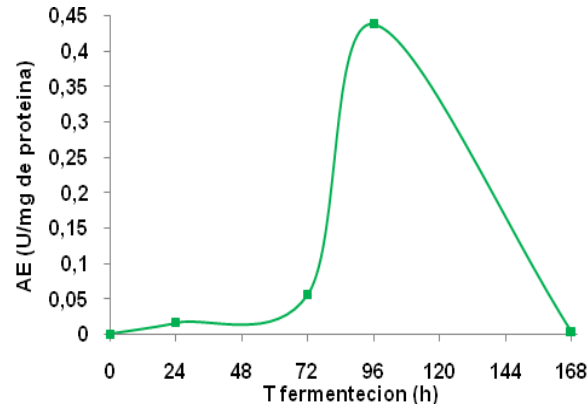


Figura 19. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático del *Bacillus* PC-6, en función del tiempo de fermentación en medio específico.

En la siguiente figura para el LPG-23 se muestran los datos de de la actividad quitosanasa donde se apreciar la misma campana de Gauss en la cual se reflejó que empleando extracto de las 96 h de fermentación se obtiene una máxima actividad de 0.009 U/mg de proteína

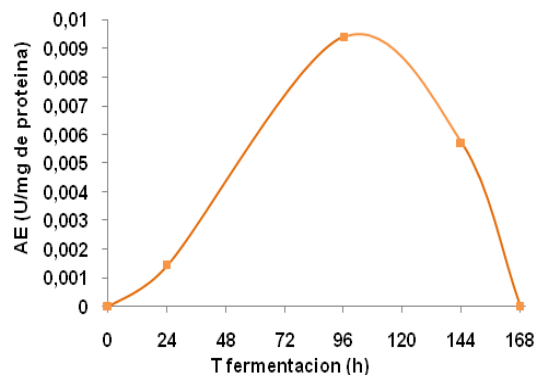


Figura 20. Grafica comparativa de actividad enzimática quitosanasa del extracto enzimático del *Bacillus* LPG-23, en función del tiempo de fermentación en medio específico

Hunag *et al*, 1996 y Wu *et al*, 2001 afirman que *Aeromonas schubertii* es un microorganismo que secreta quitinasa ya que llevaron a cabo ensayos para cuantificar la actividad quitinasa de la misma obteniendo una actividad de 0.17 ppm/AR a las 96 h en un periodo de reacción de 30 minutos.

Se ha reportado en la literatura que durante la producción de oligosacáridos de quitosán a nivel laboratorio midiendo la viscosidad en función del tiempo se tiene que a los 90 minutos (tiempo de reacción) de estar en contacto el sustrato con la enzima (endo-quitosanasa) comercial Chimax 035, la viscosidad de los oligosacáridos obtenidos es muy baja, lo que significa que los oligosacáridos de quitosán obtenidos son de bajo peso molecular por lo tanto altamente solubles en agua (Charles- Rodríguez, 2008), por otro lado incubar la enzima a 50°C por 23 h se cree que hay actividad enzimática de 30% más baja que a 37°C lo que indica que la temperatura es un factor muy importante para la actividad enzimática (Maritnou *et al*, 1995).

Reportes en la literatura indican que para la actividad quitinasa en *E. coli* JM 109 protegiendo las células plasmídicas pCA8 fue de 5.5 mU/ml en dicha prueba se uso medio de cultivo que contenía ampicilina, incubando a 37°C por 24 h (Hueda *et al*, 1998)

De acuerdo a las figuras anteriores de los diferentes bacilos se recomendaría que el bacilo PG-4, PC-5 y PC-6 sean más aptas para la producción de enzima, comparada con la literatura así también los PG-3 y LPG-23 aunque en menor grado de actividad.

En la tabla 10 se muestran las diferentes velocidades de actividad quitosanasa para cada bacilo, en la cual se puede observar que el bacilo PC-5 tiene una velocidad de 0.105 ppm AR/h en las 168 h de fermentación y el PC-6 una velocidad de 0.172 ppm AR/h a las 96 h de fermentación lo cual nos indica que estos dos bacilos son los que generan una actividad más rápida aunque existe la diferencia en el tiempo de fermentación

Tabla 10. Análisis comparativo de velocidad inicial de formación de producto (AR) de los extractos enzimáticos obtenidos de los 5 *Bacillus* sp analizados

T fermentación (h)	Vo (ppm AR/h)				
	PG-3	PG-4	PC-5	PC-6	LPG-23
0	0.0001	0.0007	0.0026	0.0002	0
24	0.0007	0.0055	0.0029	0.0065	0.0005
48	0.003	0.0007	0.0026	0.0002	0.000
72	0.0014	0.0115	0.0052	0.0196	0.000
96	0.0024	0.0064	0.0153	0.172	0.004
120	0.007	0.0031	0.0196	0.000	0.0015
144	0.0037	0.0015	0.0098	0.0007	0.0024
168	0.0155	0.000	0.105	0.0015	0.000

Haciendo un estudio comparativo (tabla 10) en las velocidades de formación de producto obtenidos se observa que el PC-6 presenta una velocidad específica de 0.172 ppm de AR/h concuerda con la actividad presentada por *Aeromonas schubertii* que es de 0.17 ppm de AR/h (Hunag *et al*, 1996 y Wu *et al*, 2001).

Capítulo V

Conclusiones

Las cinco cepas de bacilos aislados del Valle de Cuatrociénegas son capaces de producir enzima quitosanasa empleando oligosacáridos de quitosán como única fuente de carbono e inductor de la enzima.

La mayor actividad enzimática se puede apreciar claramente en el *Bacillus* PC-6 con una máxima actividad producida a las 168 h de crecimiento celular (0.45 U/mg proteína), seguida por PC-5 con 0.25 U/mg proteína, seguidos por PG-3 y PG-4 con 0.035 U/mg proteína a las 72 h de fermentación y finalmente LPG-23 con 0.009 U/mg proteína.

La mejor actividad enzimática es dada por el *Bacillus* PC-6 a las 168 h de fermentación.

La enzima quitosanasa inducida por los 5 bacilos sp aislados de ambientes semidesérticos extremos es efectiva para la producción de oligosacáridos de quitosán ya que dichas cepas fueron capaces para la hidrólisis del quitosán.

El efecto de hidrólisis de la enzima sobre el quitosán se da en un tiempo corto con una velocidad inicial (V_0) de formación de producto alta (0.172 ppm AR/h) presentadas por PC-6.

Capítulo VI

Referencias Bibliográficas

1. Ashori Alireza, Warwik Raverty, Jalaluddin Harun. (2005). Effect the addition on the
2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (2000). USA. Pag. 341-350.
3. Hemila, H., L. M. Glode, and I. Palva. (1989). Production of diphtheria toxin CRM228 in *B. subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 65:193-198.
4. Brock, Thomas y Madigan, Michael. (1991). Microbiología. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Mexico.
5. Brock. (2003). Biología de microorganismos, Revista 3ra Edición
6. Caprile Maria Daniela. (2005). Obtención y Utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de crustáceos. Dirección Postal: España 626- 8000 Bahía Blanca
7. Charles-Rodriguez *et al*, (2008). Chitosanase production by a new bacterial source Reseach Journal of Biological Science 3(8): 957-963.
8. Chiang, C. L., Chang, C. T., & Sung, H. Y. (2003). Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMRNK1. Enzyme and Microbial Technology, 32, 260–267.
9. Comerio M. Ricardo, Tarapow Marcelo, C. Vásquez Susana, P Mac Cormack Walter. (2007). Bacterias Adaptadas al Frio. Revista ciencia de hoy en línea. Vol 17 No. 99
10. Conde Monica. (2007). Revista ambiente plástica.
11. Domard, A., and M. Rinaudo. (1983). Preparation and Characterization of fully deacetylated chitosan. Int J Biol Macromol 5:42-52

12. Espinoza L, Escalante A, Eguiarte Luis y Souza V. (2005). El mar en el desierto y su importancia para la conservación. Biodiversitas No. 58 7-11
13. Filipovic-Grcic, J., Jolsenjak, I. (1993). Microspheres of human serum albumin with barbiturates: effect of drug partition coefficient on preparation and drug release. J. Pharm. Pharmacol.45:349-399
14. Fukamiso Tamo and Brzezinski Ryszard. (1997). Chitosanase from *Streptomyces* sp. Strain N174: a comparative review of its structure and function
15. Gacén J y Gacén E.L. (1996). Quitina y quitosano: Nuevos materiales textiles. Boletín Intexter (U.P.C.) No.110
16. Gomes JP Marcos. 2008. Microbiología clínica. Area bacteriológica. 3:225
17. Goycoolea, F. M. (2004). About the gelation of chitosan-glycerol phosphate system. III Simposio Iberoamericano de Quitina. Cordoba, España
18. Grenier, J. Benhamou, N. and Asselin, A. (1991). Colloidal gold-complexed chitosanase: a new probe for ultrastructural localization in fungi. J. Gen. Microbiol., 137, 2007-15
19. Grenier, J., Asselin, A. (1990). Some pathogenesis related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. Mol. Plant. Microb. Interact. 3, 401-407
20. Ha, B.J., Parck, J. K., (2000). A study on the formation of vesicle by chitosan oligosaccharide derivate. J. of the society of cosmetic scientist of Korea
21. Hee Kuk Ju, Jin Jung Woo, Hyun Jo Gyung, Seob Ahn Joon, Yong Kim Kil y Dong Park Ro. (2005). Selective preparation of N-acetyl-D-

- glucosamine and N,N'-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp. (27):7-11
22. Hirano, S., et al. (1990). Chitinase activity of some seeds during their germination process, and its induction by treating with chitosan and derivatives, in chitin and chitosan Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications, G.S. Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford, editors. Elsevier Applied Sci.: Londres. 743-747
23. Hsin Guo Shang, Kuan Chen Jeen, Chien Lee Wen. (2004). Purification and Characterization of extracellular Chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Enzyme and Microbial Technology*. 35:550-556
24. Huang, J-H, C-J Chen, Y-C Su. (1996). Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*. *J. of Industrial microbiology*. 89-95
25. Ito, M.A. Ban., M. Ishiara. (2000). Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 82:218-225
26. Jannatipur, M., R. W. Soto-Gil, L. C. Childers, and J.W. Zynskind. (1987). Translocation of *Vibrio Harveyi* N,N'-diacetylchitobiose to the outer membrane of *E. coli*. *J. Bacteriol* 169: 3785-3791
27. Joo, D.S., Lee, J.C., Kim, O.S., Cho, S.Y. (2002). Preparation condition of chitooligosaccharides by cellulose using response surface methodology. *J. Korean fish.soc.*
28. Kailash C. Gupta y Mejeti N. V. Ravi Kumar. (2000). An Overview on Chitin and Chitosan Applications with an Emphasis on Controlled Drug Release Formulations. *Rev. Macromol. Chem.Phys.* C40: 203-308
29. Kin Y. (1997). Advance chitin. *Science*. 2:837-844
30. Kuk, J. H. , W.J. Jung., G.H. Jo., J.S. Ahn., K. Y. Kim., and R.D. Park. (2005). Selective preparation of N-acetyl-D-glucosamine and N,N'-

- diacetylchitiobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp. *Biotechnology letters*. 27:7-11
31. Kumar Dutta Pradip, V. Ravicumar M.N. and Dutta Joydeep. (2002). Chitin and Chitosan for Versatile Applications, Vol. C42.No.3, pag. 307-354
32. Larez Velázquez Cristóbal. (2006). Quitina y quitosán: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*. 1(2):15-18
33. Lee, K. S., Choi, M. R., Lim, J.S. (2000). Development of coencapsulating technology for the production of chitooligosaccharides. *Biotech. Bioprocess Eng.*
34. Martinou A, Kafetzopoulos D, and Bouriotis. (1995). Chitin Deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes, 273:235-242
35. Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S & Shirai K. (2004). *Process Biochem.*
36. Mauricio-Benavides, J,E, et al. (2007). Acceso y potenciamiento de la biodiversidad microbiana del Valle de Cuatrociénegas, Coahuila para biocatalisis, ingeniería celular y nuevos bioprocesos. 2° Congreso Internacional de Investigadores de Cuatrociénegas
37. Mima, S. (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *J. Of Applied Polymer Science* 28(6):1909-1917
38. Mitsutomi Masaru, Ohtkara Akira, Fukamiso Tamo y Goto Sachio. (1990). Action Pattern of *Aeromonas hydrophila* Chitinase on Partially N-Acetylated Chitosan. 54 (4): 871-877
39. Miyamoto, Katsushiro, Nukui Eiji, Itoh Hiroyuki et al., (2002). Molecular Analysis of the Gene Encoding a Novel Chitin-Binding Protease from *Alteromonas* sp. Strain O-7 and Its Role in the Chitinolytic System. *J. of Bacteriology*. Vol. 184, (No.7) 1865- 1872.

40. Monaghan R.L., Evaleigh D.E., Tewari R.P. and Reese E.T. (1973). *Nature New Biol.*, 245:78
41. Muzzarelli, R. A. A. (1997). *Chitin*. Oxford: Pergamon Press.
42. Ohtakara A. (1988). Viscosimetric assay for chitinase. *Methods in Enzymology*
43. Pamberton M. John, P. Kidd Stephen and Schnidt Radomir. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *Fems Microbiology Letters*. 152:1-10
44. Peniche, C. A. (2006). Estudios sobre quitina y quitosán. Tesis doctoral. La Habana, Cuba.
45. Podile, A.R., Prasad, G.S., and Dube, H.C. (1985). *Bacillus subtilis* AF 1 is an antagonist of vascular wilt pathogens.
46. Price J.S. and Storck R. (1975). Production, Purification and Characterization of an Extracellular Chitosanase from *Streptomyces*
47. Ramírez D. Ninfa, Serrano R José Antonio, Sandoval T. Horacio. (2006). Microorganismos Extremófilos. Actinomicetos Halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 37(57-58)
48. Realpe M. E., Hernandez C.A. y Agudelo C.I. (2002). Especies del genero *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Bogotá, Colombia
49. Rudrapatnam N. T. and Farooqahmed S. Kittur. (2003). Chitin Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(1): 61-87
50. Salomon E., Berg L., y D. Martin. (2001). *Biología*. 5ta. Edición. McGraw-Hill Interamericana.
51. Sandfor, P.A. (1989). Chitosan: commercial uses and potential applications. In *chitin and chitosan*, ed. G. Skajak-Break, T. Anthoesen and P.A. Sanford. Elsevier, London, 51-86

52. Souza V. (2004). Cuatrociénegas , un laboratorio natural de astrología. *Ciencias*. 75:4-2
53. Sutrisno Aji, Hueda Mitsuhiro, Inui Hiroshi, Kawaguchi Takashi, Nakano Yoshihisa, Arai Motoo y Miyatake Kazutaka. (2001). Expression of a Gene Encoding Chitinase (pCA y ORF) from *Aeromonas* sp. No 10S-24 en *Escherichia coli* and Enzyme Characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91 (6):599-600
54. Suzuki, K., T. Mikami., Y. Okawa., A. Tokoro., S. Suzuki. (1986). Antitumor effect of hexa N-acetylchitohexose and chitohexose. *Carbohydr. Res.* 251: 403-408.
55. Synowiecki, J. (2003). Production properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(2):145-171
56. Tang, Zhen-sing, Qian Jun-qing, Shil u-er. (2004). Study on Preparation Technologic of Carboxymethyl-chitosan. *Technology and Development of Chemical Industry*. 33(2) 4-7
57. Teisaire L. Claudia y Alderete Juan Manuel. (2007). Cuando la solución proviene del mar. *Revista Énfasis Alimentación*
58. Tombs, M., and Harding, S. (1998). *An Introduction to polysaccharide biotechnology*. Ed. Taylor and Francis.
59. Tracey M.V. (1995). *Biochem J.*, 61:579
60. Ueda Mitsuhiro, Okada Ayuco, Kawaguchi Takashi and Arai Motoo. (1998). Cloning and Sequence Analysis of Chitinase Gene (pCA y ORF) from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *J. of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 86, No. 6, 600-604.
61. Vílchez Maldonado Susana. (2005). Tesis licenciatura. Nuevos tratamientos de lana con enzimas. Universidad de Barcelona, facultad de química, departamento de ingeniería química. 17-27

62. Watanabe T., Susuki, K., Oyanagi, W. Onhishi, K. and Tanaka, H. (1990). J. Biol. Chem. 265, 15659-15665
63. Wu, L, Lee, K., Wang, X., Losert, W., and Payne, G. (2005). Chitosan mediated and Spatially-selective Electrodeposition of Nano-Scale Particles. Langmir. 21:3641-3646
64. Yong Un Choi, Hee Kang Ji, Suk Lee Myung y Jea Lee Won. (2003). Isolation and Characterization of a Chitinolytic Enzyme Producing Marine Bacterium, *Aeromonas* sp. J-5003. Fisheries Science and Technology.6 (1):1-6

Capítulo VII

Anexo 1

Técnica para la determinación de azúcares reductores mediante el método propuesto por Somogyi 1952, Nelson 1944.

Reactivo 1(Somogyi):

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 un 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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

El reactivo 1 se preparó mezclando 1 mL de solución B en 25 mL de solución A.

Reactivo 2 (Nelson):

Solución A: en 450 mL de agua destilada se disolvió 240 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 heptahidratado ($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se disolvieron en 25 mL de agua destilada.

El reactivo 2 se preparó mezclando lentamente la solución 1 y 2 en agitación y se aforaron a 500 mL posteriormente se calentó a 55°C durante 30 minutos.