

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**“PRODUCCIÓN DE QUITINASAS A PARTIR DE  
SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA:  
Aplicación a los Hongos comestibles y Crustáceos”.**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en  
Farmacia por:**

**ANABELL DEL ROCÍO URBINA SALAZAR**

**Sevilla, 2019**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

---

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
**Facultad de Farmacia**



**Prof. Dr. José Luis Venero Recio**  
C / Profesor García González, 2.  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954 55 3803  
e-mail: [jlvenero@us.es](mailto:jlvenero@us.es)

**José Luis Venero Recio**, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A0500-0880376924), Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla.

Informa:

Que la tesis doctoral titulada **“PRODUCCIÓN DE QUITINASAS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: Aplicación a los Hongos comestibles y Crustáceos”**, presentada por la doctoranda **Anabell Del Rocío Urbina Salazar**, para optar por el título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Drs.: Juan Dionisio Bautista Palomas y Juan Parrado Rubio, reuniendo todo los requisitos necesarios para presentarse a su defensa.

Fdo: José Luis Venero Recio  
(Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular).





**Juan Dionisio Bautista Palomas**, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A0500-5159678268), y **Juan Parrado Rubio**, Catedrático de Universidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla (NRP: A0500-2729451168), adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla.

**Informan:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**PRODUCCIÓN DE QUITINASAS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: Aplicación a los Hongos comestibles y Crustáceos**”, realizada por Anabell Del Rocío Urbina Salazar para optar al título de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Farmacia), Universidad de Sevilla. Y que dicha tesis reúne todos los requisitos académicos y experimentales necesarios para proceder a su presentación y defensa.

**Fdo.: Dr. Juan Dionisio Bautista Palomas**  
(Director de Tesis)

**Fdo.: Dr. Juan Parrado Rubio**  
(Director de Tesis)



## PUBLICACIONES

Parte de los resultados presentados en esta Tesis doctoral, han sido publicados en los siguientes artículos:

**Urbina-Salazar A.R.**, Inca-Torres A.R., Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado B., del Campo J.A., Parrado J., Bautista J., (2018). Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. Waste and Biomass Valorization. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>.

Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado B., Parrado J., Bautista J., (2018). Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge. Journal of Biotech Research, 9:14-26.

Parte de los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos y Jornadas:

**Urbina-Salazar A.R.**, Inca-Torres A.R., Carbonero-Aguilar P., Falcón-García G., and Bautista J., (2017). Production of chitinases by submerged fermentation in media formulated with colloidal chitin of fungi. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

**Urbina-Salazar A.R.**, Inca-Torres A.R., Carbonero-Aguilar P., Cremades O., and Bautista J., (2018). Mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) suppress TNF- $\alpha$  and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. Póster en Congreso. IV JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA. Murcia, Mayo 2018.

**Urbina-Salazar A.R.**, Inca-Torres A.R., and Bautista J., (2018). Preparation of fungal- nano chitin crystals: application to mushroom (*Agaricus bisporus*) by - products. Póster en Congreso. IPAP18 INNOVATIONS IN PHARMACY (ADVANCES & PERSPECTIVES). Salamanca, Septiembre 2018.

**Urbina-Salazar A.R.**, (2018). Producción de quitinasas a partir de los subproductos de la industria agroalimentaria: Aplicación a los Hongos comestibles y Crustáceos. Comunicación Oral. III JORNADAS DOCTORALES DE FARMACIA. Sevilla, Julio 2018.

Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P. and Bautista J., (2017). Preparation of fungal chitin from agroindustrial by-products: Application to edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) by-products. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, Falcón-García G., Cremades O. and Bautista J., (2018) “*In vitro*” study of mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) against oxygen activated substances. Póster en Congreso. IV JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA. Murcia, Mayo 2018.

Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, and Bautista J., (2018). Preparation of nanochitin from crawfish (*Procambarus clarkii*) by-products. Póster en Congreso. IPAP18 INNOVATIONS IN PHARMACY (ADVANCES & PERSPECTIVES). Salamanca, Septiembre 2018.

Carbonero-Aguilar P., Falcón-García G., **Urbina-Salazar A.R.**, Inca-Torres A.R., and Bautista J., (2017). Use of crayfish (*Procambarus clarkii*) chitin as carbon source for the production of chitinases by submerged fermentation. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, and Bautista J., (2017). Production of Crawfish (*Procambarus clarkii*) chitin enriched fractions by enzymatic procedures for fermentation uses and chitin-oligosaccharides production. Póster en Congreso. XIII EUCHIS & VIII SIAQ. Sevilla, Mayo 2017.

Rodríguez-Morgado B., Caballero Jiménez P., Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, Parrado J., Tejada M., (2016). Obtaining a soil biostimulant from sewage sludge: Effect on soil biochemistry. Póster en Congreso. *5th International Conference Enzymes in the Environment. Ecology, Activity and Application*. Bangor, Gales, Reino Unido. 2016.

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

---

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
**Facultad de Farmacia**



Esta Tesis se ha realizado gracias a la financiación de los siguientes Proyectos de Investigación:

Proyecto: **Aumento del contenido de vitamina D en champiñón fresco (CHAMPI-D)**. (Ref.: RTC2015-4039-2), Ministerio de Economía y Competitividad, del gobierno de España.

Proyecto: **Valorización de fibras celulósicas y de quitina obtenidas de subproductos de la industria agroalimentaria mediante el desarrollo de biocomposites poliméricos (VALORIZAGRO)**. (Ref.: PRJ201702958), FIUS, Universidad de Sevilla



Un viaje de miles de kilómetros  
comienza con un solo paso...



Es hora de partir, nos debemos ir,  
ahora nos toca volar, y las alas desplegar,  
emprender el vuelo, en busca de la verdad,  
hacer una carrera y muy alto llegar...

Estamos preparados, de eso no quede duda,  
para eso fuimos educados para llegar a las alturas,  
no dudes jamás adonde quieres llegar,  
sigue tus instintos y nunca perderás...

Extiende bien las alas y seguro llegarás  
solo es cuestión de seguir al viento  
y planear sin titubear, poco a poco  
y sin miedo, llegarás al vuelo final...

Seguro en poco tiempo, los frutos llegarán,  
y serás en el firmamento una estrella más,  
habrás cumplido tu sueño... Y la meta alcanzarás,  
¡de ser un grande, y exitoso profesional!

*Magali Saucedo*



# **— AGRADECIMIENTOS —**



## AGRADECIMIENTOS

*La gratitud es la clave que convierte los problemas en bendición y lo inesperado en regalos.*

Hoy es uno de esos días en el que me siento muy agradecida de tener personas tan increíbles y maravillosas en mi vida.

Primeramente agradezco al Profesor Juan D. Bautista Palomas por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio brindándome todas las facilidades para poder desarrollar este trabajo de investigación, gracias por todo tu tiempo, por el apoyo, por tus consejos y por todo lo que me has enseñando... en fin me siento muy agradecida debido a que sin tu apoyo no hubiese sido posible cumplir cada una de mis metas propuestas. A mis compañeros del grupo de investigación y demás compañeros del departamento también un sincero agradecimiento.

Sonrío, no porque mi vida es perfecta sino porque aprecio lo que tengo y a quien tengo a mi lado gracias *Renato* por ser una persona muy importante en vida, por ser mi esposo, amigo, compañero, colega y compi de piso, gracias por estar conmigo en los buenos y sobretodo en los malos momentos, gracias por ser mi apoyo incondicional y darme las fuerzas para seguir adelante siempre diciéndome “ya falta poco”, gracias por estar conmigo en esos momentos difíciles cuando en poco tiempo perdí a mis abuelitos y sin poder hacer nada ni poder estar allí en esos momentos fuiste tú quien me dio las fuerzas necesarias para poder reponerme y seguir. Gracias por todo tu amor, cariño, comprensión y sobretodo tu paciencia. Yo sé que juntos lograremos llegar al final y cumplir todas las metas planteadas. Solo tú y yo sabemos lo que nos ha costado esto.

Estoy tan agradecida de ser quien soy y estar donde estoy, esto se los debo a mis padres Méntor y Juanita quienes desde muy pequeñita me han enseñado buenos valores como el

respeto, humildad, honestidad, la responsabilidad y sobretodo la gratitud, quienes a pesar de estar muy lejos bastaba con unas palabras de ánimo para seguir adelante, gracias por apoyarnos en este camino y por confiar en nosotros, siempre estaré muy agradecida con ustedes.....

A mis hermanos Geovanny, Jeanette y Anthony los llevo siempre en mi corazón, gracias por brindarme todo su cariño y por apoyarnos .....

A mis sobrinos Naye, Dennis, Pame, Andy, Majo, Samy y Renata soy una tía muy afortunada cada uno de ustedes tiene un lugar muy importante en mi corazón.

A Dn Walter, Myriam y Vale por estar siempre pendientes de nosotros.

Me siento muy agradecida con Dios por darme unos padres que son mi orgullo, un esposo increíble, hermanos, sobrinos y demás familiares que han aportado de cierta manera para cumplir con cada uno de mis objetivos, gracias por guiarme siempre por el buen camino y por darme la Salud y la vida.

Sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo.

*Anabell*

# ÍNDICE



# Índice

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Quitinasas.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Generalidades.....	3
1.1.2 Clasificación de las quitinasas .....	6
- Clasificación según la Comisión de Enzimas de la IUPAC.....	7
- Clasificación basada en la secuencia aminoacídica y ordenamiento espacial (arquitectura de dominios) .....	7
- Clasificación basada en el mecanismo.....	10
1.1.3 Importancia y Aplicaciones de las Quitinasas .....	12
1.3.1.1 Quitinasas y Agronomía .....	15
1.1.3.2 Quitinasas en la Industria Alimentaria.....	19
1.1.3.3 Otras Aplicaciones de Quitinasas .....	20
1.1.4 Producción de Quitinasas por Fermentación .....	20

a) Fermentación en Medio Sólido.....	21
b) Fermentación en Estado líquido o Sumergida .....	23
c) Fermentación Discontinua .....	24
d) Fermentación Continua.....	24
1.1.4.1 Microorganismos .....	25
1.1.4.2 Factores extrínsecos de Cultivo .....	27
1.4.3 Medios de cultivo (Sustratos) .....	28
<b>1.2 Subproductos Agroindustriales ricos en Quitina como fuente de fermentación para la producción de quitinasas. ....</b>	<b>30</b>
1.2.1 Subproductos de la Industria de Hongos y Setas Comestibles .	32
1.2.2 Subproductos de la Industria de Crustáceos .....	40
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1 Objetivo General.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Reactivos, Materiales y Equipos.....</b>	<b>53</b>
3.1.1 Reactivos.....	53
3.1.2. Materiales.....	57
3.1.3 Equipos .....	59
<b>3.2. Microorganismos .....</b>	<b>61</b>

<b>3.3. Subproductos.....</b>	<b>62</b>
<b>3.4 Estabilización de los subproductos y generación de sustratos .....</b>	<b>64</b>
3.4.1 Secado y molienda .....	64
3.4.2 Preparación de la Fracción enriquecida de Quitina/Glucano de champiñones.....	67
<b>3.5 Caracterización de los Sustratos .....</b>	<b>69</b>
3.5.1 Humedad .....	69
3.5.2 Cenizas.....	70
3.5.3 Grasas.....	70
3.5.4 Nitrógeno Total.....	70
3.5.5 Cuantificación de Proteínas en Subproductos y Sustrato .	71
3.5.6 Hidratos de Carbono .....	71
<b>3.6 Fermentaciones.....</b>	<b>72</b>
3.6.1 Fermentación sumergida (FS).....	73
a) <i>Microorganismos y preparación del Inóculo</i> .....	73
b) <i>Preparación de la fuente de carbono (Quitina coloidal)</i> .....	74
c) <i>Medios de cultivo y condiciones de crecimiento</i> .....	75
▪ Condiciones de crecimiento de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415.....	78

▪	Condiciones de crecimiento de <i>Trichoderma</i> .....	78
	3.6.2 Fermentación en estado sólido (FES) .....	78
	<b>3.7 Caracterización de las fermentaciones .....</b>	<b>81</b>
	3.7.1 Determinación de la Biomasa .....	81
	3.7.2    Ensayos Enzimáticos .....	82
	a) Ensayo de Actividad Quitinasa .....	83
	b) Ensayo de Actividad Celulasa.....	85
	c) Ensayo de Actividad Xilanasa .....	86
	d) Ensayo de Actividad Proteasa.....	87
	e) Cálculo de actividades enzimáticas en UI/mL.....	88
	3.7.3 Cuantificación de Proteínas solubles .....	89
	3.8 Concentración por Ultrafiltración .....	91
	<b>3.9 Estudio del secretoma .....</b>	<b>93</b>
	3.9.1    Análisis electroforético (PAGE-SDS) .....	93
	• Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) ..	95
	3.9.2 Tinción por afinidad (Zimografía) .....	98
	3.9.3    Análisis proteómico .....	98
	<b>3.10 Estabilización de Quitinasas.....</b>	<b>102</b>
	<b>3.11 Producción de quitinasas en un reactor tipo tambor rotativo (escala</b>	

<i>semi-piloto</i> ).....	102
<b>3.12 Análisis de datos</b> .....	<b>103</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>107</b>
<b>4.1. Subproductos y sustratos</b> .....	<b>107</b>
4.1.1. Recopilación de subproductos .....	108
4.1.2. Preparación de los sustratos .....	109
4.1.3. Caracterización de los sustratos .....	112
<b>4.2. Fermentaciones</b> .....	<b>114</b>
4.2.1. Fermentación sumergida (FS).....	115
4.2.2. Fermentación en estado sólido (FES) .....	124
4.2.3 Análisis de la producción relativa (UI/L/día) .....	130
4.2.4 Análisis de la producción total (UI).....	135
<b>4.3 Aproximación al secretoma de <i>T. harzianum</i> CEC-T24 crecido en medios ricos en quitina</b> .....	<b>141</b>
<b>4.4 Producción de hidrolasas</b> .....	<b>174</b>
<b>4.5 Producción de quitinasas a escala semi-piloto.</b> .....	<b>181</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>191</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>214</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Diferentes formas de la quitina.

Figura I.2. Organismos que en su estructura contienen quitina.

Figura I.3. Clasificación de las quitinasas bacterianas de acuerdo con su mecanismo de acción y forma del centro activo.

Figura I.4. Hidrólisis Enzimática de la Quitina.

Figura I.5. Principales aplicaciones actuales de las quitinasas según su mecanismo de acción.

Figura I.6. Morfología de *Agaricus bisporus*.

Figura I.7. Producción mundial de Hongos y setas comestibles. Adaptado de datos FAO STAT 2018a.

Figura I.8. Producción de Hongos y setas comestibles en Europa en el 2016. Adaptado de datos FAO STAT 2018a.

Figura I.9. Consumo de Hongos y setas comestibles en España en el 2016. Adaptado de datos FAO STAT 2018b.

Figura I.10. Subproductos obtenidos del cultivo del champiñón.

Figura I.11. Morfología de *Procambarus clarkii*.

Figura I.12. Distribución mundial de *Procambarus clarkii*. Tomado de IUCN Red List guiding conservation 2014.

Figura I.13. Producción mundial de *Procambarus clarkii*.

Figura M.1. a) *Agaricus bisporus*, b) *Procambarus clarkii*.

Figura M.2. a) Estufa de secado estático, b) Estufa de secado con aire forzado.

Figura M.3. a) Molino de rotor, b) Diferentes tamaños de tamices utilizados para la preparación de los subproductos.

Figura M.4. a) Harina de Tallos de Champiñón (HTCH), b) Harina de Cangrejo (HC).

Figura M.5. Esquema de la obtención de la fracción enriquecida de Quitina/Glucano, mediante un tratamiento enzimático con proteasas.

Figura M.6. Fracción enriquecida en Quitina/Glucano.

Figura M.7. Espectrofotómetro utilizado.

Figura M.8. Curva de calibración de Glucosa.

Figura M.9. Esquema del proceso de Fermentación Sumergida.

Figura M.10. a) Quitina pura en polvo, b) Quitina coloidal.

Figura M.11. Medios de cultivo utilizados para FS.

Figura M.12. Medios de cultivo utilizados en FES para la producción de Quitinasas.

Figura M.13. Proceso de fermentación para la obtención de quitinasas.

Figura M.14. Recta %T vs mg biomasa/mL para *B. licheniformis* ATCC 21415. (Muestras diluidas 1:5, v/v)

Figura M.15. Recta conversión ergosterol vs biomasa (*T. harzianum* CEC-T24).

Figura M.16. Recta conversión ergosterol vs biomasa (*T. atroviride* CEC-T23).

Figura M.17. a) Baño con control de temperatura, b) Muestras para determinación de actividad quitinasa.

Figura M.18. Curva de calibración de N-acetilglucosamina.

Figura M.19. Curva de calibración de Glucosa.

Figura M.20. Curva de calibración de Xilosa.

Figura M.21. Estructura del colorante Coomasie Brilliant Blue G250.

Figura M.22. Curva de calibración de BSA.

Figura M.23. a) Concentración por ultrafiltración, b) Tubos Vivaspín de

ultrafiltración.

**Figura M.24.** Esquema del diseño experimental utilizado para el análisis proteómico del secretoma de *T. harzianum* CEC-T24.

**Figura M.25.** Esquema del reactor tipo tambor rotatorio utilizado para la producción de quitinasas en medios ricos en quitina.

**Figura R1.** Sustratos utilizados para la producción de quitinasas: a) HTCH, b) F-Q/G y c) HC.

**Figura R2.** Curva de hidrólisis de la HTCH con Alcalasa®.

**Figura R.3.** Producción de biomasa (línea discontinua con triángulo) y producción quitinasa (línea continua con cuadrado) de: **a)** *T. harzianum* CEC-T24, **b)** *T. atroviride* CEC-T23 y **c)** *B. licheniformis* ATCC 21415, crecidos en el medio F-Q/G.

**Figura R.4.** Producción de biomasa (línea discontinua con triángulo) y producción quitinasa (línea continua con cuadrado) de: **a)** *T. harzianum* CEC-T24, **b)** *T. atroviride* CEC-T23 y **c)** *B. licheniformis* ATCC 21415, crecidos en el medio HTCH.

**Figura R.5.** Comparación de la producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios formulados con diferentes sustratos con aireación (+A) y sin aireación (-A). **a)** Fermentación Sumergida (FS) y **b)** Fermentación en estado sólido (FES).

**Figura R.6.** Comparación de la producción relativa de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24, en medios formulados con diferentes sustratos, al sexto día de cultivo. **a)** Cultivos con aireación y **b)** Cultivos sin aireación.

**Figura R.7.** Producción de quitinasa en diferentes medios formulados con sustratos ricos en quitina (F-G/Q, HTCH y HC) mediante FS y FES con y sin aireación. [A) Análisis porcentual. B) Análisis por producción total

(UI)].

**Figura R.8.** Perfil proteico del caldo de cultivo antes de inocular (línea azul 0 días) y del caldo de cultivo tras 6 días de crecimiento de *T. harzianum* CEC-T24 en FES (línea verde).

**Figura R.9.** Separación electroforética por PAGE-SDS de proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en un medio de cultivo formulado HTCH. [**a:** marcadores; **b:** tinción con azul de Coomassie; **c:** tinción de plata y **d:** tinción de la actividad (zimograma)].

**Figura R.10.** Número de proteínas (totales y específicas de *T. harzianum* CEC-T24) detectadas por n-LC-MS/MS en el secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios formulados con HTCH, F-Q/G y HC.

**Figura R.11.** Número de proteínas específicas de *T. harzianum* CEC-T24 detectadas por n-LC-MS/MS en el secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios formulados con HTCH, F-Q/G y HC.

**Figura R.12.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HTCH.

**Figura R.13.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HTCH clasificadas según su función biológica.

**Figura R.14.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con F-Q/G.

**Figura R.15.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con F-Q/G clasificadas según su función biológica.

**Figura R.16.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HC.

**Figura R.17.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HC clasificadas según su función biológica.

**Figura R.18.** Actividad quitinasa producida en el medio HTCH utilizando

FS y FES.

[Figura R.19.](#) Actividad celulasa producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.

[Figura R.20.](#) Actividad xilanasa producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.

[Figura R.21.](#) Actividad proteasa producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.

## INDICE DE TABLAS

Tabla-M.1. Reactivos utilizados.

Tabla-M.2. Materiales utilizados.

Tabla-M.3. Equipos utilizados.

Tabla-M.4. Microorganismos utilizados.

Tabla-M.5. Subproductos y sus orígenes.

Tabla-M.6. Composición de los medios de cultivo utilizados para la FS.

Tabla-M.7. Composición de los medios de cultivo utilizados para la FES.

Tabla-M.8. Composición de los geles discontinuos de poliacrilamida.

Tabla-M.9. Protocolo de tinción de proteínas con Plata.

Tabla-R.1. Materias primas y/o sustratos utilizados en la producción de quitinasas.

Tabla-R.2. Composición básica de los sustratos utilizados en la producción de quitinasas por fermentación. (Datos expresados en % p.s.)

Tabla-R.3. Producción de biomasa en los diferentes medios de cultivo después de 14 días de crecimiento en fermentación sumergida.

Tabla-R.4. Producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24, *T. atroviride* CEC-T23 y *B. licheniformis* ATCC 21415 crecidos en fermentación sumergida en un medio formulado con F-Q/G y HTCH.

Tabla-R.5. Producción de quitinasas tras 6 días de Fermentación en estado sólido.

Tabla-R.6. Producción de quitinasas tras 6 días de Fermentación tanto en FS como FES.

Tabla-R.7. Producción relativa de quitinasas de *Trichoderma harzianum*

CEC-T24 crecido en FS y FES en diferentes medios, tras 6 días de fermentación.

**Tabla-R.8.** Producción total de quitinasas obtenidas en FS y FES tras 6 días de fermentación.

**Tabla R.9.** Número de Proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 con actividad hidrolítica.

**Tabla R.10.** Proteínas específicas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en FES en un medio formulado con HTCH.

**Tabla R.11.** Proteínas específicas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en FES en un medio formulado con F-Q/G.

**Tabla R.12.** Proteínas específicas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en FES en un medio formulado con HC.

**Tabla R.13.** Ensayo de actividades enzimáticas.

**Tabla R.14.** Producción y producción relativa de actividad quitinasa en un reactor tubular rotatorio a escala semi-piloto.

# == RESUMEN ==



## RESUMEN

La quitina, es un polímero lineal  $\beta$ -1,4 de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), es un importante componente estructural de la mayoría de los crustáceos, insectos, algas y hongos. Las quitinasas son enzimas que degradan la quitina a quitino-oligosacáridos y acetil glucosamina y son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos.

Estas enzimas tienen aplicaciones potenciales en la industria farmacéutica, alimentaria y agronómica donde podrían desempeñar un importante papel en biocontrol y en el tratamiento de enfermedades de las plantas, debido a que no son tóxicas, son biodegradables y biocompatibles.

En este trabajo se ha estudiado la producción de quitinasas por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, *Trichoderma atroviride* CEC-T23 y *Trichoderma harzianum* CEC-T24 crecidos en diferentes medios de cultivo formulados con subproductos agroindustriales ricos en quitina procedentes de hongos comestibles (*Agaricus Bisporus*) y crustáceos (*Procambarus clarkii*) como fuente principal de carbono en un intento de producir estas enzimas de una manera económicamente viable, y darle un uso práctico a estos subproductos, además del de poder utilizarse como fuente de partida para obtener quitina. Lo que es habitual en el caso de los subproductos de crustáceos pero, hasta la fecha, no lo es para los subproductos de la industria de los hongos y setas comestibles.

Este trabajo es uno de los primeros, sino el primero, que aborda de manera sistemática la utilización de los subproductos ricos en quitina de la industria de los hongos y setas comestibles para obtener productos de

alto valor añadido, diferentes de la quitina y el quitosano. Concretamente nos hemos centrado en el estudio de la producción de enzimas hidrolíticas, fundamentalmente quitinasas.

Para ello se ha procedido de la siguiente manera:

- Estudio de la preparación y caracterización de las fuentes de fermentación a partir de subproductos agroindustriales (harina de tallos de champiñón, HTCH, Fracción enriquecida de quitina y glucano, F-Q/G, y harina de cangrejo, CFM).
- Estudio de la producción de quitinasas por fermentación en estado sólido (FES) y fermentación sumergida (FS)
- Estudio de la extracción, concentración/fraccionamiento y estabilización de enzimas (quitinasas).
- Estudio de la secreción de proteínas (secretoma) de *B. licheniformis* ATCC 21415 o *T. harzianum* CEC-T24 crecido en los diferentes medios de cultivo, mediante técnicas electroforéticas y proteómica.
- Estudio de la producción de quitinasas a escala semi-piloto.
- Estudio de la estabilización y/o inmovilización de concentrado de quitinasas en forma de nano/micropartículas para su uso como plaguicida alternativo al uso de productos químicos altamente tóxicos para el medio ambiente.

De nuestros resultados podemos concluir que todos los microorganismos produjeron una mayor producción de actividad quitinasa en un medio formulado con HTCH y F-Q/G como fuente de carbono en comparación con los medios formulados con Qp o Qc. De los tres microorganismos utilizados en este estudio, *T. harzianum* CEC-

T24 mostró la mayor productividad de quitinasa ( $873,98 \text{ UI L}^{-1}\text{día}^{-1}$ ) en el medio HTCH<sub>+</sub>A en Fermentación en estado sólido.

La producción de quitinasa se controló mediante la medida de actividad y de proteína y el perfil de enzimas/proteínas secretadas al medio de cultivo se ha seguido, en un principio, por PAGE-SDS. El análisis electroforético permitió la detección de 25 proteínas diferentes entre ellas cinco quitinasas con masas moleculares 82, 65, 48, 31 y 25 kDa, respectivamente. Sin embargo, cuando se estudian las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 en los diferentes medios, es decir, cuando analizamos su secretoma, mediante técnicas proteómicas el número de enzimas/proteínas detectadas es mucho mayor: 183 en medios formulados con HTCH, 161 en medios formulados con F-Q/G y 91 en medios formulados con HC.

Además cuando se crece *T. harzianum* CEC-T24 en un reactor tipo tambor rotatorio, a escala semi-piloto (1 Kg de medio de cultivo), bien controlado, la productividad es 4,63 veces superior a la descrita para medios aireados en matraces.

Estos resultados muestran que el cultivo de *T. harzianum* CEC-T24 por fermentación en estado sólido, en un medio de fermentación, en un reactor tipo tambor rotatorio, con buen control de aireación y humedad, basado en el uso de subproductos ricos en quitina (HTCH), procedente de la industria del champiñón, barato y abundante representa un buen procedimiento para la producción a gran escala de quitinasas.







**== ABSTRACT ==**



## ABSTRACT

(Pendiente de Traducción)







# — GLOSARIO —



## GLOSARIO

**ACN:** Acetonitrilo.

**AOAC:** Método oficial de análisis (Association of Official Analytical Chemists).

**APS:** Persulfato amónico.

**ATCC:** Colección Americana de Cultura Tipo (American Type Culture Collection).

**BSA:** Seroalbúmina bovina.

**CAZy:** Carbohydrate-Active enzymes.

**CID:** Dominio de inserción de quitina.

**DNS:** Ácido dinitrosalicílico.

**FAO STAT:** Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura, división de estadística.

**FAO:** Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.

**FES:** Fermentación en estado sólido.

**F-Q/G:** Fracción de quitina/ glucano.

**FS:** Fermentación Sumergida.

**g:** ges o fuerza centrífuga relativa (RCF).

**GH:** Glicosil-hidrolasas o Glicohidrolasas.

**GlcNAc:** N-Acetilglucosamina.

**HC:** Harina de Cangrejo.

**HC:** Hidratos de Carbono.

**HTCH:** Harina de Tallos de Champiñón.

**IUCN:** Unión internacional para la conservación de la naturaleza.

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry/ Union Internacional de Química Pura y Aplicada.

**KDa:** Kilodaltons.

**LB:** CALDO LURIA (Luria Bertani).

**LTQ-FT:**

**mA:** miliamperios.

**Mm:** Medio mínimo.

**mM:** milimolar.

**MO:** Materia orgánica.

**nm:** nanómetros.

**N<sub>t</sub>:** Nitrógeno total.

**p.s:** peso seco.

**p/p:** Peso/Peso.

**p/v:** Peso/Volumen.

**PAGE:** Polyacrilamide gel electroporesis.

**PB:** Potato Broth = Extracto de Patata.

**PDA:** patata-dextrosa-agar.

**PM:** Peso Molecular.

**Q<sub>c</sub>:** Quitina Coloidal.

**QOS:** Quitinooligosacáridos.

**Q<sub>p</sub>:** Quitina en Polvo.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**SDS:** Dodecilsulfato sódico.

**Sm:** *Serratia marcescens*.

**TCA:** Ácido tricloroacético.

**TEMED:** Tetrametiletilendimina. Agente polimerizador de la acrilamida.

**TIM:** dominio barril ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub> de la triosfosfato isomerasa.

**Tm:** Toneladas métricas.

**UI:** Unidad Internacional de actividad enzimática.

**v/v:** Volumen/Volumen.

**%T:** Transmitancia.

**+A=** Con Aireación.

**-A=** Sin Aireación.



# — INTRODUCCIÓN —



# 1. INTRODUCCIÓN

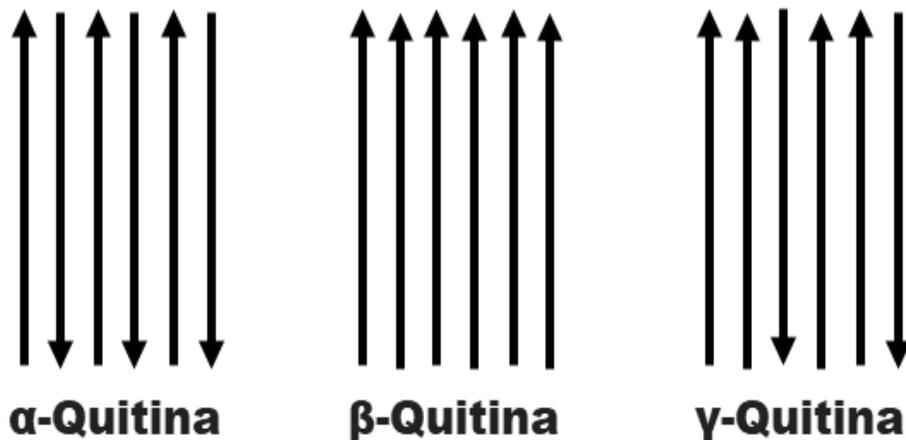
## 1.1 Quitinasas

### 1.1.1 Generalidades

Las quitinasas (E.C. 3.2.2.14) representan una clase o grupo de enzimas con un amplio rango de aplicaciones prácticas debido al papel clave que desempeñan en la degradación de polímeros cristalinos. Las quitinasas catalizan la degradación o rotura de enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 en la quitina  $(C_8H_{13}O_5N)_n$ , segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. La quitina es un componente estructural de la pared de los hongos [Langner y Göhre, 2016], del exoesqueleto e intestino de los insectos y el caparazón de los crustáceos [Merzendorfer, 2003; Hamed y col., 2016]. Enormes cantidades de éste polímero se sintetizan en la biosfera, y alrededor de  $10^{11}$  toneladas métricas se producen anualmente solo en la biosfera acuática [Tsujiyo y col., 1998]. El quitosano se produce tras la desacetilación de este polímero.

La quitina puede aparecer de tres formas distintas, que difieren en la orientación de las cadenas polisacáridicas en las microfibrillas, siendo estas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -quitina (Figura-I.1) [Fortuna-González, 2010]. La  $\alpha$ -quitina es la más abundante, tiene una configuración antiparalela, presenta una estructura cristalina altamente ordenada causada por un fuerte enlace de H lo que conduce a ser una estructura muy rígida, intratable e insoluble. Las extremidades de cangrejos y conchas de

camarón así como las paredes celulares de hongos están constituidas por este tipo de quitina [Beier y Bertilsson, 2013]. La  $\beta$ -quitina presenta una configuración paralela y un débil enlace de H, es inestable y soluble en agua, y mientras que la  $\gamma$ -quitina presenta una configuración paralela y antiparalela [Sastoque, 2005]. Las dos últimas tienen propiedades mecánicas más flexibles y son fácilmente degradadas por enzimas especialmente quitinasas.



**Figura I.1.** Diferentes formas de la quitina.

La quitina juega un papel muy importante en el esqueleto de ciertos organismos como crustáceos, moluscos, insectos, y hongos constituyendo el 75% del peso de estos organismos (Figura-I.2), siendo estos los necesarios para la producción de quitinasas.

## Crustáceos



## Moluscos



## Insectos



## Hongos



**Figura I.2.** Organismos que en su estructura contienen quitina.

La hidrólisis enzimática de la quitina a N-acetil-D-glucosamina se lleva a cabo mediante un sistema que implica la participación de dos tipos de hidrolasas: Quitinasas y Quitobiasas.

Las quitinasas constituyen un grupo o clase de enzimas con estructuras y mecanismos de acción diversos que determinan/condicionan su utilización/aplicación en los diferentes campos, tales como control de enfermedades de plantas, y plagas de

insectos [Patil y col., 2000], síntesis de quitinooligosacáridos (QOS) [Yang y col., 2016a] para su uso en la industria alimentaria y química (síntesis de drogas/fármacos), aprovechamiento de residuos y subproductos marinos y agroalimentarios ricos en quitina, y en la producción de bio-fuel [Swiontek y col., 2014; Ramírez y Calzadía, 2016].

Aunque la clasificación, características y las aplicaciones de las quitinasas han sido tratadas en numerosas revisiones por diferentes autores [Patil y col., 2000; Swiontek y col., 2014; Herrera-Estrella y Chet, 1999; Hartl y col., 2012; Singh y col., 2014; Rathore y Gupta, 2015; Stoykov y col., 2015], ninguno ha discutido detalladamente la diversidad de las quitinasas como posible causa de sus aplicaciones prácticas. Por ello en la presente introducción pretendemos discutir estos temas haciendo especial énfasis en la diversidad de las fuentes, características estructurales y propiedades mecanicistas de las quitinasas, como principal factor limitante en el desarrollo y utilización de esta clase de enzimas en el campo industrial.

### 1.1.2 Clasificación de las quitinasas

Bernard en 1911 observó por primera vez una fracción quitinolítica termoestable y difusible (quitinasas) al aislarlas a partir de pulpa de orquídea. Posteriormente fue confirmada por Karrer y Hoffman quienes obtuvieron enzimas quitinolíticas a partir de caracoles [Felse y Panda,

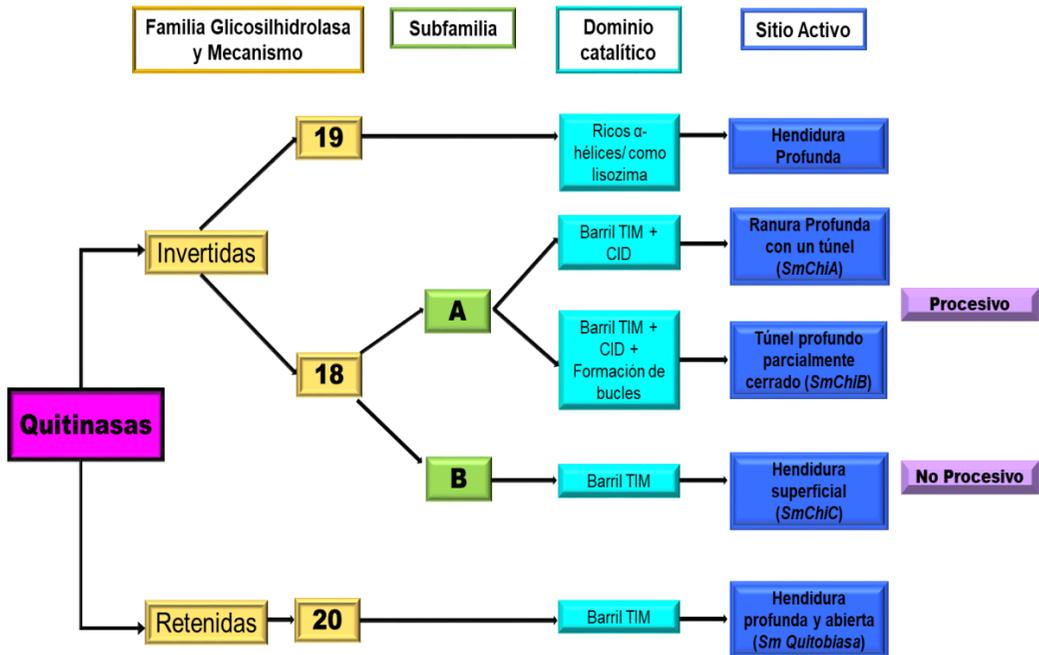
**1999**]. Actualmente las quitinasas se clasifican siguiendo diferentes criterios.

### **- Clasificación según la Comisión de Enzimas de la IUPAC**

De acuerdo con las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* NC-IUBMB), de acuerdo con la reacción que catalizan las quitinasas son hidrolasas que rompen enlaces glicosídicos en moléculas de quitina, es decir, se encuentran agrupadas dentro de la clase tres, correspondiente a las Glicosil-hidrolasas (GH) o Glicohidrolasas (GH) y les corresponde por tanto como números del código de clasificación: EC 3.2.1.x., donde x representaría el número de catálogo u orden.

### **- Clasificación basada en la secuencia aminoacídica y ordenamiento espacial (arquitectura de dominios)**

Las quitinasas según su secuencia aminoacídica, en la base de datos CAZy, se agrupan dentro de las siguientes tres familias: familia 18, 19 y 20 [**Lombard y col., 2013**] como se muestra esquemáticamente en la Figura-I.3.



**Figura I.3.** Clasificación de las quitinasas bacterianas de acuerdo con su mecanismo de acción y forma del centro activo.

Las quitinasas, aunque catalizan el mismo tipo de reacción, difieren notablemente en sus secuencias aminoacídicas y propiedades catalíticas [Vocadlo y col., 2008], y aunque hay una ambigüedad inherente en esta taxonomía [Duo-Chuan, 2006], estas tres familias han sido validadas bioquímicamente como enzimas con actividad quitinolíticas.

Las familias GH-18 y GH-19 se consideran quitinasas ya que catalizan la degradación de polímeros de quitina. La familia GH-20 incluye la quitobiasa y β-N-acetil-hexosaminidasa que catalizan la degradación del disacárido quitobiasa (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub>, y N-acetilgalactosamina o glucosamina de glicoconjugados [Patil y col.,

**2000; Vaaje-Kolstad y col., 2013].**

En la familia 18 se encuentran quitinasas de organismos como bacterias, hongos, virus, animales y algunas plantas; que han desarrollado mecanismos de degradación de quitina altamente eficientes debido a que secretan quitinasas con propiedades sinérgicas probadas experimentalmente con *Serratia marcescens* que tiene la capacidad de secretar hasta cuatro enzimas quitinolíticas cuya función es actuar durante el desarrollo y como mecanismo de defensa [**Brurberg y col., 1996; Suzuki K y col., 2002; Rathore y Gupta, 2015].**

Toda la familia GH-18 se caracteriza por contener en su zona catalítica una estructura consistente con un dominio tipo barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> TIM [**Umemoto y col., 2015; Perrakis y col., 1994; Takuo, 1999; Yang y col., 2010].**

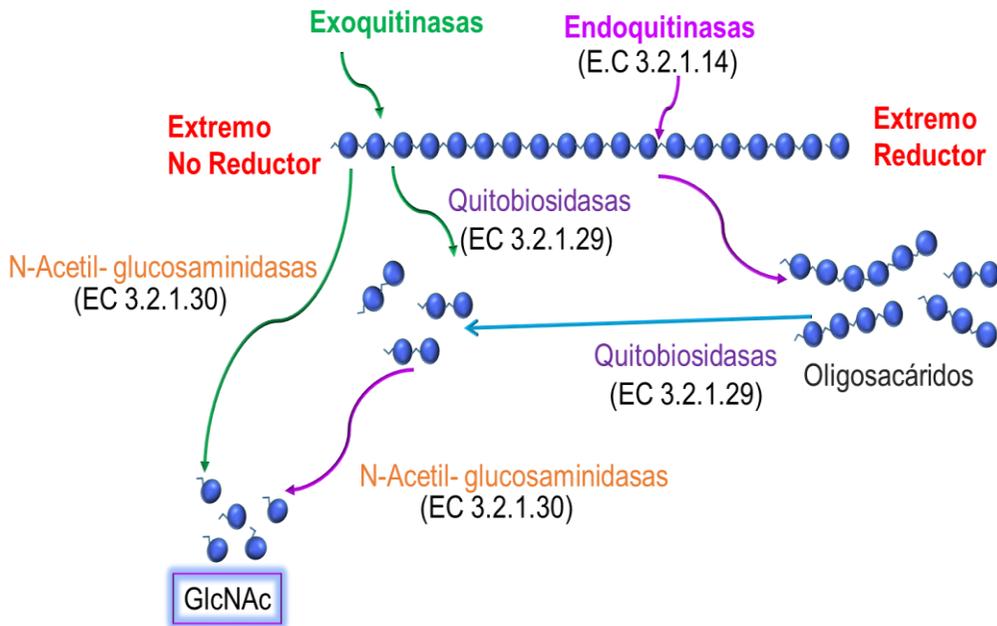
Las quitinasas de la familia GH-19 se describieron por primera vez en plantas superiores y más tarde en *Streptomyces* [**Ohno y col., 1996; Shimosaka y col., 2001],** los miembros de esta familia se producen como un mecanismo de defensa frente a hongos patógenos. La primera quitinasa de esta familia se ha aislado a partir del hongo *Nosema bombycis* [**Han y col., 2016],** además varios genes de estas quitinasas se han encontrado en *Caenorhabditis elegans* con actividad nematocida [**Chen y col., 2017].**

El dominio catalítico en la familia GH-19 está formado por un dominio rico en  $\alpha$ -hélices tipo lisozima, caracterizado por la existencia de una

hendidura profunda [Kezuka y col., 2006]. La familia GH-20 comprende a la  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa que ha sido descrita en *Streptomyces* y en humano [Polaina, 2004].

### - Clasificación basada en el mecanismo

De acuerdo con el mecanismo, las quitinasas se clasifican en dos grandes categorías: Endoquitinasas (E.C. 3.2.1.14) y Exoquitinasas (E.C. 3.2.1.200 y E.C. 3.2.1.201). Las primeras degradan aleatoriamente en los sitios internos del extremo reductor de la cadena, formando así la di-acetil-quitobiosa dimérica y multímeros solubles de baja masa molecular tales como la quitotriosa, la quitotetraosa y la quitopentosa. Las Exoquitinasas actúan sobre el extremo no reductor de la cadena y se dividen en 2 subcategorías: quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), involucradas en la catálisis de la liberación progresiva de di-acetil-quitobiosa desde el extremo no reductor de la cadena y la N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.52), que escinde los productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas generando monómeros de GlcNAc. Logrando de esta manera la lisis completa del polímero (Figura-I.4) [Di Rosa y col., 2016; Sahai y Manocha, 1993].



**Figura I.4.** Hidrólisis Enzimática de la Quitina.

Datos recientes indican que la forma endo se activa en sustratos solubles como el quitosano y la forma exo se activa en la degradación de sustratos cristalinos debido a que tiene una mejor accesibilidad a los extremos de la cadena [Horn y col., 2006; Sikorski y col., 2006].

La clasificación de las quitinasas depende principalmente de la naturaleza del sustrato. Por ejemplo en el exoesqueleto de los insectos predomina quitina y proteína mientras que las paredes celulares de los hongos contienen quitina y glucanos y su estructura es más fácil de ser degradada.

Las quitinasas son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos, tienen un peso molecular que varía entre 20 kDa y 90 kDa

aproximadamente, tienen un pH óptimo entre 5 y 8, y son estables a una temperatura entre 37 - 50 °C [Zhang y col., 2018]. Su tamaño varía de 350 hasta más de 800 aminoácidos, dentro de estas se encuentran proteínas modulares que contienen cadenas de 250 a más de 400 aminoácidos [Warren, 1996].

### 1.1.3 Importancia y Aplicaciones de las Quitinasas

Las quitinasas desempeñan papeles importantes en diversos organismos, entre los que cabe destacar a) Ayudan a regenerar o renovar la estructura de ciertos organismos que poseen un esqueleto duro, lo que le confiere su tamaño y forma, b) en organismos que atacan a otros organismos que contienen quitina facilitando el uso de ésta como fuente carbonada, degradando el polímero en metabolitos absorbibles, permitiendo su uso como fuente de energía, y c) en caso de infección por microorganismos con recubrimientos de quitina, ayudará a degradar su estructura proporcionando inmunidad y defensa frente a patógenos infecciosos.

En las Bacterias las quitinasas están implicadas en la nutrición debido a que suministran nitrógeno y carbono como fuente de nutrientes y además secretan quitinasas durante la patogénesis en huéspedes que contienen quitina, de esta manera juegan un papel importante en el parasitismo [Dahiya y col., 2006; Adrangi y col., 2010; Cohen-Kupiec y Chet, 1998; Busby y col., 2012; Nakanishi y col., 2001].

Las quitinasas fúngicas cumplen un papel importante en la nutrición, autólisis, defensa, parasitismo y morfogénesis en diferentes fases durante su desarrollo. Los hongos entomopatógenos están implicados en el control biológico y actúan como agentes para controlar insectos y plagas. Además la proteína específica de unión quitinasa/quitina puede ser utilizada para la detección en casos de infección fúngica invasiva en pacientes inmunodeprimidos [**Gooday y col., 1992; Fang y col., 2012; Lupetti y col., 2011; Yang y col., 2010; Yu y col., 2015; Hartl y col., 2012; Xia y col., 2001**].

Las quitinasas de los insectos están involucradas en la degradación de la cutícula vieja y síntesis de una nueva, en caso de que sea necesario regenerar su cutícula, para ello los insectos producen diferentes tipos de quitinasas específicas, de modo que puedan actuar durante la metamorfosis evitando así una inhibición en su desarrollo. Además ciertos insectos contienen quitinasas en su veneno y saliva con el fin de degradar la cutícula del huésped [**Zhang y col., 2011; Zhu y col., 2008**].

Las quitinasas de las plantas son generalmente endoquitinasas y su peso molecular es menor que las quitinasas de insectos, las quitinasas son proteínas que se encuentran relacionadas con la patogénesis, actúan como autodefensa frente a un ataque de fitopatógenos [**Gooday, 1999; Al-Ahmadi y col., 2008**].

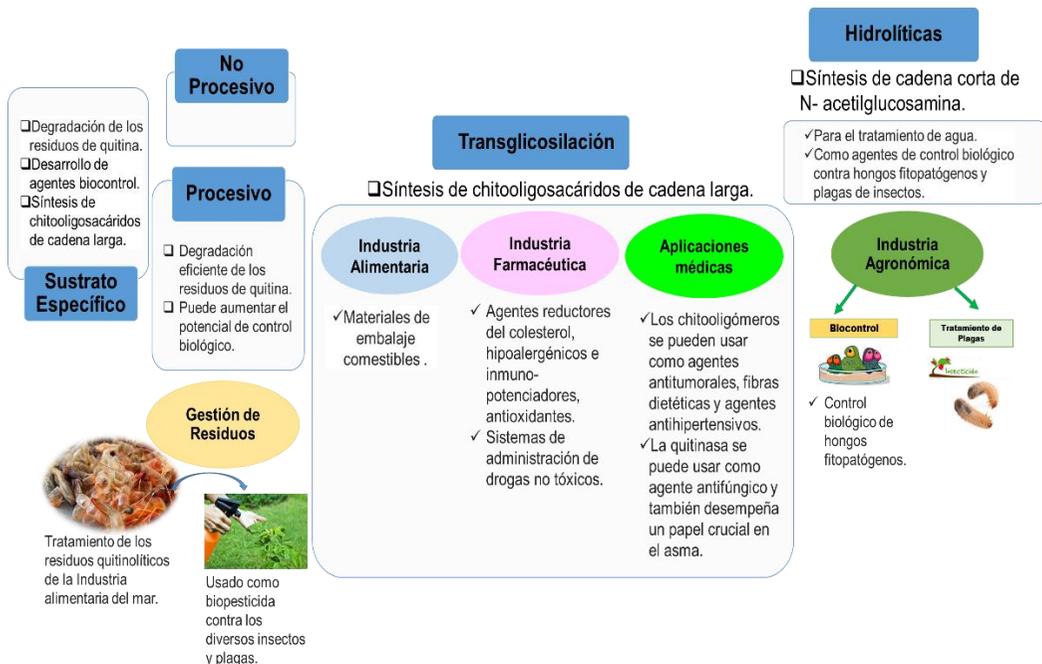
En los vertebrados las quitinasas pueden encontrarse en el tracto digestivo y gastrointestinal actuando como una enzima quitinolítica, por lo que las quitinasas en los mamíferos juegan un papel muy importante

proporcionando inmunidad innata y en la digestión de alimentos. En humano, se ha encontrado niveles altos de quitinasas en pacientes con malaria, enfermedad causada por el protozoo *Plasmodium falciparum*. El aumento en la secreción de quitinasas en el organismo está relacionado con ciertas afecciones fisiopatológicas dominadas por las células Th2 que incluyen infección, fibrosis, alergia y asma. Puede ser utilizado como un biomarcador en casos de asma, al aumentar la secreción de quitinasa durante la inflamación a través de un mecanismo dependiente de interleucina, de modo que al inhibir la proteína se reduzca la inflamación, permitiendo ser una alternativa en la terapia del asma [Oshima y col., 2002; Shen y col., 2013; Renkema y col., 1995; Suzuki y col., 2001; Muzzarelli, 2010; Komi y col., 2016; Shuhui y col., 2009; Nagpure y col., 2014; Duru y col., 2013; Komi y col., 2018].

Las quitinasas en general son importantes debido a que tienen varias aplicaciones industriales, agrícolas y además pueden ser utilizadas en agronomía para el control de enfermedades y plagas de insectos en plantas. La capacidad que tienen las quitinasas para degradar la quitina las hace muy valiosas en la gestión de residuos, especialmente en el manejo de desechos marinos y además pueden ser utilizadas para la producción de biocombustibles [Yang y col., 2016a; Swiontek Brzezinska y col., 2014; Ramírez y Calzadía L, 2016].

Las quitinasas desempeñan un papel importante en la generación de: i) protoplastos fúngicos utilizados para estudiar la síntesis de la pared celular; ii) la producción de proteínas unicelulares que pueden

ser utilizadas como un alimento o un complemento alimenticio; iii) la producción de quitooligosacáridos, N-acetilglucosaminas y glucosaminas que tienen amplias aplicaciones en la industria farmacéutica, etc. Además, pueden usarse en la atención de la salud humana, en la terapia de enfermedades fúngicas y como aditivos en cremas antimicóticas [Dahiya y col., 2006]. En la Figura-1.5 se muestra esquemáticamente el amplio espectro de usos de las quitinasas.



**Figura I.5.** Principales aplicaciones actuales de las quitinasas según su mecanismo de acción.

### 1.3.1.1 Quitinasas y Agronomía

Las quitinasas presentan una serie de aplicaciones biológicas importantes en agronomía debido a su efecto beneficioso sobre las

plantas, tales como: i) mejoran el crecimiento y desarrollo, mejoran la capacidad de germinación, la longitud y actividad de la raíz, altura y tamaño de las plántulas, y floración [**Falcón-Rodríguez y col., 2012**]; ii) proporcionan inmunidad innata [**Subha Narayan y col., 2015**], brindan una mejor respuesta fisiológica [**Katiyar y col., 2015**], facilitan la acumulación de minerales durante su crecimiento [**Schultze y Kondorosi, 1996; Chatelain y col., 2014**], y además podrían funcionar como una posible vacuna frente a las enfermedades de las plantas [**Yin y col., 2010**].

Las plantas al ser sésiles han desarrollado mecanismos para adaptarse a variaciones tanto bióticas como abióticas, los quitooligosacáridos actúan directamente frente a cada una de estas variaciones proporcionándoles un mecanismo de defensa. Las quitinasas de la familia 19 son utilizadas en el control biológico y como fitopatógenos fúngicos, debido a que estas producen un mecanismo de defensa frente al ataque contra hongos patógenos [**Kawase y col., 2006**].

El control biológico es un método de control de plagas y enfermedades de las plantas que consiste en utilizar otros organismos vivos como mecanismo de defensa frente a fitopatógenos. Se desarrolla de manera intencional, directa por parte del hombre o indirecta mediante el manejo de interacciones existentes en el ecosistema agrícola [**Flint y Dreistadt, 1998**].

El control biológico puede llevarse a cabo de distintas maneras: utilizando sustancias y compuestos obtenidos a partir de la misma planta y en algunos casos usando otras plantas que actuarían como control biológico (alelopatía, plaguicidas botánicos, cultivos trampa, etc.), además de depredadores, parasitoides y patógenos. Entre los microorganismos patogénicos se incluyen bacterias, hongos y virus, que tienen la capacidad de matar o debilitar a sus huéspedes [**Huffaker y col., 1984**].

Las bacterias usadas como control biológico infectan a los insectos por vía digestiva, entre estos los más utilizados son *Bacillus thuringiensis* que controla mariposas, polillas, escarabajos, moscas y otros insectos plaga, se utiliza además en los cultivos para proporcionarle más resistencia frente a estas plagas y evitar el uso de otros plaguicidas [**Lemaux, 2008**].

Los hongos denominados como hongos entomopatógenos son aquellos organismos que producen una patogénesis letal en insectos o arácnidos, excluyendo aquellos hongos facultativos que pueden crecer sobre insectos o sustratos que contengan quitina. Estos hongos tienen la capacidad de atacar al insecto a través de la cutícula externa que está formada por una capa delgada que contiene lípidos y otra más gruesa que contiene quitina [**Evans y col., 1988**]. Dentro de este grupo se encuentran 89 especies de *Trichoderma* que son utilizados contra fitopatógenos [**Fry William, 2012**].

Entre los virus capaces de producir quitinasas y que comúnmente se utilizan como insecticida biológico destacan los baculovirus.

Los beneficios de la utilización de controles biológicos en los cultivos es proporcionar sostenibilidad a los cultivadores, disminuyendo la contaminación del agua y además no perjudican la estructura del suelo y son de gran importancia económica en la agricultura. Actualmente el mercado de bioplaguicidas representa sólo una pequeña parte del mercado global, pero se espera que crezca muy rápidamente para el 2022 con tasa de crecimiento de 15,34 % [Chen, 2017].

Desde 1980 la quitina en polvo de ciertos crustáceos se ha utilizado para los cultivos como bioplaguicidas, biofertilizantes y en forma de biofilm [Ha y Huang, 2007; El Hadrami y col., 2010; Trouvelot y col., 2014]. Las quitinasas son de especial interés para los investigadores debido a que tienen varias características que determinan su actividad y su idoneidad para aplicaciones de campo. Entre estas cabe destacar: su aplicación en el control biológico de las plantas permitiendo de esta manera su uso como un pesticida alternativo, evitando el uso de pesticidas químicos que son caros, contaminan el medio ambiente y producen resistencia a ciertos patógenos, además de que no son tóxicos, son biodegradables, biocompatibles y tienen selectividad frente a una plaga [Barboza-Corona y col., 2008; Patil y col., 2000; Czaja y col., 2015].

### 1.1.3.2 Quitinasas en la Industria Alimentaria

Uno de los problemas más comunes para la industria hortofrutícola es el deterioro de frutas y hortalizas en post-cosecha, ya que representa pérdidas económicas importantes. Se estima que alrededor del 20-25% de las cosechas se deterioran por patógenos durante el manejo post-cosecha [Alkan y Fortes, 2015].

Recientemente se está viendo que la quitinasas por sí solas o en combinación con otras enzimas, fundamentalmente proteasas, podrían tener un gran papel en la industria alimentaria; donde además de poder utilizarse como aditivo y potenciador del sabor [Hamed y col., 2016; Jung y Park, 2014], también podrían utilizarse en la elaboración de envases activos (antimicrobianos) utilizables para la conservación, protección y comercialización de los alimentos frescos con el objetivo de extender su vida media manteniendo su calidad nutricional y seguridad alimentaria [Ozdemir y Floros, 2010], debido a que los alimentos frescos pueden contener microorganismos que podrían deteriorar los alimentos. Por ello esta aplicación emergente de las quitinasas, bien en forma de sprays o en películas, es de gran interés, ya que su uso podría prolongar la vida media de alimentos frescos perecederos [da Silva, 2019], evitando el desarrollo de hongos y bacterias que afectan al alimento fresco, como por ejemplo manzanas, naranjas, peras, mandarinas etc., e incluso los champiñones.

### 1.1.3.3 Otras Aplicaciones de Quitinasas

Actualmente las quitinasas son de gran interés a nivel industrial debido a su uso directo o más frecuentemente al uso de los productos obtenidos a partir de su acción sobre sustratos ricos en quitina. De esta manera las quitinasas y/o sus productos (quitino-oligosacáridos) son utilizados en diversas aplicaciones en la industria medico-farmacéutica, debido a que tienen propiedades hipoalergénicas, hipocolesterolémicas, antitumorales, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes y de cicatrización de heridas, el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, fabricación de materiales quirúrgicos e implantes y además en la preparación de suplementos dietéticos para mejorar el sistema inmunológico [Martínez y col., 2012; Askolin y col., 2001; Howard y col., 2003; Nguyen-Thi y Doucet, 2016].

### 1.1.4 Producción de Quitinasas por Fermentación

Las quitinasas se pueden producir mediante varios tipos o procesos biotecnológicos de fermentación, tales como: fermentación en estado sólido, o fermentación sumergida, bien bajo la modalidad de fermentación discontinua, fermentación semicontinua o fermentación continua [Joshi y col., 1989]. Normalmente estos procesos de fermentación suelen llevarse a cabo en medios formulados con productos ricos en quitina [Bautista y col., 1986], ya que la quitina externa presente en el medio de cultivo, induce la expresión de quitinasas extracelulares. Los organismos que son capaces de producir quitinasas extracelulares consumen quitina como fuente potencial de

carbono y nitrógeno [Dahiya y col., 2006].

Se entiende por fermentación al proceso en el que los microorganismos tienen la capacidad de producir metabolitos o biomasa mediante el uso de sustancias orgánicas en ausencia o presencia de oxígeno [Hernández, 2013]. Los microorganismos obtienen su energía y fuente de carbono a través de la degradación de los compuestos orgánicos, en este caso de la quitina, y producen ciertas enzimas, entre estas quitinasas [Ward, 1989].

A escala industrial la producción de quitinasas, aunque relativamente limitada en comparación con otras enzimas hidrolíticas, se suele llevar a cabo bien en fermentación sumergida o en fermentación en estado sólido, utilizando sustratos ricos en quitina como inductor, generalmente derivados de crustáceos, procedentes del procesamiento industrial o de restos marinos [Rojas-Avelizapa y col., 1999]. Sin embargo, el uso de sustratos ricos en quitina procedentes de otros orígenes, hasta la fecha, se han utilizado mucho menos e incluso en algunos casos no se han utilizado nunca. Este sería el caso de los subproductos del cultivo de hongos comestibles, particularmente del cultivo del champiñón.

### **a) Fermentación en Medio Sólido**

La fermentación en medio sólido tiene sus orígenes desde nuestros ancestros, estos procesos tradicionales se desarrollaban en diversas partes del mundo, uno de estos ejemplos es el Koji y el Tempeh, alimentos preparados por el cultivo de hongos filamentosos (*Rhizopus*

*oligosporus*) sobre materiales sólidos que posteriormente las personas lo consumían y al igual forma los quesos Camembert y Roquefort en Europa. Tanto en Asia como Europa en la actualidad estos productos se siguen produciendo de la misma manera o ligeramente modificados [Pandey, 1992].

Este tipo de fermentaciones se suele utilizar para la obtención de enzimas fúngicas, debido a que el sustrato con una cantidad limitada de agua pueda utilizarse como soporte para el crecimiento de los hongos, evitando de esta manera el crecimiento de otros microorganismos como bacterias y levaduras. Los hongos tienden además a adaptarse de mejor manera a los sustratos sólidos húmedos, permitiendo de esta forma la obtención de productos únicos [Viniestra, 2000] gracias a la secreción de enzimas hidrolíticas que les permite obtener el alimento y la energía necesaria para su desarrollo.

Las ventajas de utilización de este tipo de fermentación es que el costo de inversión, coste energético y volumen de agua residual producida es menor [Ward, 1989]. Además de que se obtienen cultivos con alta estabilidad y alta eficiencia biosintética, tienen mejor contacto con el sustrato y por lo tanto mejor difusión de oxígeno, poco gasto de energía, y menor susceptibilidad al estrés osmótico, esto se debe a que el crecimiento del microorganismo en este tipo de cultivos se presenta de forma heterogénea con la posibilidad de encontrar diferentes gradientes de concentración [Viniestra y col., 2003]. Aunque, este tipo de cultivo tiene como desventaja que no se puede controlar fácilmente el pH, y la temperatura y además la esterilización del sustrato, cuando esto

sea necesario, no suele ser tan fácil como en el caso de las fermentaciones sumergidas, debido a la naturaleza heterogénea de éste [Raimbault, 1998].

Existen escasos artículos sobre la producción de quitinasas mediante fermentación en estado sólido. Normalmente el cultivo suele llevarse a cabo mediante el sistema de bandejas o en tanques rotatorios utilizando como sustratos diversos subproductos agroindustriales suplementados con quitina colidal [Suresh y Chandrasekaran, 1998; Suresh y Chandrasekaran, 1999]. Sin embargo, el uso de subproductos ricos en quitina directamente como sustrato no se ha estudiado.

### **b) Fermentación en Estado líquido o Sumergida**

Se conoce como fermentación sumergida aquella en la que todos los nutrientes se encuentran disueltos formando una única fase, y se suele llevar a cabo mediante el control de determinados parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, agitación, oxígeno disuelto, etc.) [Vásquez Cárdenas, 2010].

Este método posee varias ventajas como: obtención de un producto más homogéneo, se puede controlar la temperatura, aireación, agitación y pH, la biomasa se puede medir directamente es por ello que es uno de los métodos más usados en la Industria Biotecnológica [Raimbault, 1998].

Las fermentaciones sumergidas pueden llevarse a cabo de diferentes

maneras o procedimientos, entre los que destacan: la fermentación discontinua, y la fermentación continua. Si bien también se pueden desarrollar mediante diversos tipos de fermentaciones semicontinuas.

### c) **Fermentación Discontinua**

Se conoce también como fermentación discontinua o por lotes (batch) donde los nutrientes o sustratos se suministran a un biorreactor de acuerdo a la cantidad requerida, se esterilizan, inoculan y el proceso se desarrolla bajo control de temperatura, pH, aireación y tiempo, logrando de esta manera controlar fácilmente la concentración del sustrato y la producción de los productos de interés [**Yamane y Shimizu, 2005**]. Una vez finalizada la fermentación se cosecha el caldo de fermentación y procede a la recuperación del producto a la vez que se reinicia el ciclo, limpieza, carga de nutrientes, esterilización, inoculación, etc.

Una manera de aumentar la productividad es mediante la técnica de repeated batch o semi-continua en la que no se cosecha el volumen completo del fermentador si no una parte (normalmente el 90%) dejando el restante 10% como inóculo y reponiendo el restante 90% con caldo fresco estéril. De esta manera se aumenta la productividad ya que se eliminan los tiempos de limpieza y esterilización del fermentador y del medio cuando este se hace en el fermentador [**Bautista y col., 1986**].

### d) **Fermentación Continua**

Las fermentaciones continuas se realiza en biorreactores altamente equipados con controles sofisticados, donde el sustrato es suministrado

de manera controlada y de forma continua. El proceso se realiza de manera tal que el volumen extraído es repuesto a la vez por medio de cultivo estéril, de manera continua. Este sistema permite la producción en continuo de los productos de interés (enzimas), por ejemplo, quitinasas. Este procedimiento requiere de un sistema de control altamente sofisticado si bien permite obtener altos rendimientos y productividad. [Fenice y col., 1998].

En relación con el sistema de producción, para la producción de quitinasas se requiere de una buena elección del medio de cultivo. En la mayoría de los casos las quitinasas se producen con una baja concentración de enzima, por lo que en cultivos en estado sólido, al utilizar volúmenes de medio de extracción más pequeños que los volúmenes utilizados en fermentaciones sumergidas, la concentración de la enzima es mayor. Este es el motivo por el que a veces se elige esta modalidad de cultivo, ya que en el caso de las fermentaciones sumergidas se requerirá de más pasos en los procesos de recuperación y purificación, pudiendo convertirse en un problema a la hora de la producción [Stoykov y col., 2015].

#### **1.1.4.1 Microorganismos**

Las quitinasas son producidas en un amplio abanico de microorganismos, siendo los mayores productores de quitinasas microbianas: *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio vulnificus*, *Streptomyces spp.*, *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma*

*harzianum* y *T. atroviride* [Horwitz y col., 1984; Joshi y col., 1988; Wortman y col., 1986; Ueno y col., 1990; Ridout y col., 1988; Vyas y Deshpande, 1989].

*Trichoderma harzianum* además de ser utilizado para producir quitinasas ha sido empleado también para la recuperación de materiales bioactivos como quitina/quitosano y quitino-oligosacáridos con actividad antioxidante, utilizando como sustrato residuos o subproductos de crustáceos, pero hasta la fecha no se han utilizado subproductos ricos en quitina de origen fúngico. También se ha utilizado para combatir infecciones de plantas por hongos patógenos y/o insectos ya que su actividad quitinolítica permite que degrade la estructura de la pared celular de los hongos fitopatógenos y los exoesqueletos de insectos, pudiendo de esta manera ser utilizado como un control biológico [Nava, 2009].

Las bacterias utilizan la quitina como única fuente de carbono y energía; logrando de esta manera secretar un coctel de quitinasas durante la patogénesis en el hospedador o durante la hidrólisis de los desechos quitinosos, lo que facilita su acción [Nakanishi y col., 2001].

Las quitinasas se expresan en varios organismos incluidos aquellos que en su estructura no contienen quitina como plantas, bacterias, y virus, pero se ha demostrado que para la producción en grandes cantidades de esta enzima se requiere de sustratos específicos que contengan quitina debido a que son utilizados como un inductor. La producción de quitinasas está ampliamente distribuida en todos los reinos vivos; siendo las bacterias y hongos los principales degradadores

de quitina, y son importantes en el reciclaje biogeoquímico del carbono y nitrógeno favoreciendo la hidrólisis de la quitina para uso propio o de otros microorganismos [**Adrangi y Faramarzi, 2013; Karasuda y col., 2003; Shinoda y col., 2001**].

#### **1.1.4.2 Factores extrínsecos de Cultivo**

La producción de quitinasas, como de cualquier otra enzima, viene condicionada por una serie de factores extrínsecos tales como son la naturaleza del sustrato (tipos de nutrientes), humedad, actividad del agua, cantidad de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, pH, temperatura, concentración, inóculo, y tipo o sistema de cultivo. Pero de todos ellos, el medio de cultivo o sustrato sobre el que se va a llevar a cabo el crecimiento y por tanto la producción de quitinasas, es de especial interés tanto técnico como económico [**Smith y col., 1990; Byrne y Ward, 1989; Jüsten y col., 1996; Oldshue, 1966; Einsele, 1978**], como se discutirá más abajo.

En relación con los parámetros físico-químicos del cultivo, existen trabajos en los que se indica que las quitinasas se expresan de pH neutro a básico [**Leger y col., 1998**]. El pH de un cultivo puede cambiar debido a ciertas actividades metabólicas por razones como: secreción de ácido acético o láctico, la asimilación de ácidos orgánicos presentes en ciertos medios, utilización de fuentes de nitrógeno y modificaciones del sustrato. Por este motivo en el caso de cultivos en medio sólido hay que considerar que el microorganismo a utilizarse tenga un amplio rango de pH [**Huerta, 2000**].

En cuanto a la temperatura, esta depende del microorganismo, si bien, generalmente están sobre los 30 °C, aunque el uso de cepas termoestables son grandemente deseables, sobre todo por las ventajas que presenta trabajar a altas temperaturas, ya que desde el punto de vista de posibles contaminaciones trabajar bajo estas condiciones de altas temperaturas minimiza grandemente el riesgo [**Mohamed y col., 2019**].

La aireación y agitación son parámetros fundamentales, sobre todo, en cultivos en medio líquido, ya que una aireación y agitación adecuadas facilitan la solubilidad del oxígeno y por lo tanto mejoran la productividad; mientras que en un cultivo sólido la agitación puede tener efectos negativos debido a que puede provocar la ruptura del micelio y por lo tanto una disminución en la productividad [**Smith y col., 1990; Cui y col., 1997**]. En el caso de los cultivos sólidos una buena aireación es necesaria para lograr una buena oxigenación del cultivo, y por lo tanto para el desarrollo del cultivo [**Liu y col., 2003**].

### **1.4.3 Medios de cultivo (Sustratos)**

Si bien los parámetros físico-químicos, como hemos indicado más arriba, son esenciales para la producción de quitinasas, como de cualquier enzima, la naturaleza del sustrato, su disponibilidad y coste, son fundamentales a la hora de su desarrollo e implantación. Estos han de ser abundantes, no depender de estacionalidades, baratos y contener cantidades importantes de quitina en su composición; ya que tanto en fermentación en medio sólido como en medio líquido la

producción de quitinasas, además de producirse constitutivamente, son inducibles. Esto quiere decir que la utilización de una fuente rica en quitina podría actuar como inductor para aumentar la producción de quitinasas.

En general los sustratos, utilizados para producir quitinasas, son en su mayoría subproductos derivados de crustáceos (industriales o naturales) [Tengerdy, 1985; Pandey, 1992]. Sashiwa en 2002 fue el primero que informó sobre la producción de quitinasas a partir de quitina del caparazón de cangrejo con *Aeromonas hydrophila* H2330 [Sashiwa y col., 2002]. A partir de ahí se han obtenido varias quitinasas de diferentes organismos en sustratos que contienen quitina [Wang y col., 2006; Suresh y Anil, 2012; Wang y col., 2012; Zhang y col., 2016; Yang y col., 2016a; Yang y col., 2016b; Krolicka y col., 2018; Kumar y col., 2017; Liu y col., 2013; Fu y col., 2016].

Sin embargo, también los subproductos agrícolas y derivados de la industria agroalimentaria podrían ser de interés. Estos sustratos deben tener en su composición importantes cantidades de nutrientes que puedan ser utilizados como fuente carbonada y nitrogenada utilizables como fuente de energía para el crecimiento y producción de las enzimas, pero además deben contener quitina para que pueda actuar como inductor de la síntesis de las quitinasas [Urbina-Salazar y col., 2018]. Esto solo puede lograrse suplementándolos con quitina de crustáceo coloidal o utilizando subproductos agroalimentarios ricos en quitina por sí, como por ejemplo los subproductos del cultivo industrial de setas y hongos comestibles.

### **1.2 Subproductos Agroindustriales ricos en Quitina como fuente de fermentación para la producción de quitinasas.**

Desde de un punto de vista realista los dos principales subproductos ricos en quitina son: el exoesqueleto de crustáceos procedente del procesamiento industrial o de los grandes depósitos existentes en la Antártida, y los subproductos agroindustriales procedentes de la industria de setas y hongos comestibles [Urbina-Salazar y col., 2018] y de la producción de ácido cítrico [Muñoz y col., 2015].

La quitina al presentar una estructura resistente, inflexible e insoluble es difícil de eliminar o degradar, ocasionando de esta manera la contaminación del medioambiente donde se deposita. Dependiendo del origen de la quitina, la quitina de crustáceos se almacena en regiones costeras y/o zonas industriales de procesamiento de mariscos y la quitina de hongos comestibles (quitina fúngica) procedentes de las Industrias conserveras del champiñón y producción de ácido cítrico.

En relación con los subproductos ricos en quitina procedentes de la industria agroalimentaria, a pesar de la gran cantidad de residuo/desecho que se generan anualmente hasta hoy en día no se está desarrollando métodos o procedimientos adecuados para la utilización de estos subproductos para su valorización como fuente de compuestos de interés industrial y de alto valor añadido. Estos residuos, debido a su composición, al ser procesados podrían generar compuestos de gran interés, tales como: quitosano, quitooligosacáridos

y glucosamina, que podrían tener diversas aplicaciones industriales [Buruleanu y col., 2018].

El quitosano, obtenido por desacetilación de la quitina, bien por vía química o por vía enzimática, se ha utilizado como materiales funcionales en los campos de la alimentación, la salud o la agricultura debido a su biocompatibilidad, no toxicidad y disponibilidad de biomasa abundante y económica [Baranwal y col., 2018].

Los quitooligosacáridos, obtenidos bien por vía química o enzimática tienen aplicaciones de gran interés en el campo de la Biotecnología. Los quitooligosacáridos, obtenidos mediante procesos enzimáticos tienen un mejor control del grado de polimerización y del grado de acetilación, además no tienen efectos secundarios perjudiciales, a diferencia de los obtenidos mediante procesos químicos que forman compuestos tóxicos que son difíciles de eliminar y producen un efecto negativo para el medio ambiente [Lodhi y col., 2014].

La N-acetil-glucosamina obtenida por degradación química o enzimática de la quitina, tiene diversas aplicaciones tanto en la industria alimentaria y como en la industria farmacéutica entre estas aplicaciones está: la producción de ácido siálico [Ogata y col., 2009], bioetanol [Inokuma y col., 2016], y proteínas unicelulares [Vyas y Deshpande, 1989], y como una terapia farmacéutica para trastornos de la inflamación gastrointestinal [Salvatore y col., 2000], y artrosis [Shikhman y col., 2005].

Como hemos indicado, existen varios subproductos agroindustriales ricos en quitina procedentes de la industria de hongos y setas comestibles, residuos de la industria del ácido cítrico, residuos de crustáceos y moluscos.

### **1.2.1 Subproductos de la Industria de Hongos y Setas Comestibles**

*Agaricus bisporus* es uno de los hongos comestibles cultivados en gran escala a nivel mundial por lo que se considera de gran importancia económica. El cultivo de champiñón nació por casualidad en Francia en el siglo XVII al haber abonado su cultivo con estiércol de caballo y utilizando como agua de regadío el agua que se usó para el lavado de champiñones silvestres, observaron después de unos días que creció una nueva variedad de champiñones. De esta manera se inició el cultivo del champiñón usando tres componentes básicos: un sustrato orgánico (estiércol de caballo) utilizado como medio de cultivo del hongo, un inóculo (agua de lavado de champiñones) que contiene pequeños residuos de tejido de champiñones y un microambiente adecuado (temperatura, humedad y aireación) [Labarère, 1994].

Desde Francia se expandió el cultivo de champiñón hacia el resto de Europa. En Estados Unidos aparece en 1880 tras ser introducido por unos emigrantes españoles, en 1893 Costantin y Matruchot lograron obtener el inóculo a partir de cultivos puros de *Agaricus bisporus* crecido sobre un compost esterilizado (exento de patógenos) evitándose de esta manera la propagación de enfermedades. Posteriormente se realizaron

otros estudios en los que se indicaron que el champiñón requería además de otros nutrientes esenciales como lignina, celulosa y hemicelulosa [Hayes, 1977].

En España el cultivo de champiñón se inicia a principios de los años cincuenta de manera artesanal, y se realizaba en cuevas, bodegas, principalmente en la Rioja y Castilla - la Mancha. En la actualidad el cultivo de champiñón se sigue realizando por el método del compostaje pero con procesos más controlados [Pardo, 1994]; existiendo tres métodos o procedimientos: el método francés, el método holandés y el método americano.

En cuanto a la clasificación taxonómica el champiñón común, champiñón de París -cuyo nombre científico es *Agaricus bisporus*- es una especie de hongo basidiomiceto de la familia Agaricales nativo de Europa y América del norte, cultivado extensamente para su uso alimentario.

### **Descripción Taxonómica de *Agaricus bisporus***

**Reino:** Fungi

**División:** Basidiomycota

**Clase:** Agaricomycetes

**Subclase:** Agaricomycetidae

**Orden:** Agaricales

**Familia:** Agaricaceae

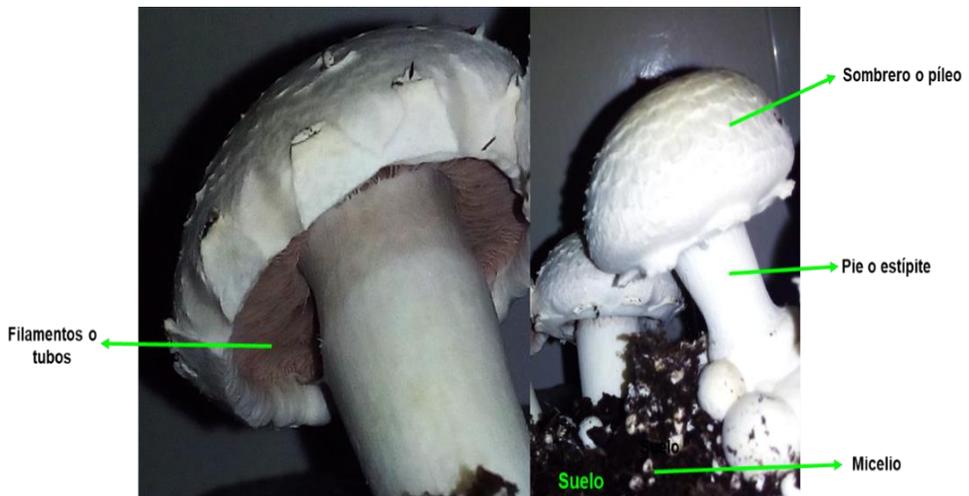
**Género:** *Agaricus*

**Especie:** *Agaricus bisporus* [Lange, 1926; Imbach, 1946]

**Nombre Común:** Champiñón

**Nombre Científico:** *Agaricus bisporus*

Como puede observarse en la Figura-I.6, en la parte visible del champiñón, o cuerpo fructífero, se pueden distinguir 2 partes principales: el sombrero o píleo, y el pié, tallo o estípite, y en la parte subterránea del champiñón se encuentra el micelio, cuyas células poseen una estructura externa y rígida denominada pared celular que está protegida por la membrana plasmática cuya función es la de mantener la forma y protegerle de daños mecánicos, químicos y osmóticos.



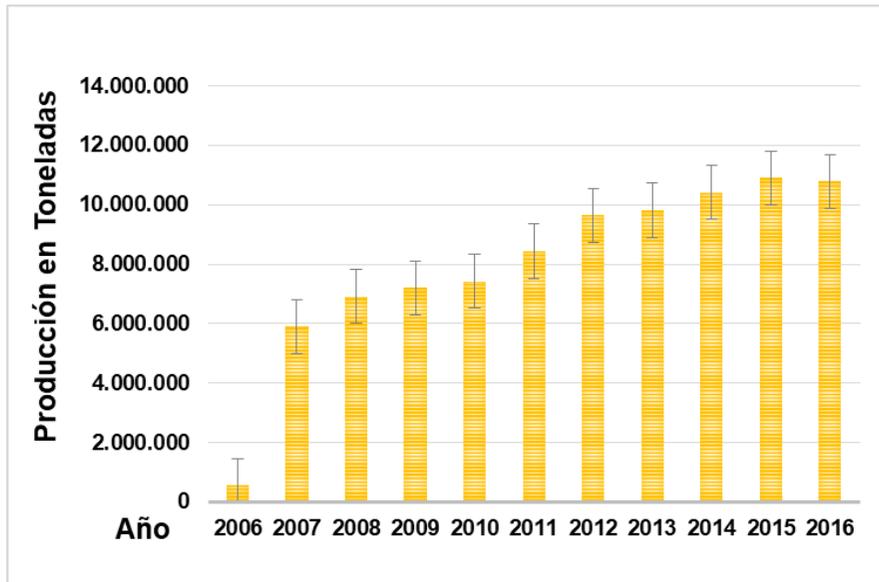
**Figura I.6.** Morfología de *Agaricus bisporus*.

Estas paredes celulares contienen un alto porcentaje de polisacáridos, seguidos de proteínas, lípidos, pigmentos y sales minerales [Bartnicki-García, 1968]. Siendo el polisacárido más importante la Quitina que se presenta en forma microfibrilar unida covalentemente a un 1,3-1,6  $\beta$ -glucano, a las que se asocian pequeñas proporciones de glicanos y otros componentes de naturaleza fibrilar como el mucílago [García Mendoza y col., 1987], formando de esta manera un complejo fibrilar insoluble en álcali [López, 2003].

Además de los polisacáridos, existen también ciertas proteínas que juegan un papel importante en la estructura de la pared celular y otras con funciones plásticas como el caso de las enzimas degradativas y biosintéticas encargadas en el proceso de crecimiento y morfogénesis. Los polisacáridos y proteínas contenidas en las paredes celulares son digeridas por sus correspondientes enzimas degradativas ya sea para cambios morfogénéticos durante su ciclo biológico o como parasitismo. A este respecto, en los hongos y en particular en *Agaricus bisporus* ha podido demostrarse la presencia de enzimas como glucanasas, quitinasas y proteasas [Zhang y col., 2019].

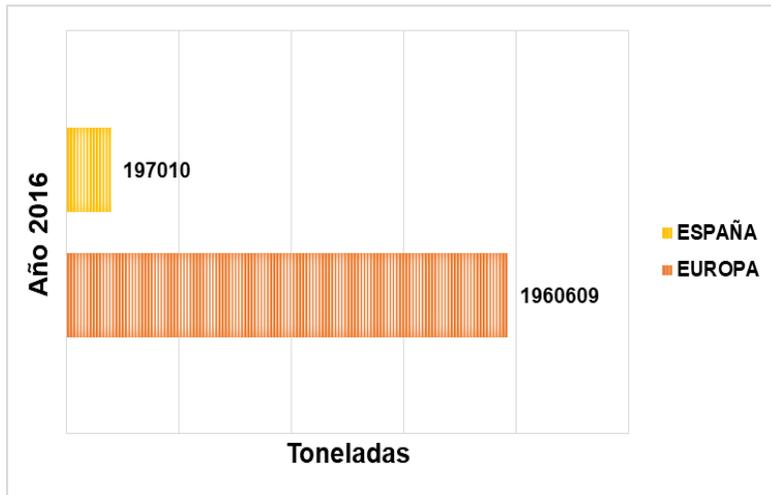
La demanda de hongos comestibles ha incrementado drásticamente en los últimos años debido al desarrollo de nuevos métodos de cultivo mecanizados y al incremento en la aceptación de este tipo de productos por parte de los consumidores, ya que cada vez se conocen más las propiedades nutricionales y saludables de éste alimento [Atila y col., 2017; Muszyńska, y col., 2017].

Según los datos obtenidos de la FAO la producción en el año 2016 fue de aproximadamente 10.790.859 Tm [FAO STAT, 2018a], de los cuales Asia se encuentra en el primer lugar con un 76% de producción, seguido por Europa (18%), América (5%); Oceanía y África con menos del 1% (ver Figura-I.7).



**Figura I.7.** Producción mundial de Hongos y setas comestibles. Adaptado de datos FAO STAT 2018a.

De la producción total correspondiente al continente europeo en el año 2016 (Figura-I.8) el 9% corresponde a la producción de España (197.010 Tm), siendo la Rioja el mayor productor y líder del país, seguido de Castilla-La Mancha (La manchuela, Albacete). En Europa el 90% de la venta de hongos comestibles corresponde a la especie *Agaricus bisporus*, sea esto para consumo en fresco o procesado en forma de conservas [Fletcher, 2001]. Debido a su agradable sabor y valor nutricional son muy apreciados por el consumidor, aunque tienen como desventaja su corta vida media, unos 15 días a 4 °C, ya que son altamente perecibles en fresco, debido al pardeamiento enzimático y degradación.

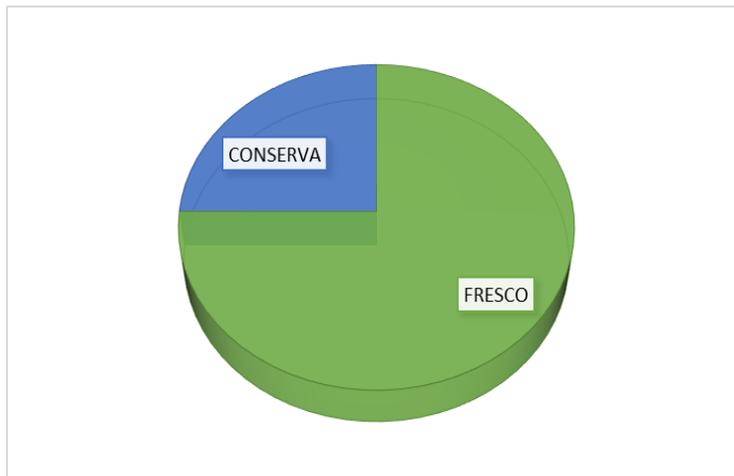


**Figura I.8.** Producción de Hongos y setas comestibles en Europa en el 2016. Adaptado de datos FAO STAT 2018a.

*Agaricus bisporus* al conservarse en refrigeración (2 - 4 °C) reduce su actividad microbiana que es el principal responsable de su deterioro y puede permanecer así por un período de vida de hasta 13-15 días utilizando películas plásticas y/o atmósferas especiales [Devece y col., 1999; Kotwaliwale y col., 2007; Beelman y col., 1989; Burlo y col., 2004].

La producción de hongos y setas comestibles en España en fresco es del 75% (147.757 Tm), mientras que la comercialización actual en conserva es del 25% (49.253 Tm) siendo un poco más alto en comparación con años anteriores debido a la alta demanda experimentada por los productos listos para el consumo, específicamente en forma de conserva (ver Figura-R.9). El champiñón en forma de conserva pasa por un tratamiento denominado escaldado, que consiste en someter al champiñón a una temperatura adecuada que tiene por objetivo reducir el pardeamiento enzimático, los champiñones

se envasan en un recipiente de hojalata y son cerrados herméticamente evitando cualquier tipo de contaminación [Biekman y col., 1997].



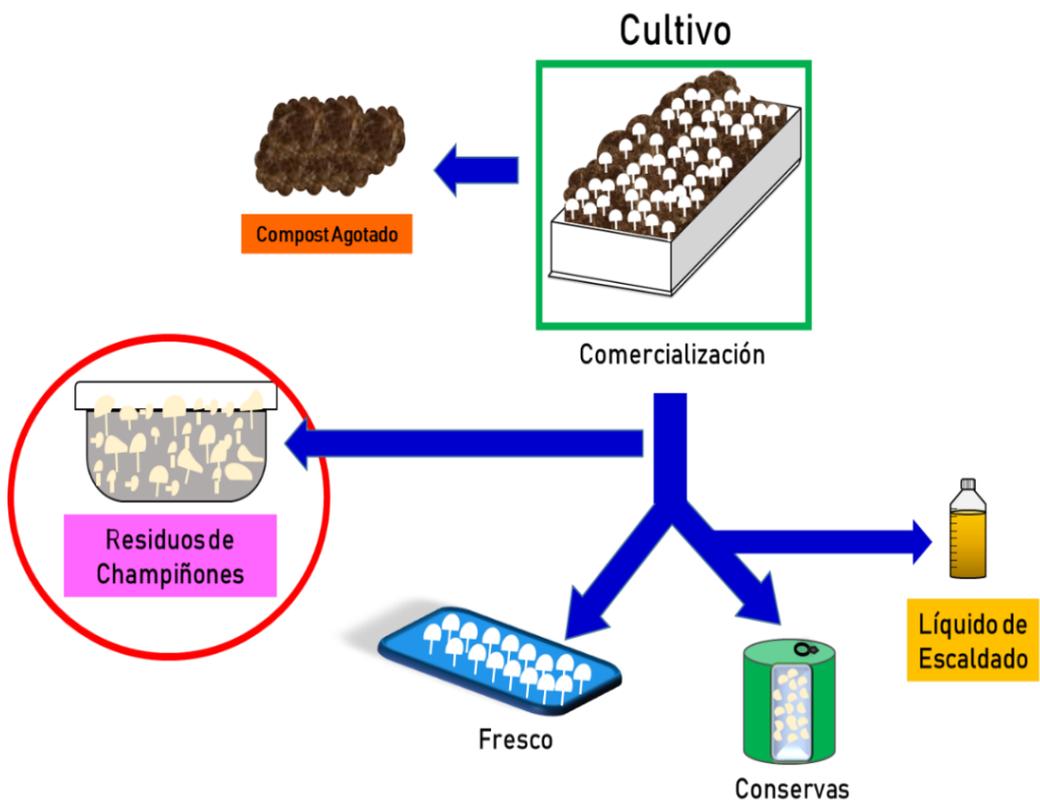
**Figura I.9.** Consumo de Hongos y setas comestibles en España en el 2016. Adaptado de datos FAO STAT 2018b.

Esta gran producción de hongos y setas comestibles genera 3 tipos diferentes de subproductos o material de desecho: 1) compost agotado, 2) residuos de champiñón (tallos y champiñones no comercializables) y 3) el líquido de escaldado (Figura-I.10), representando un desafío medioambiental para las Industrias del ramo, ya que su eliminación no adecuada podría y puede generar graves problemas medioambientales [Buruleanu y col., 2018].

Descartando el compost agotado, que no se tratará en este trabajo, los otros dos subproductos generados en la producción y procesamiento del champiñón son: los tallos y champiñones no comercializables generados tanto en el procesamiento para fresco como en el procesamiento de conservas, y el líquido de escaldado, generado

únicamente en el procesamiento de conservas.

La mayor parte de estos residuos actualmente no se utiliza y en algunos casos son utilizados como alimento animal o como abono, fundamentalmente los tallos y champiñones no comercializables. Sin embargo al ser un alimento rico en quitina y proteína podría ser utilizado como fuente para la producción de quitinasas y de otros compuestos de interés para las diferentes Industrias.



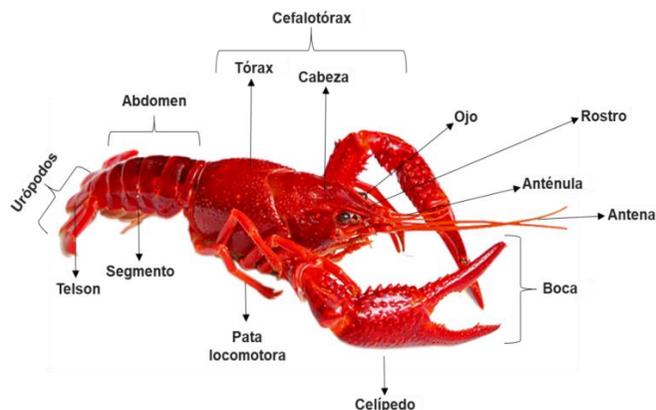
**Figura I.10.** Subproductos obtenidos del cultivo del champiñón.

En cuanto al líquido de escaldado, generalmente es vertido a la red, en unos casos previo tratamiento en depuradoras y otros directamente.

### 1.2.2 Subproductos de la Industria de Crustáceos

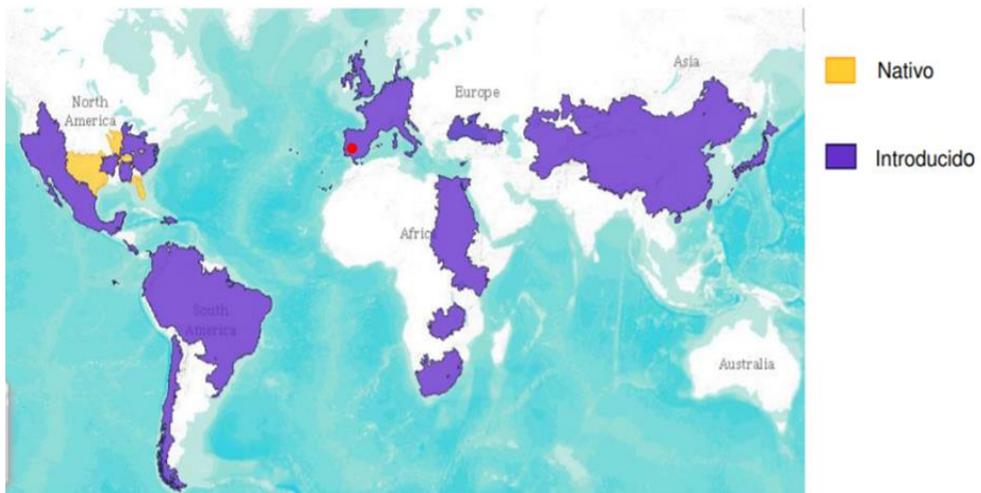
Los Crustáceos son un extenso grupo de artrópodos que se caracterizan por tener un exoesqueleto formado principalmente por quitina. Pertenecen a éste grupo las langostas (*Palinurus elephas*), langostinos (*Dendrobranchiata*), percebes (*Pollicipes pollicipes*) y cangrejos, que pueden habitar en distintos sitios como el mar, agua salobre y agua dulce dependiendo de la especie.

En relación con nuestra ubicación (Sevilla, España), la principal fuente de subproductos ricos en quitina se localiza en la zona de los arrozales de las Marisma del río Guadalquivir, donde desde los años 1970 se ha desarrollado una importante industria basada en el procesamiento del cangrejo rojo de río (*Procambarus clarkii*) (Figura I.11). Esta industria genera una importante cantidad de subproductos (cabeza, tórax y pinzas) que prácticamente no se utiliza o infrutiliza y que en la mayoría de los casos se esparce por el campo. Lo que potencialmente supone un grave problema medioambiental debido a su fácil podredumbre y deterioro.



**Figura I.11.** Morfología de *Procambarus clarkii*.

*Procambarus clarkii* es una especie nativa del sureste de Estados Unidos y del Noreste de México [Rodríguez y col., 2005], y posteriormente fue introducido en los demás continentes [Hoobs, 1984; Gherardi y Holdich, 1999; Gil-Sánchez y Alba, 2006; Souty-Grosset y col., 2006], (ver Figura-I.12).



**Figura I.12.** Distribución mundial de *Procambarus clarkii*. Tomado de IUCN Red List guiding conservation 2014.

### Descripción Taxonómica de *Procambarus clarkii*

**Reino:** Animal

**Rama:** Antrópodos

**Clase:** Crustacea

**Subclase:** Malacostraca

**Superorden:** Eucarida

**Orden:** Decapoda

**Familia:** Astacidae

**Género:** *Procambarus*

**Especie:** *Procambarus clarkii* (Girard, 1852)

**Nombre Común:** Cangrejo de río

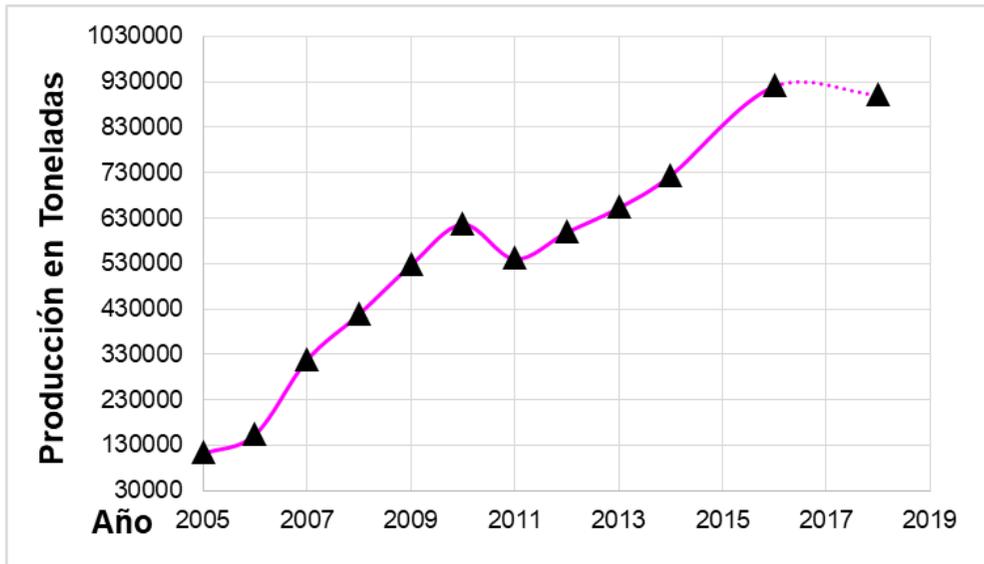
**Nombre Científico:** *Procambarus clarkii*

Los *astacidae* o cangrejo de río son crustáceos decápodos que presenta un rostro estrecho y alargado, la pinza bien definida, un saliente muy fuerte en el carpopodito, y un cefalotórax característico de color rojo y rugoso [Girard, 1852; Arrignon, 1985].

### **Producción y comercialización de *Procambarus clarkii***

La producción mundial de *Procambarus clarkii* en el año 2016 ha sido de aproximadamente 920.000 toneladas (Figura-I.13). La mayor producción de esta especie, hasta 2002 tuvo lugar en los Estados Unidos, pero actualmente la mayor producción proviene de China seguida por Estados Unidos. Hasta el 2005 en la FAO sólo fueron reportados los datos estadísticos de producción de Estados Unidos y China. Aunque se conoce que existen otros países como Costa Rica, México, España y Zambia que también son productores de esta especie [FAO FishStat, 2016]

En España actualmente la producción es de unas 5000 toneladas al año localizándose su procesamiento prácticamente en la zona de la Marisma del Guadalquivir.



**Figura I.13.** Producción mundial de *Procambarus clarkii*.

En el año 2000 en la región Andaluza se procesó 3700 toneladas de cangrejo vivo, de las cuales el 65,89% se comercializaron enteros y el 31,21% se procesan para obtener colas [Mediterranean Business Consulting. S.L. 2001]. Actualmente en Andalucía se generan 1.500 toneladas al año de desecho de *Procambarus clarkii* (cefalotórax y pinzas, fundamentalmente) que prácticamente no se utilizan o mal utilizan, constituyendo un foco contaminante grande, sobre todo en la Marisma (Isla Mayor, Sevilla), donde están ubicadas las principales plantas procesadoras de este crustáceo.

Durante el procesamiento del marisco se produce enormes cantidades de residuos de caparazón y parte del esqueleto (cefalotórax y pinzas) de cangrejo, generándose de esta manera entre el 75 y 85% de residuo, convirtiéndose así en un problema no solo para la industria

del procesamiento de productos marinos sino también para el medioambiente [Russ y Meyer-Pittroff, 2004], debido a que su eliminación es bastante compleja y costosa [Gildberg y Stenberg, 2001]. Estos residuos o subproductos ricos en quitina (pueden contener del 25 al 30% de quitina en peso seco) debido a su alto contenido en quitina podrán utilizarse para obtener productos de interés industrial de alto valor añadido, tales como nanoquitina, quitosano, oligo-quitino-oligosacáridos, etc. [Tsujibo y col., 1998; Meruvu y Donthireddy, 2014; Krishnaveni y Ragnathan, 2015].

Estos residuos, habitualmente, no son tratados adecuadamente y frecuentemente son eliminados mediante métodos convencionales como: el vertido en el océano, la incineración y el relleno de la tierra provocando de esta manera una contaminación ambiental y biológica, lo que ha llevado a nuevas búsquedas de eliminación de estos residuos [Brzezinska y col., 2013].

Estos residuos o subproductos no solo contienen quitina sino también proteínas y sales minerales, por lo que además de sustancias derivadas de la quitina, también podrían utilizarse para obtenerse hidrolizados proteicos de alto valor nutritivo [Cremades y col., 2001,2003]. En relación con esto, existen tratamientos químicos con alcali fuerte y ácidos para su desproteínización y desmineralización utilizados para la obtención de quitina y quitosano, sin embargo este procedimiento tiene una serie de inconvenientes como la gran cantidad de aguas residuales con concentraciones altas de alcali que se generan. Es por ello que se necesitan de procesos alternativos biotecnológicos para la obtención de

quitina y sus derivados. Así la desmineralización podría llevarse a cabo mediante procesos de fermentación láctica [**Bautista y col., 2001**], y la desproteínización se podría llevar a cabo mediante procesos de fermentación con microorganismos proteolíticos, que es un procedimiento menos costoso, menos contaminante y más compatible con el medio ambiente [**Wang y Liang, 2017; Wang, 2012; Kaur y Dhillon, 2015; Younes y Rinaudo, 2015; Younes y col., 2016; Ghorbel-Bellaaj y col., 2011**].

Actualmente son pocos los usos de este subproducto, salvo su aplicación como alimento de gallinas y pollos [**Gómez, 2014**], generalmente no se utiliza o mal-utiliza dispersándolo por el campo, constituyendo focos de contaminación importantes. Si bien, debido a su composición, podría utilizarse como fuente de partida para la obtención de productos de alto valor añadido, como son la quitina y nano-quitina, las astaxantina (antioxidante carotenoide: 3,3'-dihidroxy- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) y carotenoproteínas [**Cremades y col., 2001, 2003**].

Además, este subproducto tiene un gran potencial en el campo biotecnológico relacionado con la producción de enzimas, ya que debido a su composición podría ser utilizado como sustrato en la fermentación para la obtención de hidrolasas, destacando en especial la producción de quitinasas, proteasas y otros materiales bioactivos de alto valor añadido que son muy demandados industrialmente, como por ejemplo la industria farmacéutica, cosmética, química y en agronomía [**Liang y col., 2016; Wang y col., 2009a; Kuo y col., 2011; Wang y col., 2016**;

**Wang y col., 2009b; Nguyen y col., 2017; Nguyen y Wang, 2017; Nguyen y Wang, 2018; Wang y col., 2008].**

De lo discutido más arriba, queda claro que los subproductos agroindustriales ricos en quitina, debido a su composición, constituyen materias primas de partida, con un alto potencial de valorización para la obtención de diferentes materiales bioactivos de alto valor añadido aplicables de distintos sectores industriales. Hasta la fecha prácticamente, la gran mayoría de los trabajos se han centrado en el uso de los subproductos procedentes de la industria del procesamiento de los crustáceos y en los grandes depósitos existentes en la Antártida. Si bien, esta fuente, con el tiempo, se ha revelado finita, y actualmente tiende al agotamiento. Por otro lado, la industria del procesamiento de crustáceos no sería capaz de suministrar toda la materia prima demandada actualmente y sobre todo en el futuro. Es por ello que es necesario investigar nuevas fuentes de quitina que cubra o ayude a cubrir estas necesidades. Entre estas fuentes, las materias primas ricas en quitina de origen fúngico, por su carácter altamente renovable, y las cantidades manejables, en particular la procedente del cultivo mecanizado de setas y hongos comestibles, constituye un material idóneo para dichos fines.

Por ello, en el presente trabajo de Tesis nos centraremos en el estudio de los subproductos procedentes de la industria del champiñón como fuente de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas y en particular de quitinasas, como una de las alternativas posibles para la valorización de este tipo de subproducto.

# == OBJETIVOS ==



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

❖ Producir quitinasas en medios baratos ricos en quitina, utilizando subproductos de la industria alimentaria como medio de fermentación: Aplicación a los hongos comestibles y crustáceos.

### 2.2 Objetivos Específicos

❖ Preparación y caracterización de las fuentes de fermentación a partir de subproductos industriales (harina de tallos de champiñón, HTCH, F-Q/G y harina de cangrejo, HC).

❖ Producción de quitinasas por fermentación:

- Sumergida
- Estado sólido

❖ Estudio de la secreción de proteínas (secretoma) crecido en los diferentes medios de cultivo, mediante técnicas electroforéticas y proteómica.

❖ Extracción, concentración/fraccionamiento y estabilización de enzimas (quitinasas).

## Objetivos

---

- ❖ Producción de quitinasas a escala semi-piloto.
- ❖ Inmovilización de concentrado de quitinasas en forma de nano/micropartículas.

# **== MATERIALES Y MÉTODOS ==**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos, Materiales y Equipos

##### 3.1.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo de Tesis han sido de calidad analítica, y se muestran en la Tabla-M.1.

**Tabla-M.1.** Reactivos utilizados.

Reactivo	Fórmula	Casa Comercial
Acetato de sodio	$C_2H_3NaO_2$	Sigma-Aldrich, España
Acetona	$C_3H_6O$	Labbox, Barcelona-España
Ácido acético	$CH_3COOH$	Sigma-Aldrich, España
Ácido Bórico	$H_3BO_3$	Labbox, Barcelona-España
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$	Sigma-Aldrich, España
Ácido clorhídrico	HCl	Panreac, Barcelona-España
Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	$C_7H_4N_2O_7$	Sigma-Aldrich, España
Ácido fórmico	$CH_2O_2$	Merck, Darmstadt-Alemania
Ácido fosfórico	$H_3PO_4$	Sigma-Aldrich, España
Ácido Maleico	$C_4H_4O_4$	Sigma-Aldrich, España
Ácido sulfúrico conc.	$H_2SO_4$	Sigma-Aldrich, España
ACN (Acetonitrilo)	$C_2H_3N$	Sigma-Aldrich, España

Acrilamida	$C_3H_5NO$	Bio-rad, California-USA
APS (Persulfato amónico)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Merck, Darmstadt-Alemania
Avicel PH-101 (Celulosa microcristalina)	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Sigma-Aldrich, España
Azocaseína (Sulfanilamida azocaseína)		Sigma-Aldrich, España
Azul de bromofenol	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Sigma-Aldrich, España
Bicarbonato de amonio	$NH_4HCO_3$	Sigma-Aldrich, España
Bis-acrilamida	$C_7H_{10}N_2O_2$	Bio-rad, California-USA
BSA (Seroalbúmina bovina)		Thermo Fisher Scientific, Madrid-España
Citrato de sodio	$Na_3C_6H_5O_7$	Sigma-Aldrich, España
Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck, Darmstadt-Alemania
Cloruro de Cobalto (II) dihidratado	$CoCl_2 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich, España
Cloruro de Cobre (II) dihidratado	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich, España
Cloruro de magnesio	$MgCl_2$	Sigma-Aldrich, España
Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Sigma-Aldrich, España
Cloruro de Potasio	KCl	Panreac, Barcelona-España
Cloruro de sodio	NaCl	Panreac, Barcelona-España
Cloruro de Zinc	$ZnCl_2$	Sigma-Aldrich, España
Coomassie Brilliant Blue G-250	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	Bio-Rad Laboratories, California-USA
Coomassie Plus-the better (Bradford assay reagent)		Thermo Fisher Scientific,

		Madrid-España
Dihidrógeno fosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma-Aldrich, España
Ergosterol	$\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$	Sigma Aldrich, España
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Panreac, Barcelona-España
Extracto de levadura		Merck, Darmstadt-Alemania
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	Sigma-Aldrich, España
Fosfato de potasio dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Sigma-Aldrich, España
Fosfato disódico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Panreac, Barcelona-España
Glicerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Sigma-Aldrich, España
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Sigma-Aldrich, España
Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Sigma-Aldrich, España
Hexahidrato de Cloruro de hierro (III)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt-Alemania
Hexano	$\text{C}_6\text{H}_{14}$	Labbox, Barcelona-España
Hidróxido de sodio	$\text{NaOH}$	Panreac, Barcelona-España
Kit de tinción de plata		GE Healthcare, España
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, España
N-acetilglucosamina (N-Acetyl-D-Glucosamine)	$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$	Sigma-Aldrich, España
Nitrato de sodio	$\text{NaNO}_3$	Sigma-Aldrich, España
Peptona		Labbox, Barcelona-España

p-nitrofenil-β-glucopiranoside	$C_{12}H_{15}NO_8$	Sigma-Aldrich, España
p-nitrofenol	$C_6H_5NO_3$	Merck, Darmstadt-Alemania
Quitina polvo		Sigma Aldrich, España
SDS	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	Sigma Aldrich, España
Serva Blue G Dye		Sigma-Aldrich, España
Sulfato de amonio	$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich, España
Sulfato de Magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich, España
Sulfato Ferroso heptahidratado	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck, Darmstadt-Alemania
Sulfito Sódico	$Na_2SO_3$	Sigma-Aldrich, España
Tartrato de Sodio y Potasio	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	Sigma Aldrich, España
TEMED		Sigma-Aldrich, España
Tinción de rojo congo	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$	Labbox, Barcelona-España
Tricloroacético (TCA)	$C_2HCl_3O_2$	Labbox, Barcelona-España
Tripsina porcina		Promega, Madrid-España
Tris	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma Aldrich, España
Tris-HCl	$NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$	Sigma Aldrich, España
Xilano (beechwood)	$(C_5H_8O_4)_n$	Sigma Aldrich, España
Xilosa	$C_5H_{10}O_5$	Sigma Aldrich, España
Yodoacetamida	$C_2H_4INO$	Merck, Darmstadt-Alemania

$\beta$ -mercaptoetanol	$C_2H_6OS$	Panreac, Barcelona-España
-------------------------	------------	------------------------------

### 3.1.2. Materiales

Los materiales utilizados en el presente trabajo de Tesis se muestran en la Tabla-M.2.

**Tabla-M.2.** Materiales utilizados.

Nombre	Especificaciones	Casa Comercial
<b>Asa de platino</b>	<i>Asa de platino con mango metálico con mordaza y zona aislante. Dimensiones (mm): 0,1 x 135.</i>	IBDCiencia S.L.
<b>Botellas de Vidrio de diferentes volúmenes</b>	<i>Frasco de laboratorio de vidrio transparente con tapón de rosca.</i>	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Cápsulas de porcelana</b>	<i>Haldenwanger™</i>	Porcelaines Avignon™ 10804, Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Crisol</b>	<i>Crisoles esmaltados, diferentes tamaños, utilizados para incinerar o calcinar sustancias. Admiten temperaturas hasta 1050 °C.</i>	QuercusLab, España
<b>Cubetas de poliestireno</b>	<i>Cubetas de poliestireno para espectrofotometría visible 2 y 3 mL.</i>	Deltalab, Barcelona-España
<b>Cubetas de electroforesis</b>	<i>Cubetas MultiSUB Midi, 10 x 7cm &amp; 10 x 10cm UV tray, 2 x 16 sample combs.</i>	Cleaver Scientific LTD, Warwickshire-Reino Unido
<b>Embudos</b>	<i>Brand™ Embudo de vidrio de borosilicato.</i>	Fisher Scientific, Madrid-España

<b>Matraces Erlenmeyers de vidrio de diferentes volúmenes</b>	<i>Policarbonato cuello estrecho Nalgene.</i>	Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Matraces Erlenmeyers de vidrio de 2L</b>	<i>Policarbonato boca ancha</i>	DURAN, Main-Alemania
<b>Espátula</b>	<i>Espátula cuchara plana, longitud 120 mm, SPSS-120-005.</i>	Labbox, Barcelona-España
<b>Gradillas de eppendorf</b>	<i>Bastidores Labcon 96-Place Storage System 2500-229-000.</i>	Labcon, California-USA
<b>Gradilla para tubos Falcon</b>	<i>Gradilla rectangular para tubos Falcon, chapa acero inoxidable AISI 304, 24(8 x 3)</i>	I.C.T, S.L. Instrumentación Científica Técnica, S.L., San Sebastian-España
<b>Guantes de nitrilo</b>	<i>Guantes para examinación sin polvo, Ref. 4020NP calidad estándar.</i>	Deltalab, Barcelona-España
<b>Microtubos de 1,5 y 2 mL</b>	<i>Safelock-Cap microcentrifuge tube PP, 1,5/2mL, attached cap, boil-proof, transparent, graduated.</i>	Nerbe plus, Winsen (Luhe)-Alemania
<b>Papel filtro convencional</b>	<i>Papel de filtro, hojas de 50 x 50 cm, tamaño de poro ± 30-40 micras.</i>	Deltalab, Barcelona-España
<b>Parafilm M</b>	<i>Parafilm M (Laboratory Film)</i>	Bemis, Wisconsin-USA
<b>Pipeta P10/P100/ P1000</b>	<i>PIPETMAN Neo® 1-10µL / 10-100µL / 100-1000µL.</i>	GILSON®, Wisconsin-USA
<b>Pipeta serológica</b>	<i>Pipeta serológica de 5/10/25 mL, poliestireno transparente con escala impresa positiva y negativa, envasadas de forma estéril unitaria.</i>	SARSTEDT, Nümbrecht-Alemania
<b>Piseta</b>	<i>Frasco lavador de 1000 mL.</i>	ENDO Plasticware, TecnyLab, Valencia-España
<b>Probetas de vidrio de diferentes volúmenes</b>	<i>Probeta graduada base hexagonal, clase a, glassco.</i>	Labbox, Barcelona-España

<b>Probetas de plástico de diferentes volúmenes</b>	<i>Probeta graduada PP, 1000 mL ENDO.</i>	TecnyLab, Valencia-España
<b>Puntas de pipeta automática</b>	<i>Pipette Tips.</i>	Thermo Fisher Scientific, Madrid-España
<b>Puntas de pipeta P10/P100/P1000</b>	<i>Filter Tip PP natural 0,5–10µL/10–100µL/100–1000µL, short, graduated 96 tips/rack, Gilson type, premium surface, RNase/DNase/DNA/pyrogen free, sterile RCE/IVD.</i>	Nerbe plus, Winsen (Luhe)-Alemania
<b>Placa de petri</b>	<i>Petri dish 60x15mm with cams.</i>	SARSTEDT, Nümbrecht-Alemania
<b>Termometro</b>	<i>Termómetro amarillo -10/150 °C.</i>	QuercusLab, España
<b>Tubos Falcon de 15 y 50 mL</b>	<i>Centrifuge tube PP with screw cap PE, 15/50 mL, Ø17x120 mm, conical bottom, tube transparent, cap.</i>	Nerbe plus, Winsen (Luhe)-Alemania
<b>Vasos de precipitados de diferentes volúmenes</b>	<i>Duran™ Vaso de precipitados de vidrio de perfil bajo con boquilla.</i>	Fisher Scientific, Madrid-España

### 3.1.3 Equipos

Los equipos utilizados se indican en la Tabla-M.3.

**Tabla-M.3.** Equipos utilizados.

<b>Nombre</b>	<b>Especificaciones</b>	<b>Casa Comercial</b>
<b>Agitador magnetico</b>	<i>Snaker</i>	ARE Heating magnetic stirrer, Singapore
<b>Agitador orbital</b>	<i>Agitador orbital MaxQ 4000, MaxQ 5000.</i>	Barnstead

<b>Agitador vortex</b>	<i>Mezclador vórtex</i>	Fisherbrand, Madrid-España
<b>Analizador de imágenes quimioluminiscencia</b>	Equipo Imager 600 (Amersham Imager 600).	GE Healthcare, España
<b>Autoclave 75 L (Presoclave II 80)</b>	<i>Autoclave 4002518 - Autester ST DRY PV-III 150.</i>	JP Selecta, Barcelona-España
<b>Balanza de precisión</b>	<i>Balanza de precisión modelo BD BC 200.</i>	Denver Instrument, NY-USA
<b>Balanza analítica</b>	<i>Balanza Analítica modelo BC BC 100.</i>	Denver Instrument, NY-USA
<b>Baño de agua</b>	<i>Baño Termostático Analógico 5 L</i>	Nahita, La Rioja- España
<b>Barra de agitación</b>	<i>Microbarra agitadora magnética de PTFE.</i>	Fisher scientific, Madrid-España
<b>Campana de flujo laminar</b>	<i>Cabina de flujo laminar modelo mini H.</i>	Telstar, Madrid-España
<b>Campana de gases</b>	<i>Ductless Fume Hood CRUMA 870.</i>	CRUMA, Barcelona-España
<b>Centrífuga</b>	<i>Eppendorf centrifuges.</i>	Eppendorf, Madrid-España
<b>Centrífuga diferencial</b>	<i>Avanti J-26 X (JLA-10500, JLA-8100)</i>	Beckman Coulter, Nyon-Switzerland
<b>Congelador (-40 °C, -80 °C)</b>	<i>Congelador -80 °C Modelo ULT-1786-V.</i>	New Brunswick Scientific, Fisher scientific, Madrid-España
<b>Cubeta de electroforesis</b>	<i>Celda de electrophoresis Criterion.</i>	Bio-Rad, California-USA
<b>Desecador de vidrio</b>	<i>Desecador de vidrio pyrex con tapa y disco de porcelana, diámetro 100 mm y capacidad 1 L.</i>	QuercusLab, España
<b>Espectrofotómetro</b>	<i>Ultrospec 2100pro UV/Visible.</i>	GE Healthcare, España
<b>Estufa Secado estático</b>	Estufa para desecacion y esterilización modelo IDL A180.	Indelab, España
<b>Estufa de Secado con aire forzado</b>	Estufa de aire forzado modelo UF 260.	Memmert, Schwabach- Alemania

<b>Extractor de Grasa</b>	Soxhlet <i>Extractor ser 148/3.</i>	Labolan, Navarra-España
<b>Frigorífico</b>	Frigorífico <i>LKUv 1610.</i>	Liebherr, España
<b>Fuente de alimentación</b>	<i>Electrophoresis power supply EPS 500/400.</i>	Pharmacia, LabTrader Inc., California-USA
<b>HPLC</b>	<i>HPLC de columna Superdex™</i>	Jasco, Madrid- España
<b>Kjeltec™ 840</b>	<i>Kjeltec™ 840 equipado con digestor y destilador.</i>	Foss Iberica S.A., Barcelona
<b>Liofilizador</b>	<i>Liofilizador Cryodos -80 °C</i>	Telstar, Madrid-España
<b>Molino de fresado</b>	<i>Molino de fresado modelo SM 100.</i>	Retsch SM 100, Alemania
<b>Mufla de incineración</b>	Modelo Termocontroller ST.	Nannetti, Faenza-Italia
<b>pHmetro</b>	<i>pH-meter BasiC20.</i>	Crison, Barcelona-España
<b>Pipetas automáticas</b>	<i>Pipeta volumen variable labmate pro.</i>	HTL Lab Solutions, Marszawa-Polonia
<b>Reactor</b>	<i>Reactor Biostat A</i>	Sartorius Stedium, Goettingen- Alemania
<b>Savant</b>	<i>Speed Vac SVC 100</i>	Savant Instruments. Inc. Farmingdale, NY.

### 3.2. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo de Tesis han sido: *Trichoderma harzianum* CEC-T24, *Trichoderma atroviride* CEC-T23 y *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, como se muestra en la Tabla-M4.

**Tabla-M.4.** Microorganismos utilizados.

Nombre científico	Cepa	Colección
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 21415	American Type Culture Collection (Georgetown University, Washington, USA)
<i>Trichoderma atroviride</i>	CEC-T23	Spain Type Culture Collection (Burjasot, Universidad de Valencia, España).
<i>Trichoderma harzianum</i>	CEC-T24	Spain Type Culture Collection (Burjasot, Universidad de Valencia, España).

### 3.3. Subproductos

Los subproductos utilizados en este trabajo han sido subproductos procedentes de la industria del champiñón, tanto los procedentes de la producción para consumo en fresco (tallos y champiñones no comercializables) como de la industria conservera (tallos) (Figura-M.1a). También se ha utilizado un subproducto procedente de la industria del procesamiento del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*), constituido fundamentalmente por el cefalotórax (cabeza y pinzas) y el exoesqueleto de las colas (Figura-M.1b), que se ha utilizado como control de subproductos ricos en quitina de origen crustáceo. En la Tabla-M.5 se muestran los diferentes subproductos y su origen.

**Tabla-M.5.** Subproductos y sus orígenes.

Subproducto	Producto estabilizado	Origen
Tallos de champiñón y champiñones defectuosos.	Harina de tallos de champiñón (HTCH)	Industria del champiñón, fresco y conservas. Grupo Riberebro (Haro, La Rioja).
Cefalotórax y exoesqueleto de las colas.	Harina de cangrejo HC)	Industria del cangrejo de río. Alfocan S.A. (Isla Mayor, Sevilla)

a)



b)

**Figura M.1.** a) *Agaricus bisporus*, b) *Procambarus clarkii*.

### **3.4 Estabilización de los subproductos y generación de sustratos**

Una vez recibidos los subproductos, debido a su naturaleza y alto contenido en agua, éstos se han estabilizado, para evitar su deterioro y pérdida. Procesos que se han llevado a cabo mediante secado, molienda, conservación en vacío y temperatura ambiente en almacén (22-23 °C).

#### **3.4.1 Secado y molienda**

Para estabilizar los subproductos procedentes de la industria del champiñón, se ha utilizado una estufa de secado estático y otra de aire forzado a 90 °C (Figura-M.2a y 2b). Una vez secos se molieron en un molino de rotor, equipado con un tamiz de 0,5 mm (Figura-M.3a), y posteriormente fueron tamizados en un tamiz de 355 µm (Figura-M.3b), obteniéndose un producto al que se denominó harina de tallos de champiñón (HTCH) (Figura-M.4a). Los residuos de cangrejo siguieron un procedimiento análogo y al producto molido, en este caso, se le denominó harina de cangrejo (HC) (Figura-M.4b).

Los productos así obtenidos se guardaron en bolsas de plástico, a las que se hizo el vacío, y se guardaron en almacén a temperatura ambiente (22-23 °C), manteniéndose así durante el tiempo necesario para su uso. El producto es estable durante varios meses (6 a 8 meses), no observándose peroxidación lipídica ni generación de olores durante este tiempo de conservación.

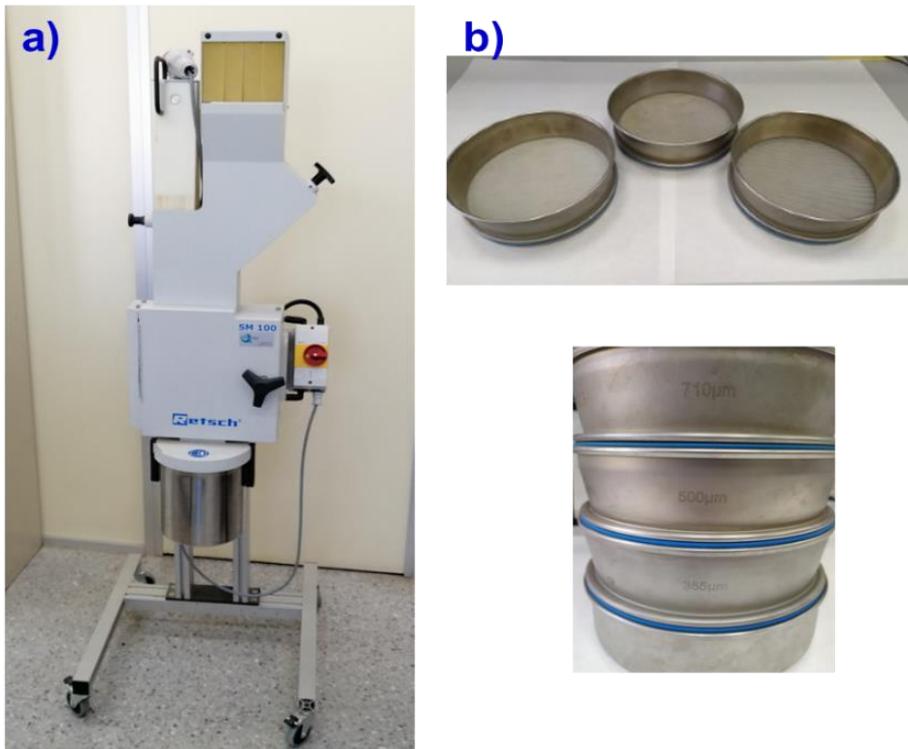
a)



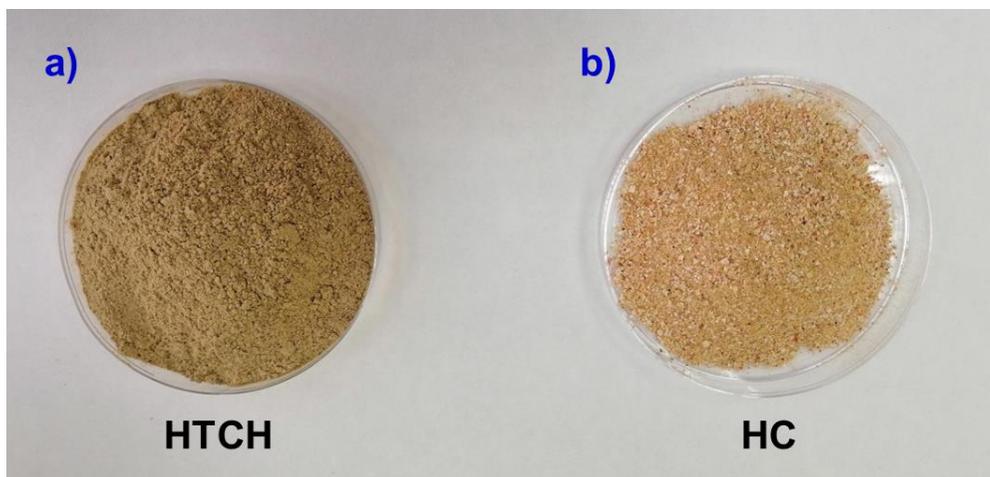
b)



**Figura M.2.** a) Estufa de secado estático, b) Estufa de secado con aire forzado.



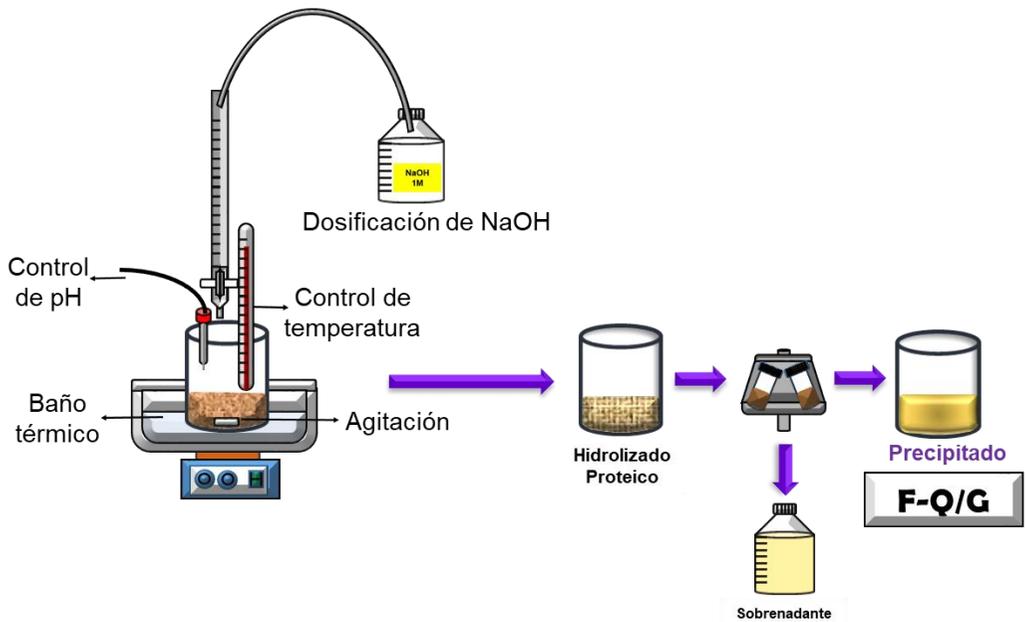
**Figura M.3.** a) Molino de rotor, b) Diferentes tamaños de tamices utilizados para la preparación de los subproductos.



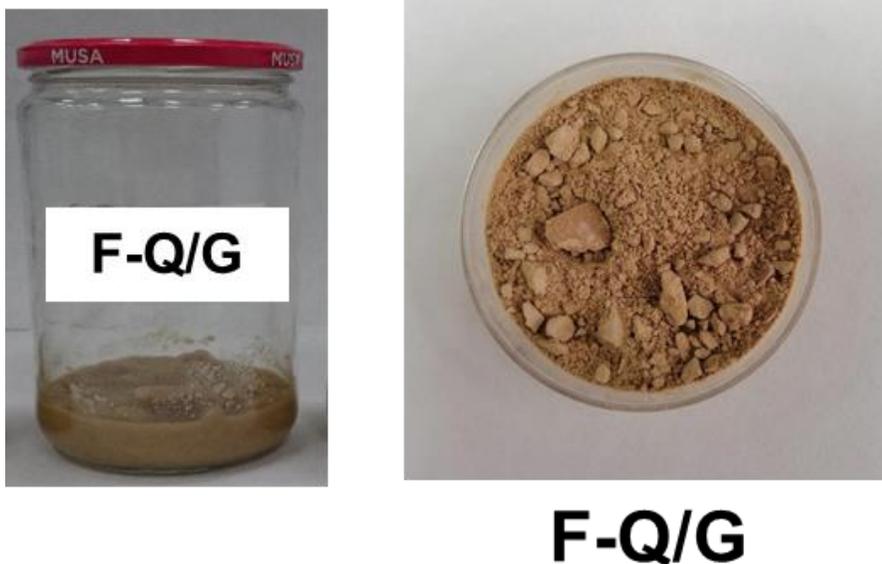
**Figura M.4.** a) Harina de Tallos de Champiñón (HTCH), b) Harina de Cangrejo (HC).

### 3.4.2 Preparación de la Fracción enriquecida de Quitina/Glucano de champiñones

Para la preparación de la fracción enriquecida en quitina y glucano (F-Q/G) se ha seguido el procedimiento descrito por Cremades y col. [Cremades y col., 2012]. El procedimiento seguido se muestra esquemáticamente en la Figura-M.5. Brevemente, una vez resuspendida la HTCH al 10% en agua (p/v), se ajusta el pH a 8,5 y se procede a su hidrólisis con la proteasa Alcalasa® utilizando una relación E/S de 0,3 (p/v), siguiendo el procedimiento del pH-stat [Adler-Nissen, 1986; Parrado et al., 1993]. El hidrolizado obtenido se centrifugó a  $10.000 \times g$ , a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min, obteniéndose por una parte un sobrenadante (material soluble o hidrolizado) y un precipitado (material insoluble, o fracción bruta enriquecida en quitina y glucanos). Seguidamente, el precipitado se ha lavado tres veces con 10 L de agua corriente, se ha resuspendido en 1 L de agua, y se esterilizó en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min, una vez enfriado a temperatura ambiente se centrifugó durante 15 min a  $10.000 \times g$ , desechándose el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado, que una vez secado en la estufa de aire y tamizado, se utilizó como F-Q/G (Figura-M.6).



**Figura M.5.** Esquema de la obtención de la fracción enriquecida de Quitina/Glucano, mediante un tratamiento enzimático con proteasas.



**Figura M.6.** Fracción enriquecida en Quitina/Glucano.

### 3.5 Caracterización de los Sustratos

Una vez obtenidos los sustratos se procedió a la caracterización de los mismos.

La caracterización se ha llevado a cabo mediante la determinación de los siguientes parámetros: humedad, materia orgánica (MO), grasa bruta, nitrógeno total ( $N_t$ ), proteínas, hidratos de carbono totales, quitina, etc., y pH.

El contenido de humedad, ceniza, grasa bruta se determinó gravimétricamente de acuerdo con los métodos estándar de AOAC. Como se detallan a continuación [A.O.A.C, 1995; A.O.A.C, 2006].

#### 3.5.1 Humedad

La Humedad se determinó gravimétricamente siguiendo el procedimiento estándar de la A.O.A.C. [A.O.A.C, 1995]. Para ello se pesó en una cápsula vacía 2 g de muestra, se secó en estufa a 100 °C durante 24 horas; una vez transcurrido este tiempo se retira y enfría en un desecador. Finalmente se pesa la muestra seca y se calcula el contenido de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100$$

Dónde:

$P_i$  = Peso inicial

$P_f$  = Peso final

### 3.5.2 Cenizas

El contenido de cenizas se determinó gravimétricamente siguiendo el procedimiento de la A.O.A.C. [A.O.A.C, 1995]. Brevemente, se taran los crisoles a peso constante en la mufla por 15-30 min a 550-600 °C. Luego se enfrían los crisoles en un desecador, pesamos nuevamente los crisoles y colocamos 2 g de muestra en cada crisol e incinerar la muestra en la mufla durante 8 horas a temperatura entre 550-600 °C, una vez transcurrido este tiempo sacamos los crisoles y dejamos enfriar y finalmente se pesa cada crisol con las cenizas.

Las cenizas se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Ceniza} = \frac{\text{Peso de Cenizas} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

### 3.5.3 Grasas

El contenido en grasa total se determinó por gravimetría tras la extracción de la muestra con hexano durante 12 horas en un extractor Soxhlet. Una vez terminada la extracción, el solvente se destila y el residuo graso se pesa [Clemente y col., 1997].

### 3.5.4 Nitrógeno Total

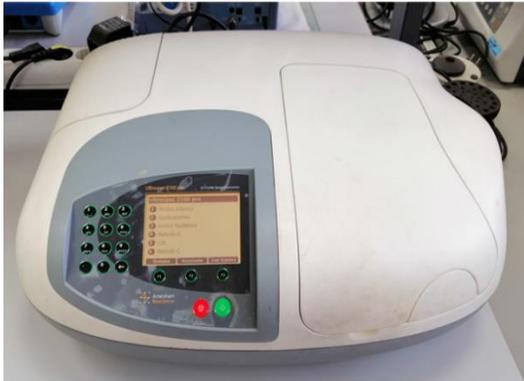
El nitrógeno total se determinó mediante el método Kjeldahl establecido por la A.O.A.C. 2006 [AOAC, 2006], en un equipo automático Kjeltac™ 840 (Foss Iberica S.A., Barcelona) equipado con digestor y destilador.

### 3.5.5 Cuantificación de Proteínas en Subproductos y Sustrato

Las proteínas totales en los subproductos y sustratos se ha determinado multiplicando el nitrógeno total por el correspondiente factor de conversión en proteína:  $N_t \times 5,45$  para la HTCH y  $N_t \times 6,24$  para la HC.

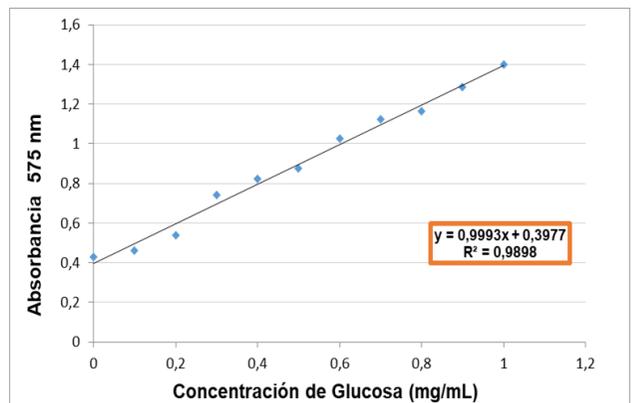
### 3.5.6 Hidratos de Carbono

Los carbohidratos totales se calcularon utilizando el método colorimétrico de Dubois, usando un reactivo de ácido fenólico sulfúrico [Dubois y col., 1956]. Los carbohidratos totales solubles fueron medidos partiendo de 0,5 g de muestra que se resuspendió en 10 mL de una mezcla H<sub>2</sub>O/fenol (80% v:v)/ácido sulfúrico concentrado (2:1:40). La muestra resuspendida se incubó durante 10 min a temperatura ambiente (22-23 °C) y se calentó lentamente hasta 95 °C, manteniendo esta temperatura durante 60 min, seguidamente se enfrió lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se tomó una muestra, se centrifugó a 6000 x g y se midió la absorbancia a 575 nm utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 2100pro UV/Visible (GE Healthcare, Barcelona, Spain) (Figura-M.7). La concentración de hidratos de carbono totales se determinó por interpolación en una curva patrón trazada con glucosa como se observa en la Figura-M.8.



**Figura M.7.** Espectrofotómetro utilizado.

TUBO	Concentración Glucosa (1mg/mL)	Absorbancia 575 nm
1	0	0,43
2	0,1	0,461
3	0,2	0,540
4	0,3	0,740
5	0,4	0,825
6	0,5	0,876
7	0,6	1,025
8	0,7	1,123
9	0,8	1,165
10	0,9	1,285
11	1	1,401



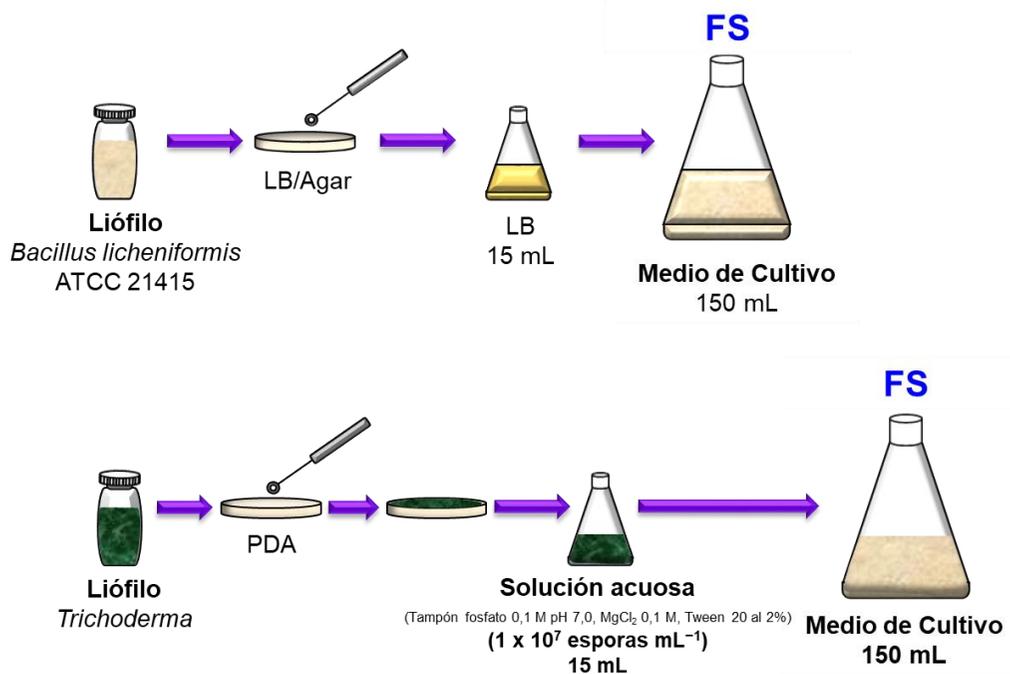
**Figura M.8.** Curva de calibración de Glucosa.

### 3.6 Fermentaciones

Se estudió la producción de quitinasas mediante dos sistemas de fermentación: Fermentación Sumergida (FS) y Fermentación en estado Sólido (FES), utilizando como sustratos la HTCH, F-Q/G y HC, este último utilizado como control de sustrato rico en quitina.

### 3.6.1 Fermentación sumergida (FS)

Las fermentaciones sumergidas se han llevado a cabo en matraces de 500 mL con 150 mL de medio de cultivo, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura-M.9.



**Figura M.9.** Esquema del proceso de Fermentación Sumergida.

#### a) Microorganismos y preparación del Inóculo

Los microorganismos utilizados han sido: *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, *T. atroviride* CEC-T23 y *T. harzianum* CEC-T24 (ver Tabla-M.4).

*Bacillus licheniformis* ATCC 21415, se obtuvo de la American Type Culture Collection (Georgetown University, Washington, USA), fue

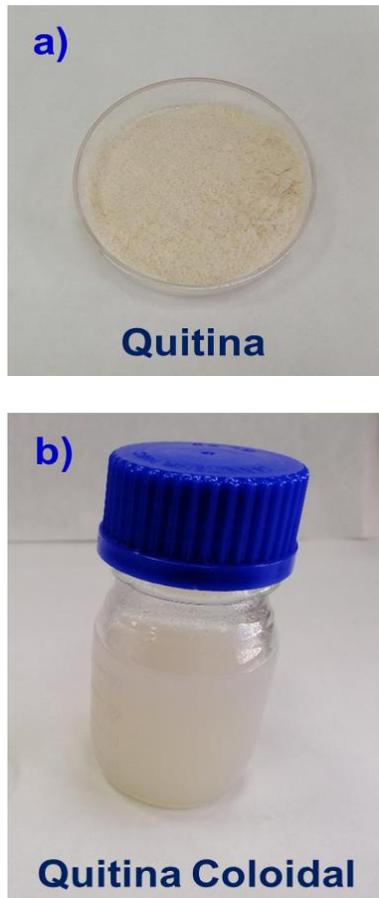
almacenado en forma liofilizada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y mantenido en LB/Agar a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , replicándose cada 2 semanas. 24 h antes de la inoculación una porción de biomasa cogida con el asa de platino se refresca en 15 mL medio LB ( $10\text{ g L}^{-1}$  peptona,  $5\text{ g L}^{-1}$  extracto de levadura y  $10\text{ g L}^{-1}$  NaCl, ajustado a pH 7), y se crece a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizándose como inóculo en matraces de 500 mL con 150 mL de medio de cultivo.

*T. atroviride* CEC-T23 y *T. harzianum* CEC-T24 se obtuvieron de la Colección de cultivo tipo España (Spain Type Culture Collection) (Burjasot, Universidad de Valencia, España). El microorganismo fue almacenado en forma liofilizada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo en PDA (patata-dextrosa-agar) replicándose cada 4 semanas. Las esporas procedentes de una placa, resuspendidas en una solución acuosa (tampón fosfato  $0,1\text{ M}$  pH 7,0,  $\text{MgCl}_2$   $0,1\text{ M}$ , Tween 20 al 2%) con una concentración de esporas de aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ , se ha utilizado como inóculo de los respectivos cultivos.

### **b) Preparación de la fuente de carbono (Quitina coloidal)**

La Quitina coloidal ( $Q_c$ ) se preparó según el método descrito por Ramírez y col. [Ramírez y col., 2004] con ligeras modificaciones. Brevemente, se mezcla 10 g de quitina en polvo (Figura-M.10a) con 200 mL de HCl (37%) previamente enfriado, manteniendo agitación constante y vigorosa durante 24 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se agrega etanol al 96% hasta un volumen final de 2 L y se agita vigorosamente. Después de 24 h de incubación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la suspensión se centrifugó a

5000 × *g* durante 20 min. Finalmente se lavó el precipitado con agua destilada hasta que el pH del sobrenadante alcance un valor de  $7 \pm 0,1$ , y éste se resuspende en tampón fosfato 0,1 M (Figura-M.10b).



**Figura M.10.** a) Quitina pura en polvo, b) Quitina coloidal.

### **c) Medios de cultivo y condiciones de crecimiento**

Se han preparado diferentes medios de cultivo para las FS, cuya composición se muestra en la Tabla-M.6.

**Tabla-M.6.** Composición de los medios de cultivo utilizados para la FS.

Medios de Cultivo	H <sub>2</sub> O (mL)	Mm (mL)	Q <sub>p</sub>	Q <sub>c</sub>	Czapeck	PB	F-Q/G	HTCH
H <sub>2</sub> O/Q <sub>p</sub>	150	-	1%	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O/Q <sub>c</sub>	150	-	-	1%	-	-	-	-
Mm/Q <sub>p</sub>	-	150	1%	-	-	-	-	-
Mm/Q <sub>c</sub>	-	150	-	1%	-	-	-	-
Czapeck/Q <sub>c</sub>	-	-	-	1%	150	-	-	-
PB/Q <sub>c</sub>	-	-	-	1%	-	150	-	-
F-Q/G	150	-	-	-	-	-	2%	-
HTCH	150	-	-	-	-	-	-	2%

(Q<sub>p</sub>: Quitina en polvo, Q<sub>c</sub>: Quitina coloidal, Mm: Medio mínimo, PB: (Potato Broth = Extracto de Patata, F-Q/G: Fracción enriquecida de Quitina/Glucano de champiñón, HTCH: Harina de Tallos de Champiñón).

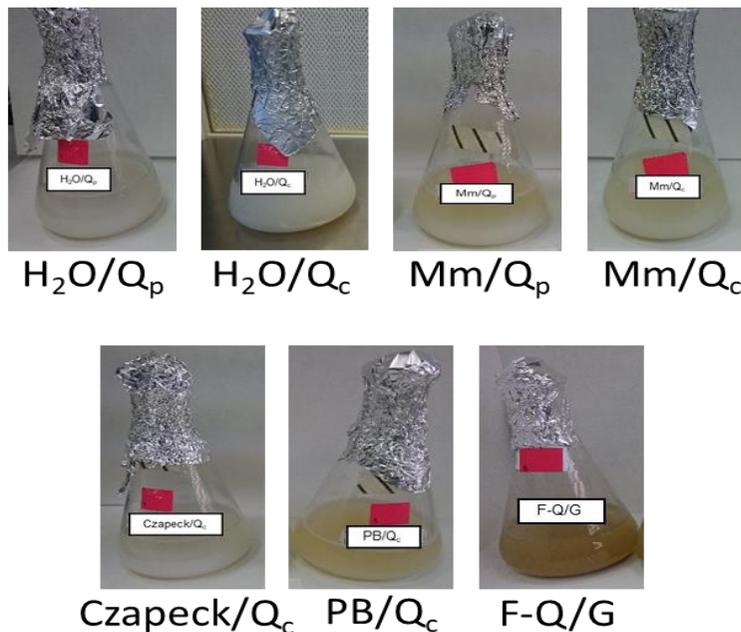
El medio (H<sub>2</sub>O/Q<sub>p</sub>, H<sub>2</sub>O/Q<sub>c</sub>), contiene únicamente quitina ya sea en forma de polvo o coloidal, y agua.

El medio mínimo (Mm) tiene los siguientes componentes: 8,2 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, peptona de champiñones 10 g L<sup>-1</sup> y 10 ml L<sup>-1</sup> de la solución de elementos traza; la composición de la solución de elementos traza es (g L<sup>-1</sup>): 0,55 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,67 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,10 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,17 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,043 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,06 g CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, y se ha suplementado con Q<sub>p</sub> o Q<sub>c</sub>.

El medio Czapeck esta constituido por los siguientes componentes: 0,3%  $\text{NaNO}_3$ , 0,1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,005%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005%  $\text{KCl}$ , 0,001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4% de glucosa y 1% de Quitina coloidal.

Además se estudió la producción de quitinasas en medios ricos en quitina, como es el medio PB/ $Q_c$ , que contiene extracto de patata y  $Q_c$ , y los medios F-Q/G y HTCH que debido a su contenido en quitina se utilizaron directamente sin adición alguna de otras formas de quitina.

Una vez preparado los medios de cultivo se dispensaron en matraces de 500 mL y se esterilizaron en autoclave durante 30 min a 121 °C (Figura-M.11), posteriormente se inocularon los microorganismos y se cultivaron como se describen mas adelante. Cada medio de cultivo se realizó por triplicado.



**Figura M.11.** Medios de cultivo utilizados para FS.

### ▪ **Condiciones de crecimiento de *Bacillus licheniformis* ATCC 21415**

Una vez esterilizados los medios de cultivos, éstos se inocularon con 15 mL de inóculo de *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 previamente crecido en LB, a 37 °C y pH 7 hasta que el caldo de fermentación alcance un 30% de transmitancia (aproximadamente por 18 h); y se dejaron crecer durante 14 días a 37±1 °C con agitación mecánica (150 rpm), tomándose muestras (aproximadamente 2,5 mL) periódicamente y se almacenaron a -20 °C hasta ser usada para los diferentes análisis.

### ▪ **Condiciones de crecimiento de *Trichoderma***

Una vez esterilizados los medios de cultivos, éstos se inocularon con 2 mL de una suspensión acuosa (0,1 M MgCl<sub>2</sub> / Tween 20 al 2%) de esporas 1 x 10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup> de *T. atroviride* CEC-T23 o *T. harzianum* CEC-T24 y se crecieron durante 14 días a 28 ±1 °C con aireación (30 L/min), y sin aireación (cultivo estático); tomándose muestras (aproximadamente 2,5 mL) periódicamente y se almacenaron a -20 °C hasta ser usada para los diferentes análisis.

### **3.6.2 Fermentación en estado sólido (FES)**

En la siguiente Tabla-M.7 se describen los medios de cultivo utilizados para la FES. En este caso se han utilizado como medios de cultivo: la F-Q/G, la HTCH y la HC, y se han preparado de modo que el

sustrato tenga la humedad suficiente para promover el crecimiento y desarrollo del microorganismo.

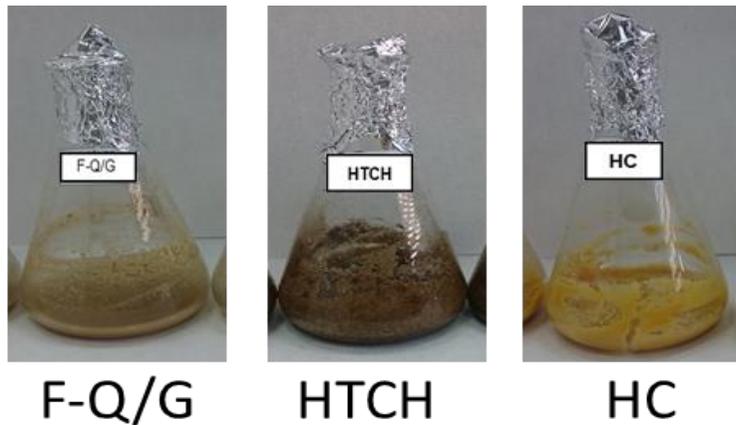
**Tabla-M.7.** Composición de los medios de cultivo utilizados para la FES.

Medios de cultivo	Sustrato	Inóculo
<b>F-Q/G<sub>-A</sub></b>	2%	5 10 <sup>7</sup> esporas*
<b>F-Q/G<sub>+A</sub></b>	2%	5 10 <sup>7</sup> esporas
<b>HTCH<sub>-A</sub></b>	2%	5 10 <sup>7</sup> esporas
<b>HTCH<sub>+A</sub></b>	2%	5 10 <sup>7</sup> esporas
<b>HC<sub>-A</sub></b>	2%	5 10 <sup>7</sup> esporas
<b>HC<sub>+A</sub></b>	2%	5 10 <sup>7</sup> esporas

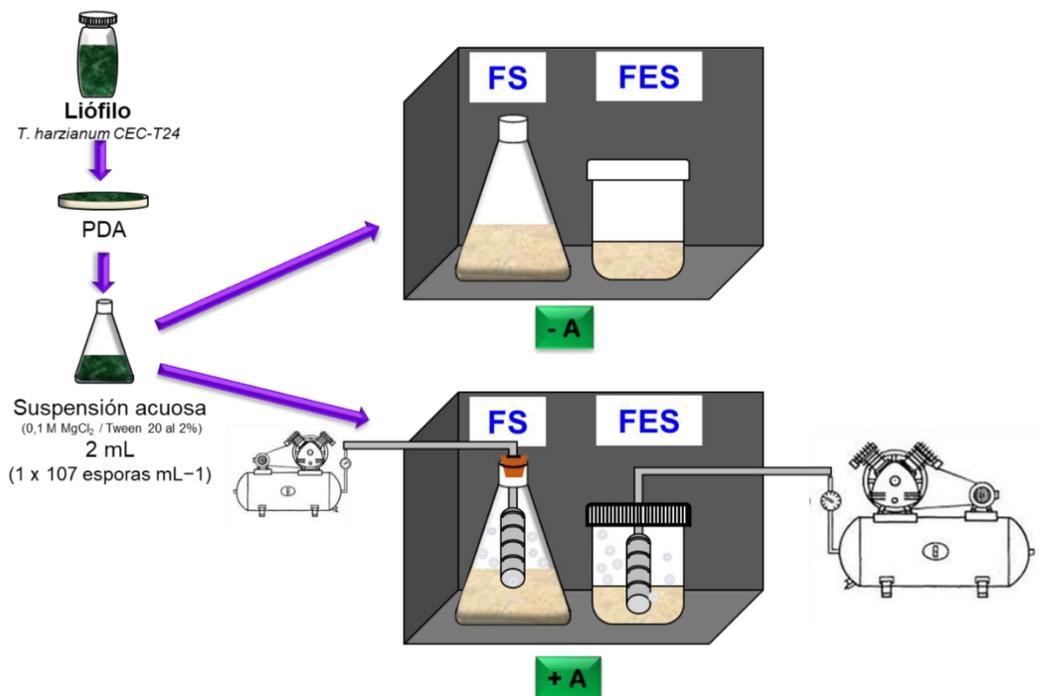
**HTCH:** Harina de tallos de champiñón, **HC:** Harina de Cangrejo, **A:** Aireación  
 (\*15 mL x 3.3 10<sup>6</sup> esporas/mL = 5 10<sup>7</sup> esporas)

Una vez colocado el sustrato (F-Q/G, HTCH o HC) en el correspondiente matraz de 250 mL, éste se ha humedecido de manera tal que el medio de cultivo sólido esté bien y uniformemente húmedo pero no haya fase acuosa visible. Los medios de cultivo una vez preparados se esterilizaron a 121 °C durante 30 min (Figura-M.12), y posteriormente se inoculó el microorganismo (2 mL de una suspensión acuosa (0,1 M MgCl<sub>2</sub> / Tween 20 al 2%) de esporas (1 x 10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup>), y se cultivó durante 14 días a 28±1 °C con aireación (30 L/min), y sin aireación (cultivo estático). Cada ensayo se realizó por triplicado.

En la Figura-M.13 se muestra como se realizó el proceso de fermentación para la producción de enzimas específicamente quitinasas.



**Figura M.12.** Medios de cultivo utilizados en FES para la producción de Quitinasas.



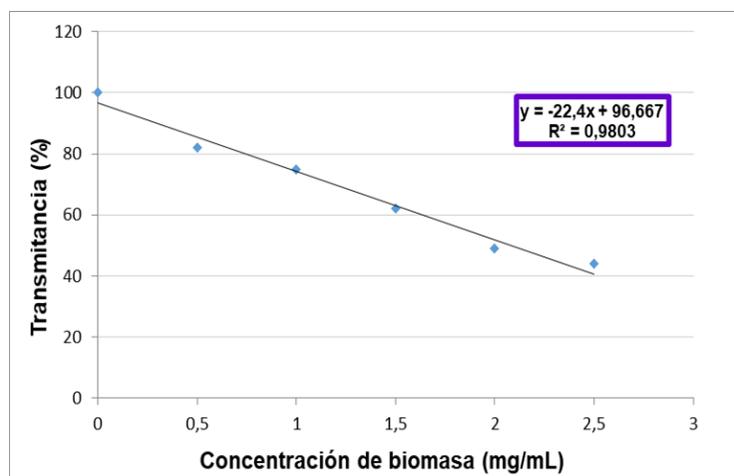
**Figura M.13.** Proceso de fermentación para la obtención de quitinasas.

### 3.7 Caracterización de las fermentaciones

#### 3.7.1 Determinación de la Biomasa

La biomasa se determinó directamente en las muestras descongeladas.

En el caso de *B. licheniformis* ATCC 21415, crecido en fermentación sumergida el crecimiento o biomasa producida se determinó mediante la medición directa de la transmitancia (%T) de las muestras diluidas con agua (1:20, v/v). La concentración de biomasa, en mg/mL, se determinó por interpolación a partir de una curva estándar de biomasa vs %T (Figura-M.14).

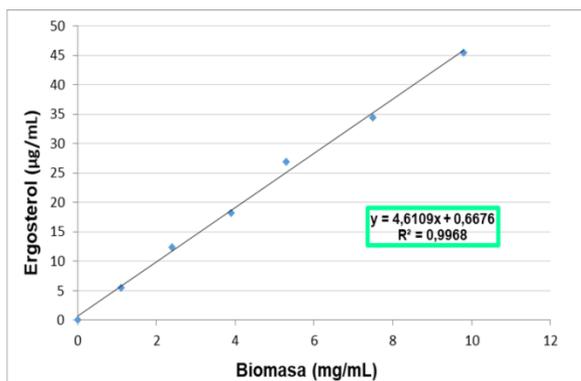


**Figura M.14.** Recta %T vs mg biomasa/mL para *B. licheniformis* ATCC 21415. (Muestras diluidas 1:5, v/v)

Para *T. harzianum* CEC-T24 y *T. atroviride* CEC-T23, la biomasa se estimó indirectamente mediante la cuantificación del ergosterol. La

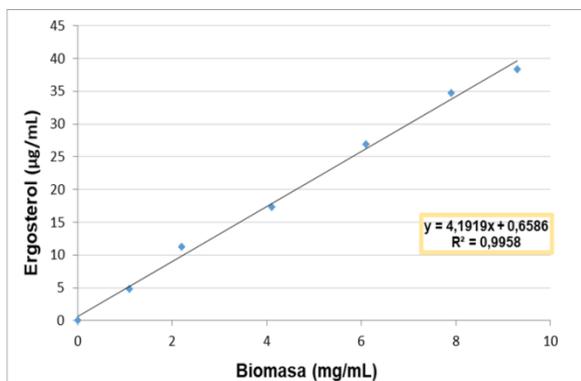
concentración de biomasa se calculó por interpolación en una curva estándar de ergosterol vs biomasa [Görs y col., 2007] (Figura-M.15 y M.16).

TUBO	Biomasa (mg/mL)	Ergosterol (µg/mL)
1	0	0
2	1,1	5,5
3	2,4	12,4
4	3,9	18,2
5	5,3	26,9
6	7,5	34,5
7	9,8	45,5



**Figura M.15.** Recta conversión ergosterol vs biomasa (*T. harzianum* CEC-T24).

TUBO	Biomasa (mg/mL)	Ergosterol (µg/mL)
1	0	0
2	1,1	4,8
3	2,2	11,2
4	4,1	17,3
5	6,1	26,9
6	7,9	34,7
7	9,3	38,4



**Figura M.16.** Recta conversión ergosterol vs biomasa (*T. atroviride* CEC-T23).

### 3.7.2 Ensayos Enzimáticos

Para la determinación de las actividades enzimáticas excretadas al medio por cada microorganismo, las muestras se centrifugaron a 12.000

x g durante 20 min, y los sobrenadantes obtenidos se usaron para los ensayos enzimáticos y análisis electroforéticos.

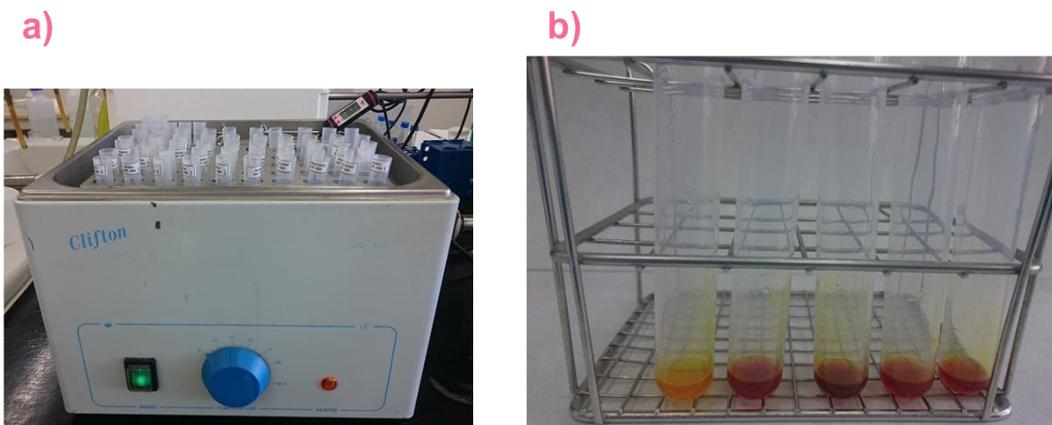
### **a) Ensayo de Actividad Quitinasa**

La actividad quitinasa se determinó midiendo la cantidad de azúcares reductores producidos utilizando quitina coloidal como sustrato, mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [Miller, 1959]. Brevemente, la mezcla de reacción, que consta de 0,25 mL de quitina coloidal al 1% (p/v) y 0,25 mL de muestra (enzima), se incubó a 37 °C durante 30 min (Figura-M.17a). La reacción se detuvo mediante la adición de 1 mL de solución acuosa de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) y la mezcla se calentó durante 10 min en un baño de agua hirviendo. Después de enfriar (Figura-M.17b), se determinó la absorbancia de la solución a 575 nm utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 2100pro UV / Visible (GE Healthcare, Suecia). En paralelo, el mismo volumen de agua desionizada se utilizó, en lugar de la muestra, como control negativo. Una unidad de actividad quitinasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1 mg mL<sup>-1</sup> de azúcar reductor, en las condiciones de ensayo, a 37 °C.

#### **o Preparación de la solución acuosa de ácido dinitrosalicílico (DNS)**

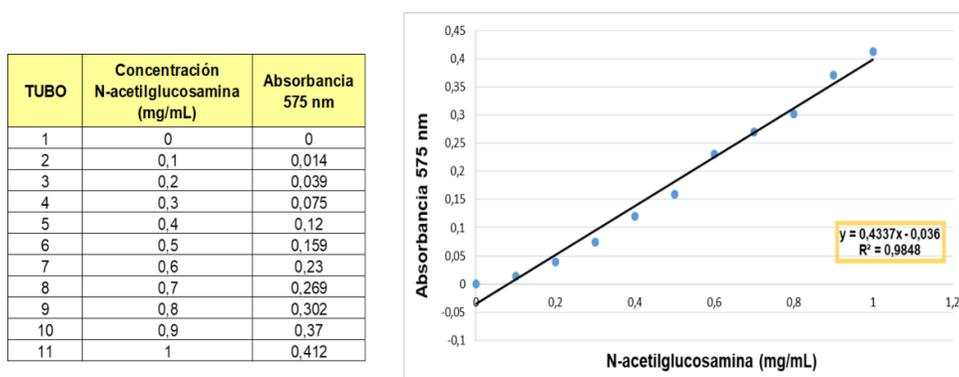
La solución de DNS se preparó disolviendo 10 g de DNS en 200 mL en una solución 2 M de NaOH. Posteriormente, se agregaron 300 g de

tartrato de sodio y potasio, 2 g de fenol y 0,5 g de sulfito Sódico previamente disueltos en unos 700 mL de agua desionizada caliente. Se mezclan cuidadosamente las dos soluciones y se enrrasa con agua destilada hasta 1000 mL.



**Figura M.17.** a) Baño con control de temperatura, b) Muestras para determinación de actividad quitinasa.

La concentración del azúcar reductor liberado se determinó por interpolación en una recta estándar preparada con GlcNAc (Figura-M.18).



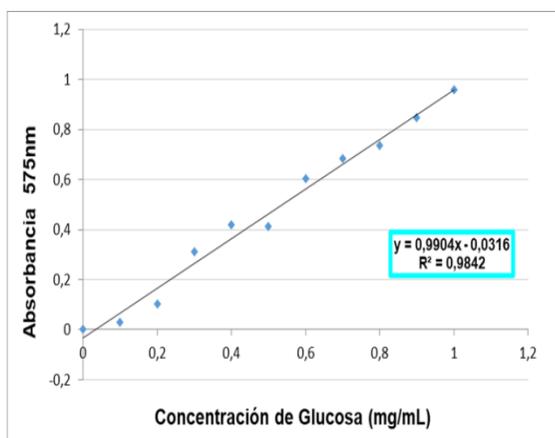
**Figura M.18.** Curva de calibración de N-acetilglucosamina.

## b) Ensayo de Actividad Celulasa

La actividad celulasa extracelular se determinó incubando 0.25 mL de celulosa microcristalina soluble (Avicel PH-101, Sigma-Aldrich) al 2% en tampón acetato 0.1 M (pH 5) junto con 0.25 mL de muestra, durante 2 horas a 37 °C. Para detener la reacción se añadió 1 mL de solución DNS [Bernfeld, 1955]. A continuación se calentó la mezcla a 95 °C durante 15 min, se enfriaron las muestras a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 575 nm.

La concentración del azúcar reductor liberado se determinó por interpolación en una recta estándar preparada con glucosa (Figura-M.19). Una unidad de actividad celulasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 mg/mL de azúcares reductores en las condiciones de ensayo.

TUBO	Concentración Glucosa (1mg/mL)	Absorbancia 575 nm
1	0	0
2	0,1	0,029
3	0,2	0,1015
4	0,3	0,312
5	0,4	0,419
6	0,5	0,4115
7	0,6	0,6025
8	0,7	0,6825
9	0,8	0,736
10	0,9	0,8475
11	1	0,9585



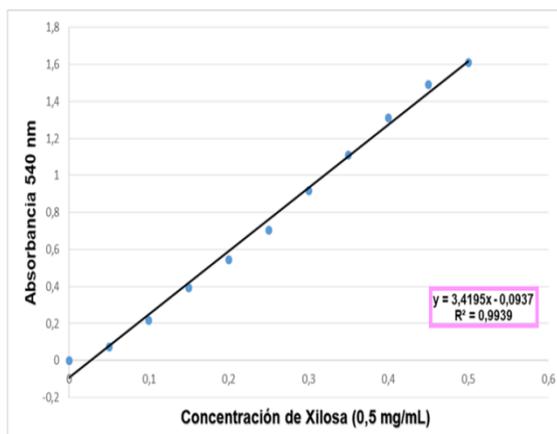
**Figura M.19.** Curva de calibración de Glucosa.

### c) Ensayo de Actividad Xilanasa

La actividad xilanasa se determinó incubando 0.20 mL de muestra con 1,8 mL de sustrato (Solución de Xilano de beechwood, Sigma Aldrich ref. X4252) al 0,2 % en tampón Citrato de Sodio 50 mM (pH 5,3), incubar a 50 °C durante 5 min. Para detener la reacción se añadió 1,5 mL de solución DNS. Se calentó la mezcla a 95 °C durante 15 min. A continuación se enfriaron las muestras a temperatura ambiente y se midió las absorbancias a 540 nm. A su vez, se realizó una curva patrón empleando Xilosa 0,01 M (Figura-M.20).

Una unidad de actividad xilanasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 mg/mL de azúcares reductores en las condiciones de ensayo.

TUBO	Concentración Xilosa (0,5mg/mL)	Absorbancia 540 nm
1	0	0
2	0,05	0,074
3	0,1	0,217
4	0,15	0,394
5	0,2	0,545
6	0,25	0,703
7	0,3	0,916
8	0,35	1,111
9	0,4	1,313
10	0,45	1,49
11	0,5	1,61



**Figura M.20.** Curva de calibración de Xilosa.

## d) Ensayo de Actividad Proteasa

La actividad proteásica se ha determinado mediante el método de la Azocaseína [Jones y col., 1998].

### Mezcla de reacción:

- 0,1 g. azocaseína (Sigma Aldrich 11610)
- 0,2 mL etanol
- 4,8 mL tampón fosfato 0,1 M pH 7

Mezclar completamente la disolución hasta que sea homogéneo, se puede calentar para favorecer la mezcla. Si se forma espuma, centrifugar brevemente.

### Método:

Mezclar 250  $\mu$ L de muestra con 250  $\mu$ L de mezcla de reacción. Incubar durante 10 min a 40 °C, una vez alcanzado este tiempo parar la reacción con 2,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 5% (p/v). Centrifugar durante 1 min a 10 000 x g, y medir la absorbancia a 440 nm.

Una unidad de actividad proteasa se define como la variación de 0,001 unidades de absorbancia por cada mL de muestra y min. También es posible realizar una recta de calibrado y extrapolar los datos obtenidos usando una proteasa de actividad conocida.

Los valores de absorbancia se transformaron en actividad proteasa,

( $\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min} = \text{UI}/\text{mL} = \text{UI}/\text{L}$ ), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}) = \text{Absorbancia} * 1000 * 10 / 10$$

### e) Cálculo de actividades enzimáticas en UI/mL

Según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1981), define a: “Una unidad internacional (1 UI) de actividad enzimática a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto por minuto bajo unas condiciones definidas (1 UI =  $\mu\text{mol}/\text{min}$ )”.

#### ***Actividad Quitinasa***

Cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina/min, bajo las condiciones de cada ensayo.

#### ***Actividad Celulasa***

Cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa/min, bajo las condiciones de cada ensayo.

#### ***Actividad Xilanasa***

Cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de xilosa/min, bajo las condiciones de cada ensayo.

Así por ejemplo, para la actividad quitinasa que produce 1,6 mg/mL de GlcNAc en un volumen total de reacción de 1,5 mL (0,25 mL de

muestra + 0,25 mL de Qc + 1 mL de solución DNS), esto implica que la cantidad de GlcNAc contenida en 0,25 mL de muestra es de 2,4 mg, tras 30 minutos de reacción:

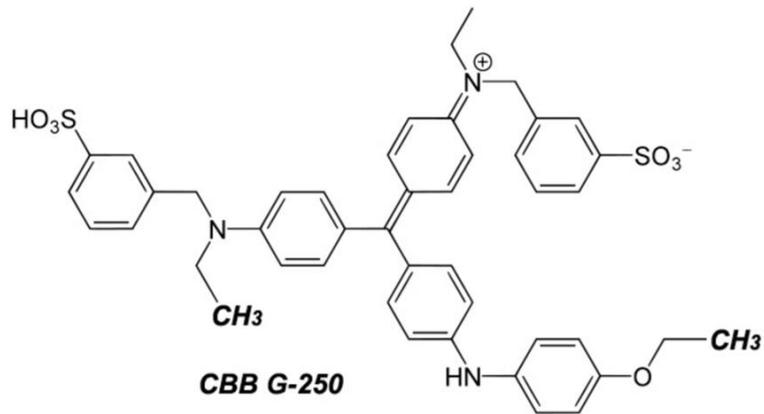
$$UI = \frac{2,4 \text{ mg} * 1000 \text{ } \mu\text{mol GlcNAc}}{0,25 \text{ mL} \quad 221,21 \text{ mg}} = 43,39 \text{ } \mu\text{mol/mL}$$

$$UI = \frac{43,39 \text{ } \mu\text{mol/mL}}{30 \text{ min}} = 1,45 \text{ } \mu\text{mol/mL/min}$$

$$UI = 1,45 \text{ UI/mL } \text{ ó } 1450 \text{ UI/L}$$

### 3.7.3 Cuantificación de Proteínas solubles

Las proteínas solubles se han cuantificado mediante el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar [Bradford, 1976]. Este método permite cuantificar proteínas, en un rango comprendido entre 0,1 y 0,001 mg/mL, o entre 100 y 1  $\mu\text{g/mL}$ . El método se fundamenta en la interacción de las proteínas con el colorante Coomasie Brilliant Blue G250 (Figura-M.21), dando lugar a la formación de un complejo de color azulado que presenta un máximo de absorbancia a 595 nm.



**Figura M.21.** Estructura del colorante Coomassie Brilliant Blue G250.

#### Reactivos:

- Serva Blue G Dye (Coomassie Brilliant Blue G250)
- BSA (*Bovine Serum Albumin*, Albúmina sérica bovina) 100 µg/mL
- Etanol 96%
- Ácido fosfórico 88%

#### Solución Stock de Bradford:

- 100 mL Etanol 96%
- 200 mL ácido fosfórico 88%
- 350 mg Serva blue G

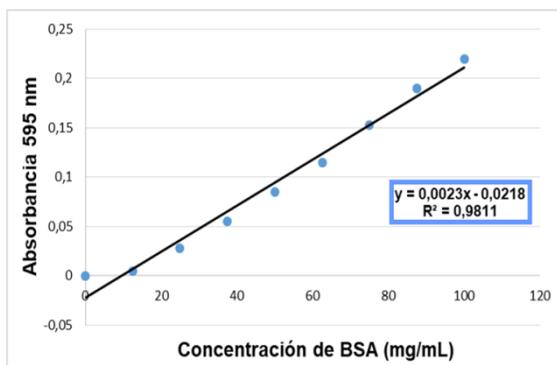
#### Reactivo de Bradford:

- 425 mL H<sub>2</sub>O Destilada
- 15 mL Etanol 96%
- 30 mL ácido fosfórico 88%
- 30 mL Solución Stock de Bradford

**Protocolo:**

A 100  $\mu\text{L}$  de muestra se añade 1 mL del Reactivo de Bradford, se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 10-20 min. Se mide la absorbancia a 595 nm inmediatamente y se lee las muestras de menor a mayor concentración. A su vez se realiza una curva patrón con BSA de una concentración conocida de proteínas (de 1  $\mu\text{g/mL}$  a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura-M.22), y se interpolan las absorbancias de las muestras para obtener la concentración en  $\mu\text{g/mL}$ .

TUBO	Concentración BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia 595 nm
1	0	0
2	12,5	0,005
3	25	0,028
4	37,5	0,055
5	50	0,085
6	62,5	0,115
7	75	0,153
8	87,5	0,190
9	100	0,220



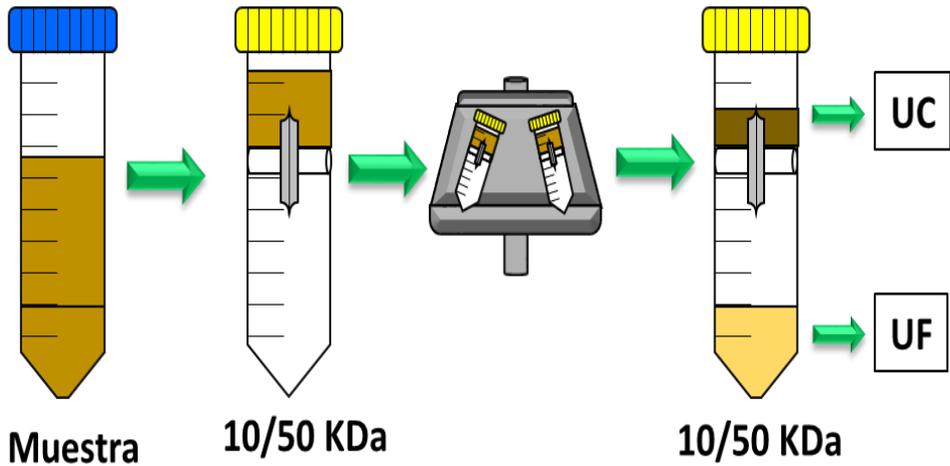
**Figura M.22.** Curva de calibración de BSA.

### 3.8 Concentración por Ultrafiltración

Las muestras de caldo de fermentación, cuando ha sido necesario, se han concentrado por ultrafiltración, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura-M.23a, utilizando para ello tubos Vivaspin (Sartorius, Göttingen, Alemania) Figura-M.23b de 20 mL, equipados con una membrana de ultrafiltración de 10 o 50 kDa, y

operados en una centrifuga a 6 000 x g durante 20 min.

a)



b)



**Figura M.23.** a) Concentración por ultrafiltración, b) Tubos Vivaspin de ultrafiltración.

### 3.9 Estudio del secretoma

El estudio de las proteínas secretadas al medio de cultivo por *Tichoderma harzianum* CEC-T24 se ha llevado a cabo mediante técnicas proteómicas basadas en la separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio-dodecil-sulfato sódico, PAGE-SDS.

#### 3.9.1 Análisis electroforético (PAGE-SDS)

El perfil de proteína extracelular se ha estudiado mediante PAGE-SDS, utilizando el método de Laemmli [Laemmli, 1970], adaptado por Blackshear [Blackshear, 1984]. Los geles de poliacrilamida se realizaron en condiciones desnaturalizantes para analizar las proteínas secretadas en los distintos medios de cultivo, formulados con sustratos ricos en quitina.

La preparación de los geles (gel de concentración o empaquetamiento y gel de separación o corrido) se muestra en la siguiente Tabla-M.8. Una vez cargado el gel de separación, se añade una capa fina de agua:isobutanol (1:2, v/v) para evitar el intercambio de oxígeno con el medio, facilitando la polimerización y haciendo que se forme una superficie completamente lisa. Una vez que se ha polimerizado se retira la capa de agua: isobutanol y seguidamente se carga el gel de empaque y se coloca el peine, para formar los pocillos. Se espera a que polimerice por completo, se retira el peine, y se lavan los pocillos con el tampón de electroforesis 1X. De esta manera el gel

queda preparado para cargar las muestras.

**Tabla-M.8.** Composición de los geles discontinuos de poliacrilamida.

▪ **Gel de concentración o empaque 5%**

Solución A (Acrilamida 30%- Bisacrilamida 1%)	1,67 mL
Solución C (Tampón de empaque 4x pH 6,8 )	1 mL
H <sub>2</sub> O	7,33 mL
TEMED	25 µL
APS (Persulfato amónico 50% p/v)	40 µL
Volumen final	10 mL

▪ **Gel de Separación o corrido 12%**

Acrilamida 30%	6 mL
Bis-acrilamida 1%	2,37 mL
Tampón de Separación 4X (pH 8,8)	3,81 mL
H <sub>2</sub> O	2,82 mL
TEMED	30 µL
APS (Persulfato amónico 50% p/v)	30 µL
Volumen final	15 mL

**NOTA:** El protocolo de la preparación de los diferentes tampones se encuentra en el apartado de ANEXOS.

Las muestras previamente centrifugadas, se resuspenden en tampón de muestra 4X y se hirvieron durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y facilitar la acción reductora del  $\beta$ -mercaptoetanol sobre los puentes di-sulfuro. Se enfrían y se centrifugan a 12.000 x g durante 5 minutos. Seguidamente se cargan las muestras (20-30  $\mu$ L/pocillo, aproximadamente 40-50  $\mu$ g de proteína). La electroforesis se corrió a intensidad constante (25 mA) utilizando un sistema de tampón Tris-glicina que contenía SDS al 0.1% hasta que el bromofenol sale por el frente del gel. Terminada la electroforesis se desmontan los geles, se lavan, y se tiñen con azul de Coomassie o por plata, según proceda.

- **Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS)**

- ❖ ***Tinción con Azul de Coomassie*** (Coomassie Brilliant Blue G-250)

Brevemente, se añaden unos 100 mL de solución Coomassie/gel de manera que cubra totalmente el gel, y se mantiene en agitación "overnight". Una vez transcurrido este tiempo se retira la solución de tinción y se procede a desteñir en una solución de ácido acético/metanol, 10:35, v/v, hasta que se observan claramente las bandas de color azul.

- ❖ ***Tinción con Plata*** (Plus One™ Silver Staining Kit, GE Healthcare)

Este tipo de tinción es unas 10 veces más sensible que la tinción con

Azul de Coomasie, el rango de detección de proteínas es de 10-100 ng/banda. Debido a la elevada capacidad reductora del ion plata ( $\text{Ag}^+$ ), es capaz de formar complejos con las proteínas con mayor afinidad que con la poliacrilamida, siendo estos complejos reducidos mucho más rápido que cuando el ión  $\text{Ag}^+$  esta libre. El método utilizado en el presente trabajo ha sido el método descrito por Heukeshoven y Dernick [Heukeshoven y Dernick, 1985]. Brevemente, terminada la electroforesis, si la muestra contiene baja concentración de proteínas se tiñe el gel directamente por plata, o bien primero se tiñe con Azul de Coomasie, se destiñe y tras desteñirlo se procede a la tinción por plata.

La tinción por plata consta de las siguientes etapas: Fijación, Sensibilización, Lavado, Reacción de  $\text{Ag}^+$ , Lavado, Revelado, Parada, Lavado, tal y como se muestra en la Tabla-M9.

Tanto los geles teñidos con Azul de Coomasie como los teñidos por plata se han escaneado en un escáner (FUJIFILM FLA5100), equipado con el sistema de imágenes Gel Doc <sup>TM</sup> XR + (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

**Tabla-M.9.** Protocolo de tinción de proteínas con Plata.

Paso	Soluciones	Tiempo
<b>Fijación de proteínas</b>	Etanol 100 mL Acido acético glacial 25 mL Volumen final 250 mL	30 min
<b>Sensibilización</b>	Etanol 75 mL *Glutaraldehido 25% (p/v) † 1,25 mL *Tiosulfato de sodio 5% (p/v) 10 mL Acetato de sodio 17 g Volumen final 250 mL	30 min
<b>Lavado</b>	Agua destilada	3 x 5 min
<b>Reacción de Ag<sup>+</sup></b>	Solución de nitrato de plata 2,5% (p/v) 25 mL ‡Formaldehido 37% (p/v) † 0,1 mL Volumen final 250 mL	20 min
<b>Lavado</b>	Agua destilada	2 x 1 min
<b>Revelado</b>	Carbonato de sodio 6,25 g Formaldehido 37% (p/v) † 0,05 mL Volumen final 250 mL	~2-5 min
<b>Parada</b>	Solución EDTA-Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 3,65 g Volumen final 250 mL	
<b>Lavado</b>	Agua destilada	

\*El glutaraldehido y el tiosulfato de sodio actúan como agentes complejantes uniéndose a las proteínas. ‡Formaldehido se usa como agente reductor. ~Hasta que se observen la presencia de bandas.

### 3.9.2 Tinción por afinidad (Zimografía)

Para la realización del zimograma de la actividad quitinasa, se utilizó un gel de separación al 10% que contenía un 0,1% de quitina coloidal como sustrato de quitinasa para detectar la actividad de quitinasa. Las muestras se mezclaron con tampón de carga sin agente reductor y se calentaron antes de cargarlas en el gel de electroforesis. Después de la electroforesis, el gel se incubó en tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) a 4 °C durante 18 h. La actividad quitinasa se visualizó en el gel mediante la tinción con rojo Congo al 0,1%, y se destiño con NaCl 1M. La zona lítica en el gel observada a la luz del día sobre un fondo rojo oscuro indicó la presencia de una enzima activa [Yamabhai y col., 2008].

### 3.9.3 Análisis proteómico

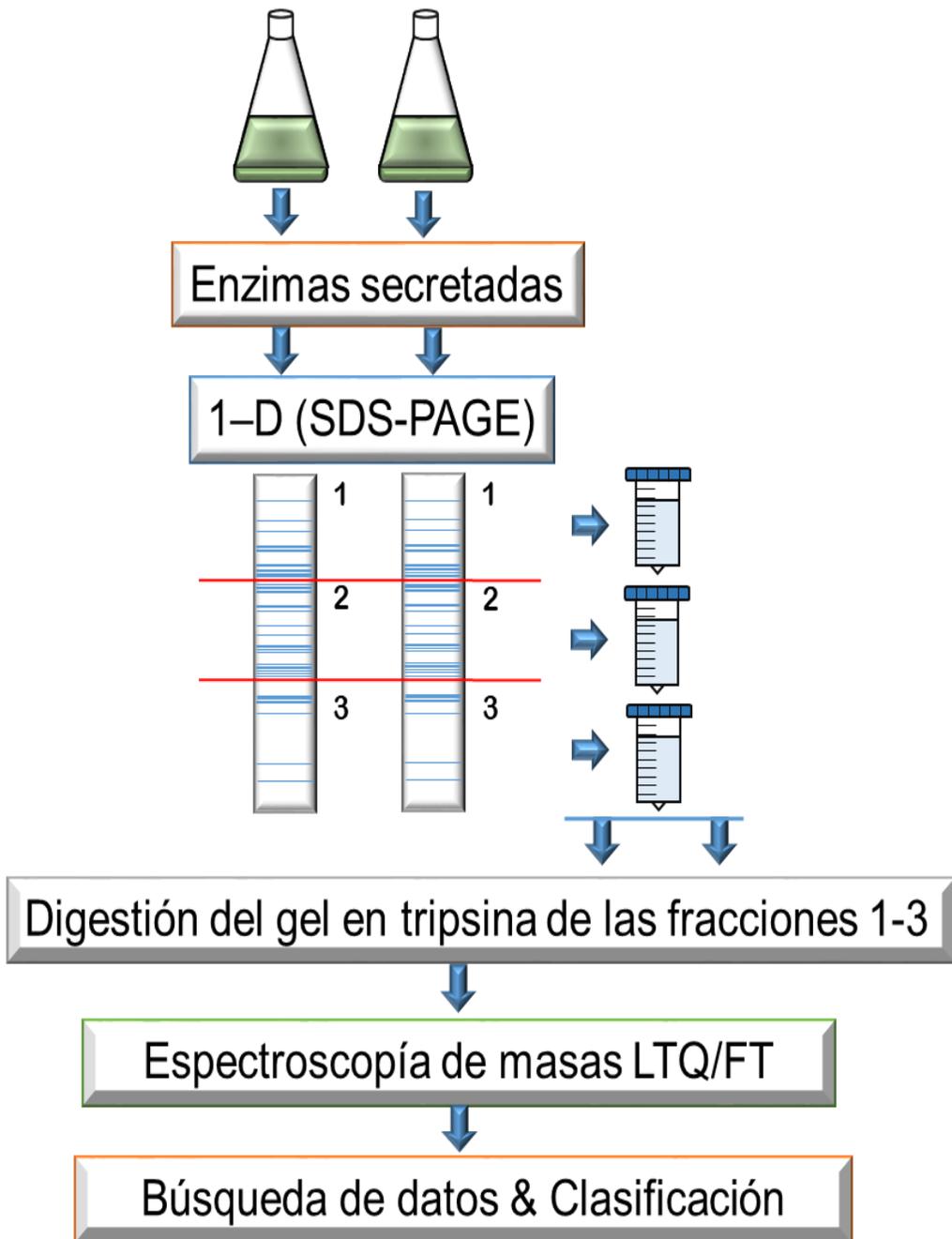
Los análisis proteómicos se han realizado en el Gene Center de la Ludwig Maximilian Universität, Munich (Alemania), en el laboratorio del Dr. Georg J. Arnold. Brevemente, los geles para el análisis proteómico no se han teñido, utilizándose directamente tal cual se han extraído del cassette, se han lavado y estabilizado. El proceso global seguido en este estudio se muestra esquemáticamente en la Figura-M.24.

Una vez cargado 50 µg de proteínas por carril, éstas se separaron por PAGE-SDS al 12%. Terminada la electroforesis, extraído el gel, separados los carriles, cortando con un bisturí, cada uno de los carriles de gel, sin teñir, se dividió en tres partes y cada parte se colocó en un tubo diferente. Seguidamente cada fragmento se procesó

individualmente, mediante "digestión triptica *in gel*", siguiendo el protocolo descrito por Carbonero-Aguilar [**Carbonero-Aguilar, 2012**]. Cada parte se incubó en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  40 mM, 30% (v/v) de acetonitrilo a 30 °C durante 120 min. Las proteínas dentro de las piezas se redujeron con ditioneitol 10 mM durante 20 min. Después de lavar con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  40 mM, los geles se alquilaron mediante incubación en yodoacetamida 20 mM durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad.

Las muestras alquiladas se lavaron con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  40 mM y se deshidrataron con 100% de ACN. Las proteínas *in gel* se digirieron con tripsina porcina modificada grado secuenciación (Promega, Madrid, España) en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  40 mM, a 37 °C durante la noche.

Los péptidos trípticos, generados durante la digestión tríptica *in gel*, se extrajeron dos veces, de las piezas de gel, con ACN al 50% (v/v), y se secaron al vacío en una Savant. Los péptidos secos se guardaron a -80 °C hasta su análisis por nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nLC-MS/MS).



**Figura M.24.** Esquema del diseño experimental utilizado para el análisis proteómico del secretoma de *T. harzianum* CEC-T24.

Brevemente, los digeridos peptídicos se resuspendieron en agua Milli-Q ultrapura y se eliminaron las sales con un tampón A (H<sub>2</sub>O 99,9% + 0,1% de ácido fórmico) en una columna atrapadora de péptidos Zorbax 300 SB-C18, 5 × 0,3 mm, (Agilent, Madrid, España) durante 10 min. Los péptidos unidos a la columna se eluyeron a una columna Picofrit empaquetada con Microm Magic C18 AQ, de 10 cm x 75 µm, y se eluyeron con un gradiente de tampón B (99,9% de acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico) al 5% hasta un 50% de tampón B en 75 min, y luego del 50% de tampón B al 90% de tampón B en 80 min, usando para ello un HPLC Thermo Electron Surveyor. Eluyéndose los péptidos, a un flujo de 250 nL min<sup>-1</sup>, a un espectrómetro de masas Thermo Electron LTQ / FT para su análisis.

Los espectros de MS y MS/MS se han obtenido en modo automático con una resolución de 100.000, y los diez iones principales de cada ciclo se sometieron a una autolisis por disociación inducida por colisión (CDI) en una trampa lineal (LTQ). Para el análisis de iones en modo MS/MS, los iones precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados en la puerta de entrada de iones de trampa. Los fragmentos generados por colisión de los precursores con aire en la cámara de colisión CID, fueron además acelerados a 15 kV en la 2<sup>a</sup> fuente y sus masas fueron analizadas después de pasar por el reflector de iones.

El análisis automático de los datos de masas se realizó usando una tolerancia para los fragmentos de 0,80 Da (monoisotópica) y para los precursores de 200 ppm (monoisotópica). Permittiéndose modificaciones parciales y completas de restos aminoacídicos, así como mutaciones

puntuales y dos sitios de escisión perdidos. La validación probabilística de las identificaciones de proteínas en el secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 (v. 2.0, DOE Joint Genome Institute) se ha llevado a cabo con la versión Scaffold 01.07.00 (Proteome Software, Portland, Oregón), utilizando para ello los algoritmos X-Tandem y Protein Prophet. [**Craig y Beavis, 2003; Nesvizhskii y col., 2003**] Los criterios mínimos para la identificación positiva se establecieron en al menos la identificación de dos péptidos y con una probabilidad > 95%.

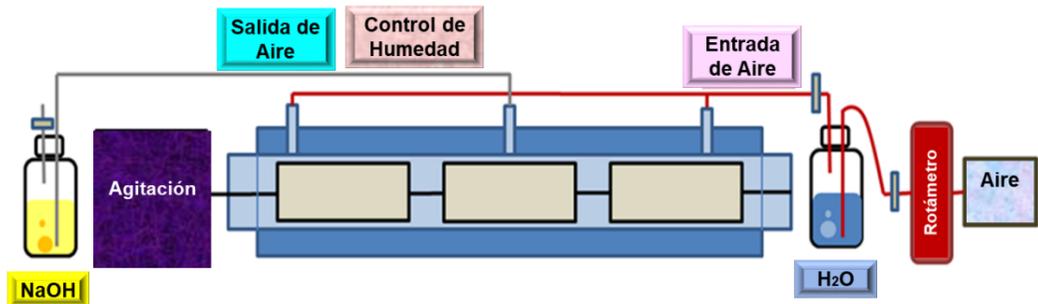
### 3.10 Estabilización de Quitinasas

El estudio de estabilidad de los preparados enriquecidos en quitinasas se ha llevado a cabo en preparados liofilizados, ultraconcentrados y ultraconcentrados + glicerol al 30%, así como inmovilizada en micropartículas de alginato, midiendo la actividad de las muestras al cabo de 1, 2, 4, 6 y 12 meses, previo almacenamiento a 4 °C, temperatura ambiente (22-23 °C) y 45 °C.

### 3.11 Producción de quitinasas en un reactor tipo tambor rotativo (escala semi-piloto).

El cambio de escala de la producción de quitinasas en medios ricos en quitina se ha llevado a cabo en un reactor tipo tambor rotatorio, esquemáticamente descrito en la Figura M.25., de acuerdo con el procedimiento descrito por Pérez-Rodríguez y colaboradores para la producción de otras enzimas, xilanas y feruloil esterasa [**Pérez-**

Rodriguez y col., 2017].



**Figura M.25.** Esquema del reactor tipo tambor rotatorio utilizado para la producción de quitinasas en medios ricos en quitina.

Para el seguimiento del proceso, medida de actividades, biomasa, etc., se han utilizado las mismas técnicas y procedimientos descritos más arriba.

### 3.12 Análisis de datos

Los datos analíticos se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando SAS 9.3. Se ha utilizado la prueba de rango múltiple de Duncan (DMRT), estableciendo el nivel de significancia en 0.05. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

En el caso del estudio proteómico, el análisis automático de los datos de masas se ha realizado usando una tolerancia para los fragmentos de 0,80 Da (monoisotópica) y para los precursores de 200 ppm (monoisotópica). Permittiéndose modificaciones parciales y completas de

restos aminoacídico, así como mutaciones puntuales y dos sitios de escisión perdidos. La validación probabilística de las identificaciones de proteínas en el secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 (v. 2.0, DOE Joint Genome Institute) se ha llevado a cabo con la versión Scaffold 01.07.00 (Proteome Software, Portland, Oregón), utilizando para ello los algoritmos X-Tandem y Protein Prophet. [**Craig y Beavis, 2003; Nesvizhskii y col., 2003**] Los criterios mínimos para la identificación positiva se establecieron en al menos la identificación de dos péptidos y con una probabilidad > 95%.

# == RESULTADOS ==



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La producción de quitinasas a escala industrial requiere de medios ricos en quitina, abundantes, fáciles de obtener y baratos.

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la Naturaleza después de la celulosa. La fuente a partir de la que habitualmente se obtiene la quitina son los residuos de la industria de los crustáceos y los grandes depósitos de exoesqueletos almacenados en la Antártida [Yan, 2015]. Si bien, también existen otras fuentes, potencialmente utilizables, tales como los hongos, insectos, etc. [Ospina-Álvarez y col., 2014; McGavin, 2000].

Entre estas potenciales fuentes los hongos son de especial interés, sobre todo los subproductos generados en la industria conservera de hongos comestibles [Hassainia y col., 2018] y el micelio producido durante la producción biotecnológica (fermentación) de ácido cítrico [Tayel y col., 2011].

### 4.1. Subproductos y sustratos

En el presente trabajo nos hemos centrados en el estudio de los subproductos ricos en quitina generados a lo largo del procesamiento de hongos comestibles, concretamente del champiñón (*Agaricus bisporus*), para conserva en comparación con los subproductos generados en el procesamiento de crustáceos (cangrejo rojo de río, *Procambarus clarkii*).

## 4.1.1. Recopilación de subproductos

De acuerdo con el diseño experimental, lo primero en que nos centramos fue en el acopio de materias primas (subproductos agroindustriales) y de su estabilización, ya que debido a su naturaleza, productos con alto contenido en humedad y nutrientes, son productos fácilmente perecederos y degradables.

En la Tabla-R.1 se muestran las materias primas o subproductos agroindustriales utilizados en este estudio, así como los sustratos derivados de ellas y utilizados en los diferentes ensayos de fermentación y/o cultivos. Como podemos observar, los subproductos utilizados derivan, de la industria conservera del champiñón: tallos de champiñón y champiñones no comercializables, y de la industria del procesamiento del cangrejo de río (*Procambarus clarkii*): cefalotórax y pinzas. Que nos permiten obtener los siguientes sustratos: harina de tallos de champiñón (HTCH), fracción enriquecida en quitina y glucanos (F-Q/G) y harina de cangrejo (HC).

**Tabla-R.1.** Materias primas y/o sustratos utilizados en la producción de quitinasas.

Materia Prima	Sustrato
Tallos de Champiñón*	Harina de Tallos de Champiñón (HTCH) Fracción enriquecida en quitina y Glucanos (F-Q/G)
Subproductos cangrejos**	Harina de cangrejo (HC)

\*Industria conservera de champiñón, \*\*Industria del procesamiento de cangrejos.

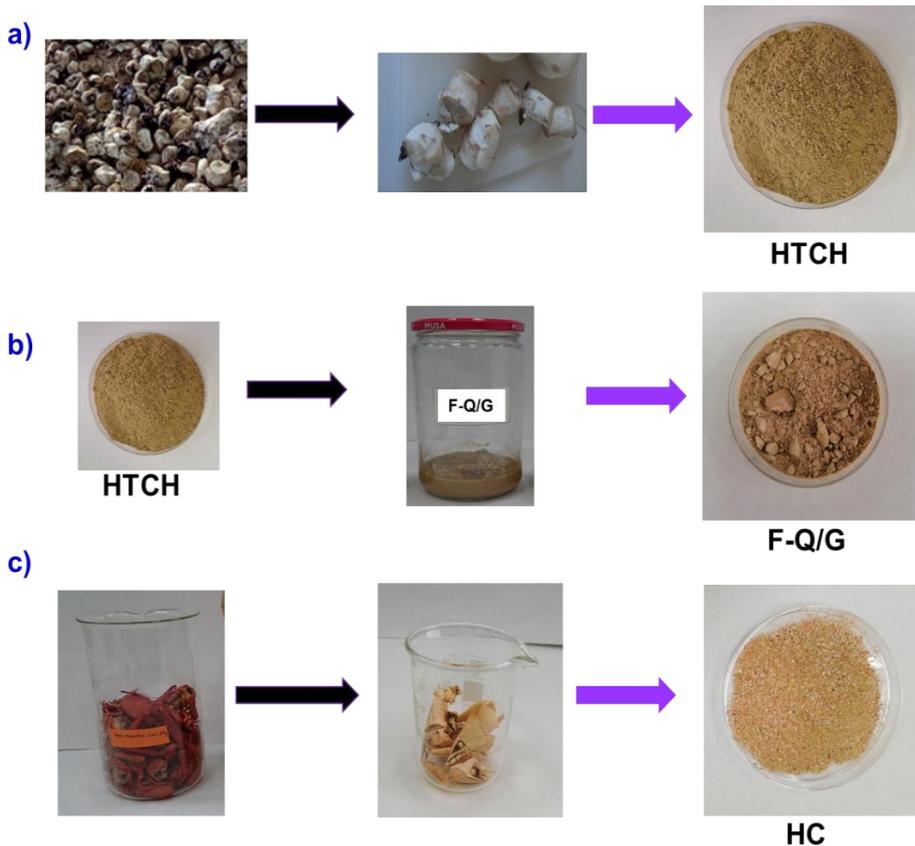
¿Por qué estos subproductos? La razón es porque son subproductos con un alto contenido en quitina, muy abundantes y baratos, y a pesar de que algunos (subproductos de la industria del procesamiento del cangrejo) son temporales, es decir, se obtienen sólo durante un determinado tiempo, se pueden obtener en grandes cantidades, que una vez estabilizados y almacenados adecuadamente se pueden utilizar durante un largo periodo. Los subproductos del champiñón (tallos y champiñones no comercializables) no dependen de la temporalidad, se producen a lo largo de todo el año.

#### **4.1.2. Preparación de los sustratos**

A partir de los dos subproductos ricos en quitina mencionados, se ha procedido a preparar y estabilizar los correspondientes sustratos: HTCH y F-Q/G, a partir del subproducto de la industria conservera del champiñón y la HC a partir de la industria del procesamiento del cangrejo rojo de río. Utilizándose este último como sustrato control (quitina de crustáceo).

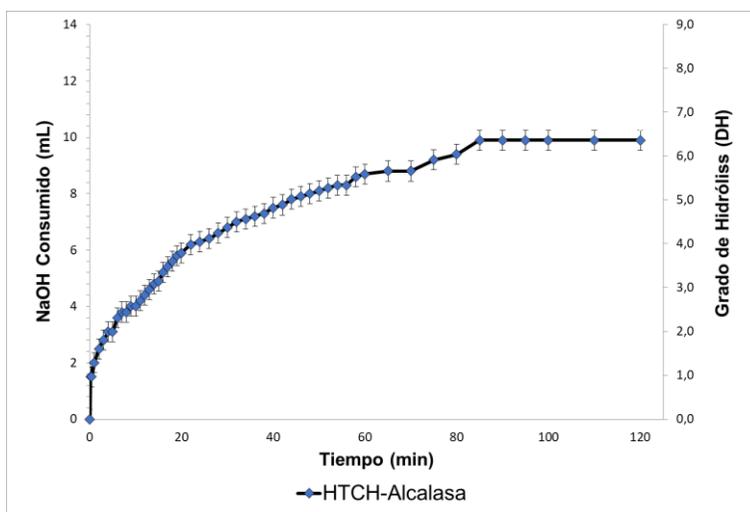
Los tallos de champiñón una vez lavados con agua fría abundante, para eliminar restos de compost y tierra, se han escurrido y se han secado con aire a 90 °C en una estufa con ventilación forzada hasta peso constante. El producto seco se molió en un molino de pistón equipado con un tamiz de 2,5 mm de diámetro, obteniéndose un polvo fino uniforme al que hemos denominado HTCH (ver Figura-R.1a).

Con el fin de obtener una fracción enriquecida en quitina, así como un hidrolizado proteico, se ha procedido a la desproteínización parcial de la HTCH mediante su tratamiento con la proteasa Alcalasa®. Obteniéndose una fracción soluble (hidrolizado proteico) y una fracción insoluble. Brevemente, la HTCH se ha resuspendido en agua en una proporción del 10% y se ha tratado con la proteasa Alcalasa® en una relación enzima/sustrato, E/S = 0,03 v/p, a 55 °C durante 180 min manteniendo el pH constante a 8,5, alcanzando un grado de hidrólisis del  $6,21 \pm 0,4\%$  (Figura-R.2).



**Figura R1.** Sustratos utilizados para la producción de quitinasas: a) HTCH, b) F-Q/G y c) HC.

Seguidamente el hidrolizado se ha centrifugado a  $10.000 \times g$ , obteniéndose un sobrenadante (hidrolizado proteico), y un precipitado que se ha secado en estufa con aire forzado a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta peso constante. El producto seco se molió en un molino de pistón equipado con un tamiz de  $2,5 \text{ mm}$ . Obteniéndose un polvo fino uniforme que hemos denominado fracción enriquecida en quitina/glucanos (F-Q/G) (ver Figura-R.1b).



**Figura R2.** Curva de hidrólisis de la HTCH con Alcalasa®.

Los subproductos de la industria del procesamiento del cangrejo: cefalotórax y pinzas, tratados con  $\text{HCl } 2\text{M}$  *overnight*, para desmineralizar, se han lavado con abundante agua y una vez secados con aire caliente ( $80^\circ\text{C}$ ), fueron molidos en un molino de pistón y tamizados a través de un tamiz de poro  $2,5 \text{ mm}$  de diámetro, tal y como se describe en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos. Obteniéndose un polvo fino uniforme al que hemos denominado HC (ver Figura-R.1c).

Los tres productos: HTCH, F-Q/G y HC, sustratos ricos en quitina, se han utilizado para la formulación de medios de cultivo para producir quitinasas, como más adelante describiremos.

### 4.1.3. Caracterización de los sustratos

La caracterización de los sustratos para la fermentación se ha llevado a cabo mediante la determinación de los siguientes parámetros: humedad, materia orgánica (MO), grasa bruta, nitrógeno total ( $N_t$ ), proteína ( $N_t \times 5,45$  para la HTCH y F-Q/G y  $N_t \times 6,24$  para la HC), hidratos de carbono totales, quitina, y pH. En la Tabla-R.2 se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla-R.2.** Composición básica de los sustratos utilizados en la producción de quitinasas por fermentación. (Datos expresados en % p.s.)

	HTCH (%)	F-Q/G (%)	HC (%)
<b>Humedad<sup>&amp;</sup></b>	7,3±1,2	7,4±0,5	7,0 ± 0,7
<b>Peso seco<sup>*</sup></b>	92,7±1,2	92,6±0,5	93,0 ± 0,7
<b>Cenizas<sup>*</sup></b>	8,8±2,3	7,6±0,7	35,5 ± 2,5
<b>MO<sup>&amp;</sup></b>	91,2±2,3	92,4±3,7	64,5 ± 2,5
<b>Grasa<sup>*</sup></b>	3,2±0,4	n.d.	12,8 ± 0,9
<b><math>N_t</math><sup>*</sup></b>	5,2±0,3	0,6±0,1	5,04 ± 0,72
<b>Proteína<sup>&amp;</sup></b>	28,6±1,7 <sup>§</sup>	3,3±0,5 <sup>§</sup>	31,5 ± 4,5 <sup>#</sup>
<b>HC+Otros<sup>&amp;</sup></b>	59,4±5,1	89,1±0,9	20,2±1,9
<b>- Quitina<sup>*</sup></b>	22,1±1,9	33,5±2,4	16,1±1,7
<b>pH<sup>*</sup></b>	6,9±0,3	7,9±0,4	7,2±0,3

<sup>&</sup>Datos calculados; <sup>\*</sup>Datos experimentales; <sup>§</sup>factor 5,45 para HTCH; <sup>#</sup>factor 6,24 para HC.

Analicemos con algo más de detalle estos sustratos.

### ***i) Harina de tallos de champiñón (HTCH)***

Una vez secados y molidos los tallos de champiñón se obtiene una harina de color marrón-oscuro, con un contenido de humedad del  $7,3\pm 1,2\%$ , y peso seco del  $92,7\pm 1,2\%$ ; correspondiendo el  $8,8\pm 2,3\%$  (p.s.) a cenizas, y el  $91,2\pm 2,3\%$  (p.s) a materia orgánica. Con un contenido en grasa del  $3,2\pm 0,4\%$ , p.s., en proteína del  $28,6\pm 1,7\%$ , p.s., y en hidratos de carbono más otros del  $59,4\pm 5,1\%$ , p.s. (ver Tabla-R.2). Del contenido en carbohidratos más de la mitad es quitina, representando un  $22,1\pm 1,9\%$  del peso seco. Contenido sumamente interesante para utilizarse tanto como material de partida para obtener sustratos ricos en quitina para producir quitinasas, como para obtener nanoquitina [Liang y col., 2018; Wu y col., 2019].

### ***ii) Fracción enriquecida en quitina y glucanos (F-Q/G)***

Una vez tratada la HTCH con la proteasa Alcalasa®, el precipitado desproteinizado enzimáticamente se ha secado y molido, obteniéndose un polvo fino uniforme de color beige-blanco, que hemos denominado fracción enriquecida en quitina/glucanos (F-Q/G) ya que está constituida mayoritariamente por polisacáridos (glucanos insolubles y quitina, fundamentalmente). Esta F-Q/G tiene un contenido de humedad del

7,4±0,5%, y peso seco del 92,6±0,5%; correspondiendo el 7,6±0,7% (p.s.) a cenizas, y el 92,4±3,7% (p.s.) a materia orgánica; con un contenido en proteína del 3,3±0,5%, p.s., y en hidratos de carbono más otros (fundamentalmente quitina y glucanos) del 89,1±0,9%, p.s., correspondiendo a quitina el 33,54±2,4 (ver Tabla-R.2).

### **iii) Harina de cangrejo (HC)**

Una vez los subproductos de cangrejo, secos y molidos se obtiene una harina de color marrón-claro con un contenido en humedad del 7,0±0,7% y peso seco del 93,0±0,7%, correspondiendo más de un tercio del peso a cenizas (35,5±2,5%) y el 64,5±2,5% a materia orgánica, de la que el 12,8±0,9 corresponde a grasa, el 31,5±4,5 a proteínas y el 20,2±1,9% a hidratos de carbono, correspondiendo un 16,1±1,7% a quitina.

## **4.2. Fermentaciones**

Una vez obtenido los sustratos ricos en quitina (HTCH, F-Q/G y HC) se procedió a estudiar la producción de quitinasas, en medios de fermentación formulados con los anteriores sustratos ricos en quitina por diversas cepas productoras de esta enzima disponibles en nuestro laboratorio (*B. licheniformis* ATCC 21415, *T. harzianum* CEC-T24 y *T. atroviride* CEC-T23), y habitualmente utilizadas para la producción industrial de esta enzima. Para ello se ha estudiado la producción de quitinasas mediante dos sistemas: FS y FES.

#### 4.2.1. Fermentación sumergida (FS)

En este primer estudio se analizó la producción de hidrolasas, fundamentalmente quitinasas,  $\beta$ -glucanasas y proteasas secretadas por *B. licheniformis* ATCC 21415, de *T. harzianum* CEC-T24 y *T. atroviride* CEC-T23. Estos microorganismos se cultivaron en fermentación sumergida (FS) en aerobiosis, con agitación mecánica, y temperatura adecuada ( $28 \pm 1$  °C), durante 14 días, utilizando diferentes medios de cultivo, tal y como se muestra en la Tabla-R.3. Los medios utilizados han sido: medios con quitina ( $Q_p$  o  $Q_c$ ) y  $H_2O$ , medios con quitina ( $Q_p$  o  $Q_c$ ) y medio mínimo de sales y vitaminas, un medio mínimo utilizado para cultivo de hongos (Czapeck) con  $Q_c$ , y medios ricos (PB/ $Q_c$ , HTCH y F-Q/G).

Como puede observarse, inicialmente, los cultivos se han desarrollado en medios que contienen únicamente agua y quitina, bien en forma de polvo o en forma coloidal ( $H_2O/Q_p$ ,  $H_2O/Q_c$ ), con el fin de analizar la capacidad de estos microorganismos para utilizar la quitina como única fuente de energía. Como cabía esperar el desarrollo ha sido escaso o pobre pero se pone de manifiesto claramente que tanto *Trichoderma* como *Bacillus* pueden utilizar la quitina como fuente de energía para su crecimiento y que necesariamente lo hacen a través de la producción de quitinasas y otras hidrolasas que facilitan su uso como fuente de carbono y de nitrógeno.

**Tabla-R.3.** Producción de biomasa en los diferentes medios de cultivo después de 14 días de crecimiento en fermentación sumergida.

Medios de Cultivo \ Biomasa	<i>T. harzianum</i> CEC-T24 (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>T. atroviride</i> CEC-T23 (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>B. licheniformis</i> ATCC 21415 (mg mL <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O/Q <sub>p</sub>	0.1±0.1	0.2±0.1	0.2±0.2
H <sub>2</sub> O/Q <sub>c</sub>	0.4±0.1	0.3±0.2	1.3±0.1
Mm/Q <sub>p</sub>	0.7±0.2	0.5±0.3	0.4±0.1
Mm/Q <sub>c</sub>	3.2±0.4	2.9±0.2	2.3±0.3
Czapeck/Q <sub>c</sub>	0.2±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1
PB/Q <sub>c</sub>	4.6±0.5	3.7±0.3	2.6±0.2
HTCH	9.8±0.5	8.5±0.3	4.7±0.4
F-Q/G	8.2±0.6	7.4±0.4	2.7±0.4

(Q<sub>p</sub>: Quitina en polvo, Q<sub>c</sub>: Quitina coloidal, Mm: Medio mínimo, PB: (Potato Broth = Extracto de Patata, F-Q/G: Fracción enriquecida de Quitina y Glucano).

El siguiente paso fue estudiar el efecto del aporte de minerales y vitaminas, para ello se llevarón a cabo los cultivos en medios mínimos, respecto al contenido mineral y vitamínico, suplementados con quitina en forma de polvo o en forma coloidal (Mm/Q<sub>p</sub>, Mm/Q<sub>c</sub>), cuya finalidad, básicamente, es la misma, testar el crecimiento de los tres microorganismos, pero favorecido por la presencia del aporte mineral y vitamínico mínimo. Estos resultados se han complementado con el estudio del crecimiento en el medio Czapeck/Q<sub>c</sub> que es también un medio mínimo para cultivo de hongos y levaduras [Gamazo y col., 2009].

Como se observa de los resultados expuestos en la Tabla-R.3, en los medios mínimos (Mm y Czapeck) suplementados con  $Q_p$  o con  $Q_c$  sí se observa una ligera mejora en el crecimiento de los tres microorganismos, si bien el crecimiento en el medio Czapeck/ $Q_c$  es prácticamente igual que el observado para los medios de  $H_2O/Q$ . Además, estos resultados también muestran que tanto en el medio formulado sólo con  $H_2O$  y quitina ( $Q_p$  o  $Q_c$ ), como en el medio mínimo (Mm) y quitina ( $Q_p$  o  $Q_c$ ), cuando se utiliza  $Q_c$  el crecimiento de los microorganismos es mayor, se obtiene mayor cantidad de biomasa/mL, que cuando se utiliza  $Q_p$ . Esto podría explicarse por la presencia de una mayor proporción de quitina amorfa presente en la  $Q_c$  que en la  $Q_p$  donde predomina la quitina cristalina. Lo que facilitaría el uso de la quitina como fuente nutritiva por los microorganismos por ser más fácilmente accesible a las quitinasas. Por ello, a partir de este punto se ha utilizado  $Q_c$  en el resto de los ensayos.

Con el fin de analizar el efecto de la quitina sobre el crecimiento de estos microorganismos en un medio nutritivamente rico, se ha estudiado el crecimiento en un medio rico suplementado con quitina, como es el medio PB/ $Q_c$  y en dos medios naturales ricos en quitina formulados con HTCH o F-Q/G, respectivamente (ver Tabla-R.3).

En los medios ricos (PB/ $Q_c$ , HTCH, F-Q/G), con fuentes de carbono, nitrógeno, sales, y vitaminas fácilmente utilizables, se observa un mayor crecimiento de los tres microorganismos.

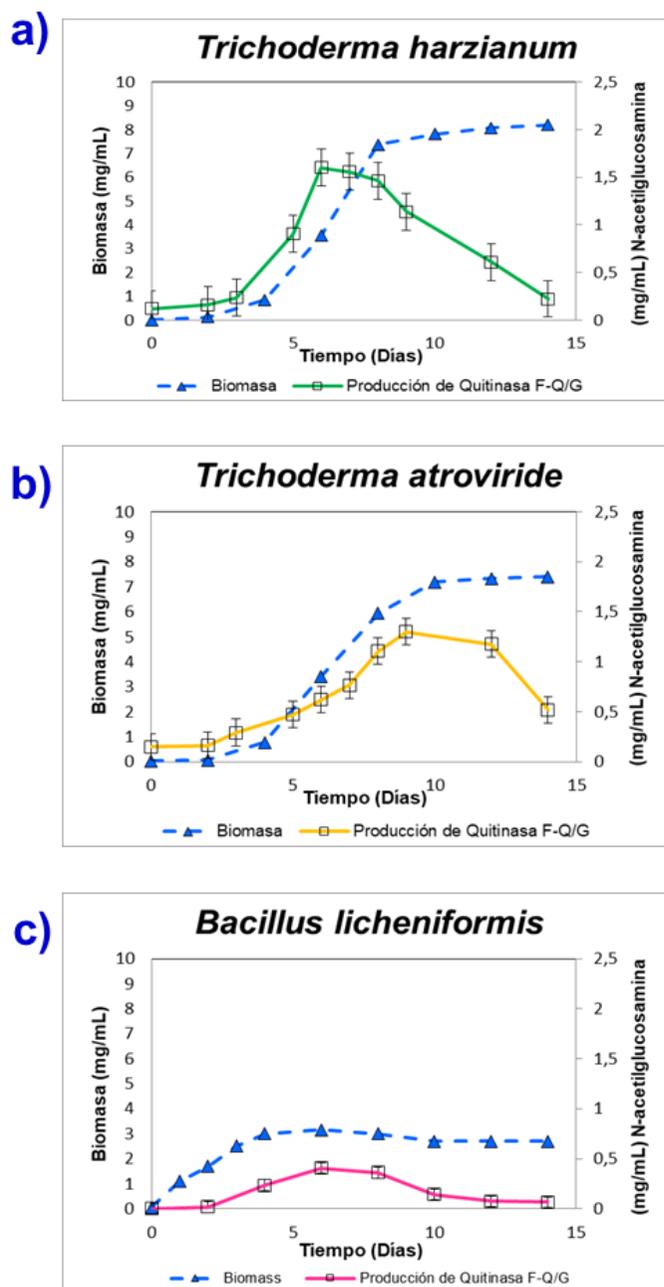
En el medio PB/Q<sub>c</sub> la producción de biomasa es ligeramente superior a la obtenida en el medio Mm/Q<sub>c</sub>, para los tres microorganismos, si bien esta diferencia es más pronunciada en el caso de *T. harzianum* CEC-T24 y *T. atroviride* CEC-T23 que en el caso de *B. licheniformis* ATCC 21415.

Sin embargo, en los medios formulados con HTCH o con F-Q/G, *T. harzianum* CEC-T24 y *T. atroviride* CEC-T23 muestran claramente un mayor crecimiento que *Bacillus*, lo que podría atribuirse a una mayor eficiencia en la producción de enzimas hidrolíticas secretadas al medio por parte de *T. harzianum* CEC-T24 y *T. atroviride* CEC-T23. También se observa que tanto *Trichoderma* como *Bacillus* crecen mejor en presencia de quitina fúngica (HTCH y F-Q/G) que en presencia de quitina coloidal de crustáceo, probablemente a una mayor cantidad de quitina amorfa en la quitina fúngica que en la quitina de crustáceo.

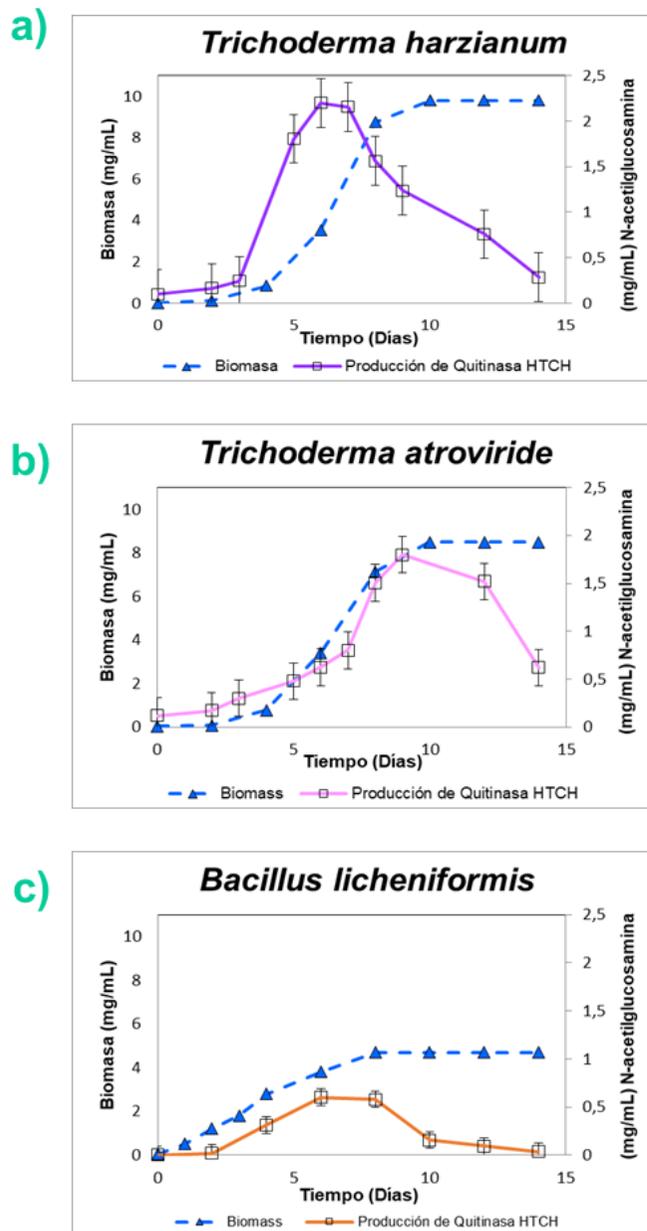
Con el fin de estudiar la producción de hidrolasas, y en particular de quitinasas, a lo largo del cultivo, a la vez que el crecimiento se analizó también la producción de actividad quitinasa. En la siguiente Figura-R.3 se muestran las curvas de crecimiento de *T. harzianum* CEC-T24, *T. atroviride* CEC-T23 y *B. licheniformis* ATCC 21415 y las curvas de producción de quitinasas (actividad quitinasa) en el medio de cultivo formulado con F-Q/G, resultados análogos se han obtenido para los cultivos en el medio formulado con HTCH (Figura-R.4).

De los resultados expuestos en la Figuras-R.3 y -R.4 se observa claramente que la producción de quitinasas en el medio formulado con

HTCH es superior al obtenido en el medio formulado con la F-Q/G, lo que probablemente se ha debido a la mayor riqueza del medio formulado con HTCH, ya que además de la quitina fúngica y glucanos insolubles, presentes también en la F-Q/G, se aportan proteínas, péptidos, hidratos de carbono fácilmente hidrolizables (algunos glucanos), minerales y vitaminas que no están presentes en la F-Q/G, ya que se han eliminado durante la elaboración de esta fracción. En la Tabla-R.4 se muestran las actividades quitinasa alcanzadas al 6º día de cultivo, para *T. harzianum* CEC-T24, y *B. licheniformis* ATCC 21415 y al 9º día para *T. atroviride* CEC-T23, crecidos en fermentación sumergida en medios formulados con F-Q/G y HTCH.



**Figura R.3.** Producción de biomasa (línea discontinua con triángulo) y producción quitinasa (línea continua con cuadrado) de: **a)** *T. harzianum* CEC-T24, **b)** *T. atroviride* CEC-T23 y **c)** *B. licheniformis* ATCC 21415, crecidos en el medio F-Q/G.



**Figura R.4.** Producción de biomasa (línea discontinua con triángulo) y producción quitinasa (línea continua con cuadrado) de: **a)** *T. harzianum* CEC-T24, **b)** *T. atroviride* CEC-T23 y **c)** *B. licheniformis* ATCC 21415, crecidos en el medio HTCH.

**Tabla-R.4.** Producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24, *T. atroviride* CEC-T23 y *B. licheniformis* ATCC 21415 crecidos en fermentación sumergida en un medio formulado con F-Q/G y HTCH.

<b>Microorganismo</b>	<b>GlcNAc (mg/mL) F-Q/G</b>	<b>GlcNAc (mg/mL) HTCH</b>
<b><i>T. harzianum</i> CEC-T24</b>	1,6±0,1	2,2±0,3
<b><i>T. atroviride</i> CEC-T23</b>	1,3±0,1	1,8±0,4
<b><i>B. licheniformis</i> ATCC 21415</b>	0,4±0,1	0,6±0,2

Estos resultados ponen claramente de manifiesto, que en medios formulados con HTCH o F-Q/G, y en fermentación sumergida, *Trichoderma* excreta al medio mayor cantidad de enzimas hidrolíticas que *Bacillus*, los que justificaría el menor crecimiento (producción de biomasa) de *Bacillus*. Estos resultados también muestran que *T. harzianum* CEC-T24 excreta mayor cantidad de quitinasas que *T. atroviride* CEC-T23 tanto cuando se crecen en un medio formulado con F-Q/G como en un medio formulado con HTCH. De acuerdo con la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1981), y como se indica en el correspondiente apartado de M&M las actividades enzimáticas se han expresado como Unidades Internacionales (UI, o *International Units*, IU). Los resultados obtenidos por interpolación en una curva patrón de N-acetilglucosamina se han expresado como UI de actividad enzimática tras la correspondiente transformación.

En relación con la producción de quitinasas, a partir de nuestros

datos, se observa que *T. harzianum* CEC-T24 presenta un máximo de producción de quitinasas de  $1,6 \pm 0,1$  mg de N-acetil-glucosamina/mL, equivalente a  $1446,59 \text{ UI L}^{-1}$  de actividad de quitinasa al 6º días de cultivo en el medio formulado con F-Q/G y de  $2,2 \pm 0,3$  mg/mL equivalente a  $1989,06 \text{ UI L}^{-1}$  de actividad de quitinasa también al 6º días de cultivo, en el medio formulado con HTCH, mientras que *T. atroviride* CEC-T23 presenta el máximo de producción de  $1,3 \pm 0,1$  y  $1,8 \pm 0,4$  mg/mL a los 9 días cuando se crece en un medio formulado con F-Q/G o HTCH, respectivamente, mientras que *B. licheniformis* ATCC 21415 presenta el máximo de producción de  $0,4 \pm 0,1$  y  $0,6 \pm 0,2$  mg/mL, tras 6 días de cultivo, en un medio formulado con F-Q/G o HTCH, respectivamente.

En todos los casos, a partir del punto de máxima producción de actividad, se observa una importante reducción de la actividad quitinasa, coincidiendo, con la inducción de la producción de proteasas, como más adelante presentaremos. Este fenómeno, de pérdida de actividad quitinasa por inducción de la actividad proteásica, ha sido también observado por otros investigadores utilizando otros sustratos y microorganismos [Parrado y col., 2014]. Por lo que es fundamental determinar el punto de cosecha para minimizar la pérdida de actividad quitinasa por proteólisis, que en el caso de *T. harzianum* CEC-T24, tanto en medios de cultivo formulados con HTCH como con la F-Q/G, estaría sobre los 6 días de cultivo. O bien monitorizar el cultivo, siguiendo la producción de la actividad proteásica mediante el método de la azocaseína, por ejemplo, a partir del 5º día cultivo midiendo dicha

actividad cada 2 horas y cosechando el cultivo en el momento de iniciarse la inducción, lo que viene reflejado por un marcado incremento en la actividad.

Una vez obtenido estos resultados, centramos el estudio en la producción de quitinasas por *Trichoderma harzianum* CEC-T24 en medios formulados con HTCH y/o F-Q/G. Los resultados obtenidos en este estudio, mostrados en las Figuras-R.3, -R.4 y Tabla-R.4, son similares a los descritos por otros grupos que utilizan sustratos ricos en quitina, como las paredes celulares de los hongos [de Lima y col., 2016] o quitina de crustáceos [Yang y col., 2019]. Estos resultados, además sugieren que la regulación de la expresión de enzimas hidrolíticas, como las quitinasas y  $\beta$ -glucanasas, en estos hongos puede verse influida por la cantidad y complejidad de la quitina y  $\beta$ -glucanos presentes en el medio de cultivo. Las paredes celulares fúngicas están compuestas principalmente por  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6-glucanos (polímeros de glucosa) y quitina (polímero de Glc-NAc unidas a través de enlaces  $\beta$ -1,4), y el grado de cristalinidad de esta última depende en gran manera de la fuente, siendo más accesible, y probablemente más amorfa, la quitina fúngica que la procedente de crustáceos que además de una mayor cristalinidad presenta una mayor rigidez debido a restos del componente mineral no siempre eliminado durante la desmineralización.

#### 4.2.2. Fermentación en estado sólido (FES)

Identificado que *T. harzianum* CEC-T24 secreta eficientemente quitinasas en medios de cultivo formulados con HTCH o con F-Q/G, el

siguiente paso fue estudiar que sistema de fermentación era mejor para la producción de quitinasas en gran escala. Por lo que también se estudió la producción de quitinasas en los mismos medios de cultivo (ricos en quitina) pero utilizando la técnica de FES, ya que debido a determinadas ventajas como: sencillez, mayor productividad, menores costes en el downstream, etc., actualmente hay una tendencia a la sustitución de la FS por esta última [**Abdul Manan y Webb, 2017**].

Actualmente, existe un gran interés en mejorar la producción industrial de proteínas y enzimas con potencial comercial, como quitinasas e hidrolasas, que pueden tener importantes aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, biotecnología, biocontrol y biorremediación [**Askolin y col., 2001; Howard y col., 2003**].

La fermentación en estado sólido, o también denominada fermentación en medio sólido, se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre [**Blandino y col., 2005; Krishna, 2005**]. Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. Es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". El sustrato debe contener solo la humedad suficiente para promover el crecimiento y el metabolismo de la actividad del microorganismo [**De Ory y col., 2007**].

Esta técnica presenta ventajas y desventajas frente a la FS.

Entre las ventajas caben citar las siguientes: i) Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios. ii) La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras. iii) La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo. iv) el proceso de recuperación de los productos es sencillo. Algunos productos son utilizados integralmente como alimento animal, productos para el control biológico, etc.

Entre las principales desventajas podemos indicar las siguientes: i) Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad. ii) La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso. iii) La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación, tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración del sustrato y productos. iv) Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados. v) El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

A pesar de estos inconvenientes, que en la mayoría de los casos son inevitables y en otros relativamente fáciles de solucionar, la FES se está revelando como el procedimiento más adecuado para la producción de

enzimas cuando se usan como sustratos sub-productos agroindustriales, como es la HTCH.

Por lo que, seguidamente, en el presente trabajo, estudiamos la producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 en FES con el fin de comprobar cuál de los dos sistemas utilizados, FS o FES, era el más adecuado para la producción de quitinasas en medios formulados con sustratos ricos en quitina: HTCH, F-Q/G y HC como control. Teniendo en cuenta que en FS *T. harzianum* CEC-T24 es el microorganismo que muestra una mejor producción de quitinasa en los medios ricos en quitina ensayados, en el caso de la FES, hemos centrado también el estudio en este hongo; estudiando su crecimiento y la producción de quitinasas en los medios indicados en la Tabla-R.5.

**Tabla-R.5.** Producción de quitinasas tras 6 días de Fermentación en estado sólido.

Medios de Cultivos	GlcNAc (mg/mL)
F-Q/G <sub>-A</sub>	1,7±0,2
F-Q/G <sub>+A</sub>	2,8±0,3
HTCH <sub>-A</sub>	3,5±0,3
HTCH <sub>+A</sub>	5,8±0,4
HC <sub>-A</sub>	1,0±0,2
HC <sub>+A</sub>	1,2±0,3

**FES:** Fermentación en estado sólido, **F-Q/G:** Fracción de quitina/glucano, **HTCH:** Harina de Tallo de Champiñón, **HC:** Harina de Cangrejo, **A:** Aireación.

De los datos expuestos en la Tabla-R.5 se observa que la aireación favorece la producción de quitinasas, probablemente debido a la mayor cantidad de biomasa producida en estas condiciones. Si bien, en el caso de la HC, prácticamente no se observa diferencia, lo que podría atribuirse a un mayor apelmazamiento de la HC húmeda, que dificulta su aireación y que constituye uno de los inconvenientes señalados para la FES, pero que se podría solucionar con la inclusión de elementos inertes (bolas o trozos de plástico) que evitaría el apelmazamiento del sustrato [**Costa y col., 2018**].

Estos resultados también muestran que la producción de quitinasas es mayor en un medio formulado con HTCH que un medio formulado con F-Q/G, lo que puede atribuirse a una mayor presencia de proteínas y péptidos, así como de azúcares, fácilmente disponibles por el microorganismo, en la HTCH, y que han sido eliminados en parte a la hora de preparar la F-Q/G. Por otro lado, el uso de HTCH en lugar de F-Q/G resulta mucho más beneficioso, desde un punto de vista económico, ya que su preparación es mucho más sencilla y barata, ya que no precisa del uso de enzimas para su obtención y de ningún otro procedimiento adicional, salvo el secado y la molienda. Lo que abarata grandemente el proceso. Los resultados anteriores muestran que la mayor concentración de quitinasas se obtiene en el medio formulado con HTCH y llevado a cabo con aireación, seguido de la producción en el medio F-Q/G y HC ( $5,8\pm 0,4$ ,  $2,8\pm 0,3$  y  $1,2\pm 0,3$  mg de GlcNAc/mL respectivamente). Teniendo en cuenta estos resultados, parece lógico utilizar HTCH antes que la F-Q/G, ya que el objetivo es producir quitinasas en medios baratos y con mínimos pretratamientos.

**Tabla-R.6.** Producción de quitinasas tras 6 días de Fermentación tanto en FS como FES.

<b>FS</b>						
	<i>GlcNAc</i> (mg/mL)	*mg GlcNAc	mg GlcNAc/mL	μMOL/mL	UI/mL	UI/L
F-Q/G <sub>-A</sub>	1,6	2,4	9,6	43,40	1,45	1446,59
F-Q/G <sub>+A</sub>	1,7	2,55	10,2	46,11	1,54	1537,00
HTCH <sub>-A</sub>	2,2	3,3	13,2	59,67	1,99	1989,06
HTCH <sub>+A</sub>	2,5	3,75	15	67,81	2,26	2260,30
HC <sub>-A</sub>	0,4	0,6	2,4	10,85	0,36	361,65
HC <sub>+A</sub>	0,5	0,75	3	13,56	0,45	452,06

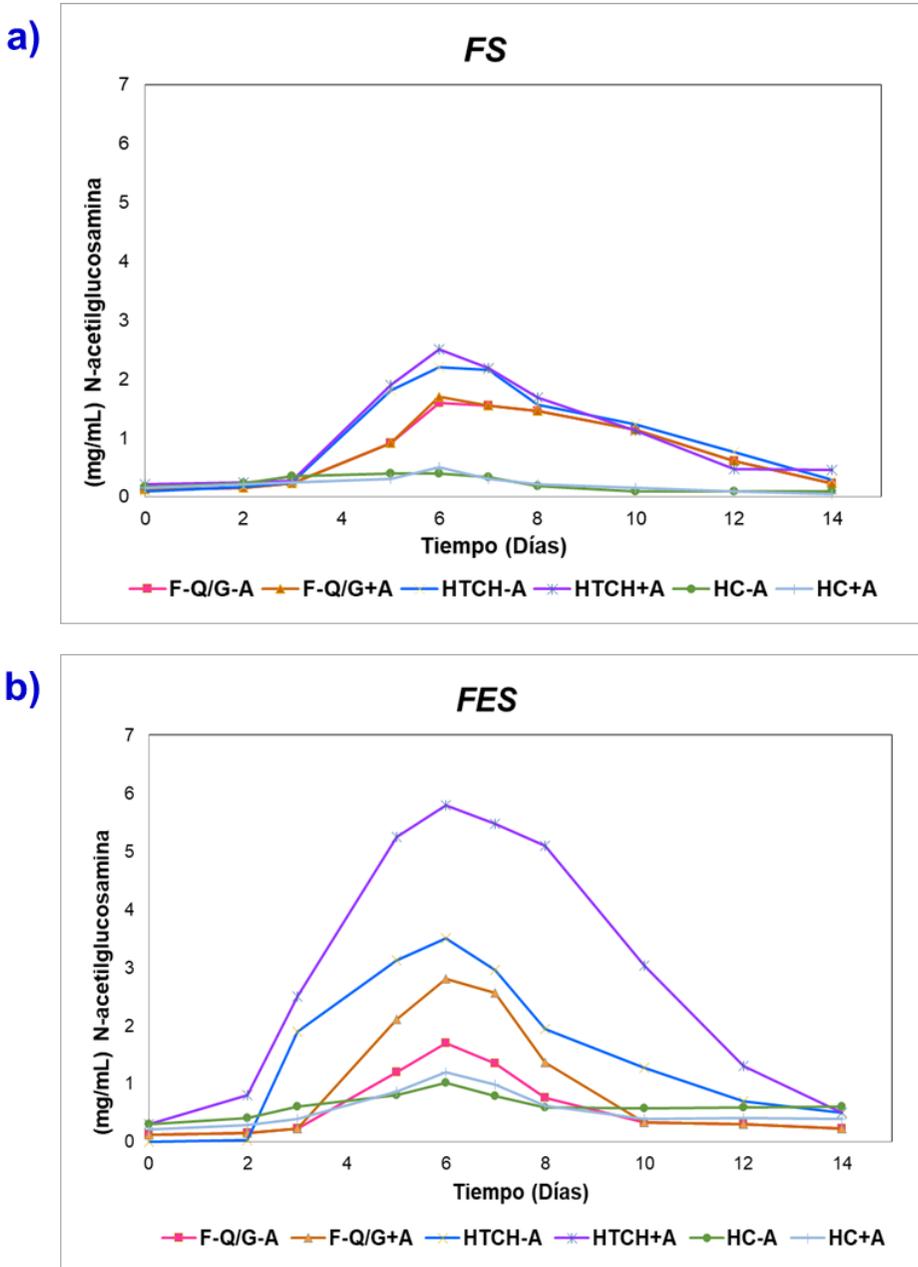
<b>FES</b>						
	<i>GlcNAc</i> (mg/mL)	*mg GlcNAc	mg GlcNAc/mL	μMOL/mL	UI/mL	UI/L
F-Q/G <sub>-A</sub>	1,7	2,55	10,2	46,11	1,54	1537,00
F-Q/G <sub>+A</sub>	2,8	4,2	16,8	75,95	2,53	2531,53
HTCH <sub>-A</sub>	3,5	5,25	21	94,93	3,16	3164,41
HTCH <sub>+A</sub>	5,8	8,7	34,8	157,32	5,24	5243,89
HC <sub>-A</sub>	1,0	1,5	6	27,12	0,90	904,12
HC <sub>+A</sub>	1,2	1,8	7,2	32,55	1,08	1084,94

\*mgGlcNAc: Cantidad de GlcNAc en 1,5 mL de volumen final de reacción, del cual 0,25 mL corresponde a la cantidad de muestra.

### 4.2.3 Análisis de la producción relativa (UI/L/día)

Teniendo en cuenta que lo que nos interesa es conseguir la máxima producción de nuestra enzima, se procedió al análisis de la producción relativa (UI/L/día) del cultivo de *T. harzianum* CEC-T24 en los diferentes medios, mediante los dos sistemas de fermentación utilizados: FS y FES.

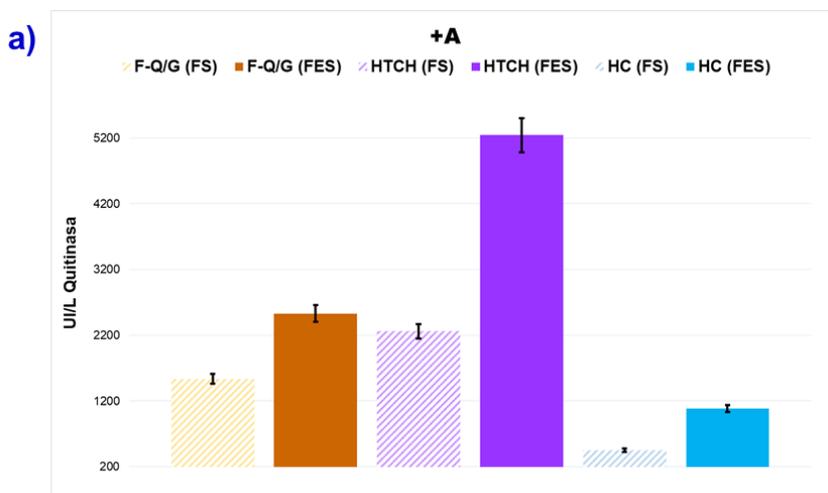
En la Figura-R.5 se muestra la producción de quitinasa de *T. harzianum* CEC-T24 cultivada con diferentes sustratos (HTCH, F-Q/G y HC) como principal fuente de carbono, cultivado en FS y FES. Estos resultados muestran que *T. harzianum* CEC-T24 produjo más actividad de quitinasa en el medio de HTCH<sub>+A</sub>, en FES obteniendo una producción máxima de 5243,89 UI L<sup>-1</sup> en el día 6 de fermentación, a partir de dicho punto la actividad se reduce drásticamente siendo en el día 14 de 361,65 UI L<sup>-1</sup> probablemente a una importante inducción de la producción de proteasas, tal y como se ha discutido más arriba y ha sido reportado por algunos autores para otros microorganismos y medios de cultivo [Orts Gómez y col., 2017].

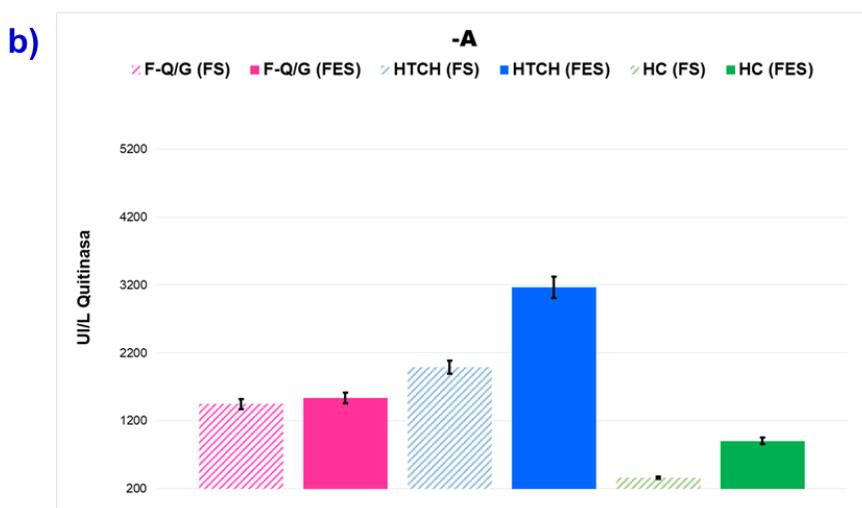


**Figura R.5.** Comparación de la producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios formulados con diferentes sustratos con aireación (+A) y sin aireación (-A). **a)** Fermentación Sumergida (FS) y **b)** Fermentación en estado sólido (FES).

En la siguiente Figura-R.6 se muestra comparativamente la producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en en los diferentes medios con aireación (Figura-6.a) y sin aireación (Figura-6.b).

Como se puede observar Figura-R.6 donde se compara la producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en los diferentes medios con aireación (Figura-6.a) y sin aireación (Figura-6.b), la producción máxima alcanzada al sexto día, es mayor en todos los casos cuando el cultivo se lleva a cabo con aireación eficiente, que cuando no hay aireación, lo cual es lógico ya que el oxígeno es necesario para el normal desarrollo y metabolismo del microorganismo. En esta figura también se observa claramente que la máxima producción se obtiene en el medio de HTCH<sub>+A</sub>, poniendo de manifiesto que la aireación favorece notablemente en la producción de enzimas como se observa en todos los medios de cultivo ensayados.





**Figura R.6.** Comparación de la producción relativa de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24, en medios formulados con diferentes sustratos, al sexto día de cultivo. **a)** Cultivos con aireación y **b)** Cultivos sin aireación.

En cuanto a la producción relativa, los resultados obtenidos en los dos sistemas de fermentación, FS y FES, se muestran en la Tabla-R.7.

**Tabla-R.7.** Producción relativa de quitinasas de *Trichoderma harzianum* CEC-T24 crecido en FS y FES en diferentes medios, tras 6 días de fermentación.

Medios de cultivos	$UI L^{-1} Día^{-1}$ FS	$UI L^{-1} Día^{-1}$ FES
F-Q/G <sub>-A</sub>	241,10	256,17
F-Q/G <sub>+A</sub>	256,17	421,92
HTCH <sub>-A</sub>	331,51	527,40
HTCH <sub>+A</sub>	376,72	873,98
HC <sub>-A</sub>	60,27	150,69
HC <sub>+A</sub>	75,34	180,82

FS: Fermentación Sumergida, FES: Fermentación en estado sólido, F-Q/G: Fracción de quitina/glucano, HTCH: Harina de Tallo de Champiñón, HC: Harina de Cangrejo, A: Aireación.

Estos resultados muestran que, independientemente del medio de cultivo, la producción relativa ( $\text{UI L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) es sistemáticamente mayor en FES. Lo que podría ser debido a una utilización más eficiente de los nutrientes por *T. harzianum* CEC-T24 en este sistema de cultivo. Estos resultados también ponen de manifiesto que la aireación favorece la producción de enzimas, (Figura-R.6a), probablemente debido a que al crecer el microorganismo en superficie tiene un mayor acceso a los sustratos y al oxígeno, mientras que en el caso de la FS esto depende grandemente de la difusión de los sustratos y del oxígeno en el medio de cultivo, además, a medida que crece el microorganismo la viscosidad del medio va aumentando, lo que dificulta la difusión tanto de los nutrientes como del oxígeno, dificultando por lo tanto la asimilación de nutrientes, y consecuentemente el crecimiento, ocasionando que la excreción de enzimas sea menor [Viniegra, 2003; Raimbault, 1998].

Como se observa en la Tabla-R.7, los mejores resultados se obtienen en el medio formulado con  $\text{HTCH}_{(-A/+A)}$  en FES donde la producción relativa de quitinasas es de  $527,40 \text{ UI L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , y  $873,98 \text{ UI L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , cuando se crece *T. harzianum* CEC-T24 sin aireación y con aireación, respectivamente. Estos resultados también ponen de manifiesto que el cultivo en el medio  $\text{HTCH}_A$  en FES produce 1,6 veces más cantidad de quitinasas que en FS, y de igual manera el cultivo en el medio  $\text{HTCH}_{+A}$  produce 2,3 veces más cantidad de quitinasas en FES que en FS; poniéndose de manifiesto que un mismo sustrato en diferentes tipos de cultivo (fermentaciones) puede incrementar significativamente la producción enzimática, en este caso la actividad quitinasa, debido a una utilización más eficiente de los nutrientes.

En el caso de utilizar la HC como subproducto rico en quitina la producción de quitinasas también se ve influenciada por el tipo de fermentación: FS o FES, siendo esta mayor en FES que en FS, tanto sin aireación como con aireación. Al comparar la producción relativa en los medios formulados con HC<sub>+A</sub> con la obtenida al utilizar HTCH<sub>+A</sub>, en un mismo sistema de fermentación esta es mucho menor ( $180,82 \text{ UI L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y  $873,98 \text{ UI L}^{-1} \text{ día}^{-1}$  respectivamente, esto se debe a que la HC está constituido por una quitina más dura, resistente y más difícil de ser degradada, por lo que se necesitaría de otros procedimientos previos a la fermentación como es la desmineralización [**Bautista y col., 2001**].

Estos resultados ponen claramente de evidencia la ventaja de utilizar FES con HTCH<sub>+A</sub> como sustrato para la producción de quitinasas en un periodo relativamente corto (6 días). Además, al excretarse las enzimas al medio de cultivo, su recuperación, mediante simples lavados, y centrifugaciones es sencilla y barata, lo que facilita la pre-purificación de las enzimas y hace más eficiente y viable el procedimiento/proceso, como más adelante discutiremos con detalle.

#### **4.2.4 Análisis de la producción total (UI)**

Si bien, la producción relativa es importante, a la hora de la producción de una enzima de manera práctica o industrial, lo más importante es su producción total, es decir la cantidad de unidades producidas al cabo de un periodo de tiempo dado y para unos

volúmenes de cultivos empleados.

Aplicando este análisis a los distintos cultivos llevados a cabo en el presente estudio, en la Tabla-R8 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, salvo en el caso del medio F-Q/G<sub>-A</sub>, en todos los demás casos estudiados se obtiene una mayor producción total de quitinasa en los cultivos realizados mediante FES que en FS.

Así, en los medios formulados con F-Q/G se observa que cuando el cultivo se lleva a cabo sin aireación, es decir en el medio F-Q/G<sub>-A</sub> la producción de quitinasas, paradójicamente, es mayor en FS que en FES: 209,8 y 154,9 UI, respectivamente; es decir un 26,17% mayor en FS que en FES. Esto podría ser debido a que el crecimiento en velo, que tiene lugar en la FS sin aireación le permite una mejor toma de oxígeno a *T. harzianum* CEC-T24 que en FES donde el microorganismo crece tanto en superficie como en el interior del sustrato, además en FS la toma de nutrientes también está favorecida al encontrarse una parte importante de estos disueltos en el medio de cultivo.

En el caso de F-Q/G<sub>+A</sub> es decir cuando el mismo cultivo se lleva a cabo con aireación la producción de quitinasas es un 8,89% mayor en FES que en FS.

**Tabla-R.8.** Producción total de quitinasas obtenidas en FS y FES tras 6 días de fermentación.

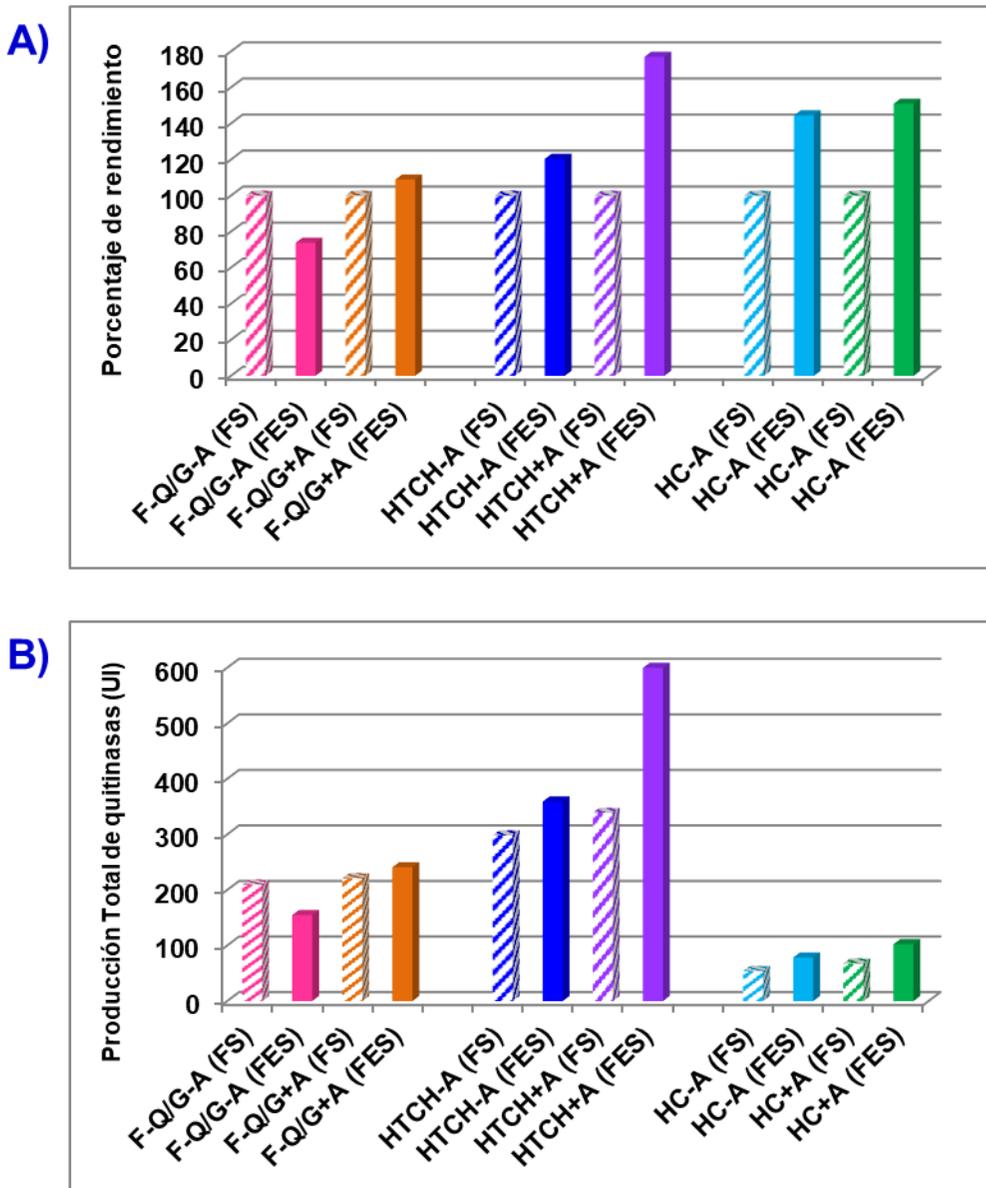
MC	SF	Tipo de Extracción	Volumen (L)	UI/L/Día	Día	UI	%
F-Q/G-A	FS	Sobrenadante	0,145	241,10	6	<b>209,8</b>	<b>100</b>
F-Q/G-A	FES	Extracción 1	0,068	256,17	6	104,5	<b>73,83</b>
		Extracción 2	0,047	178,50	6	50,3	
		Total Extracción					
F-Q/G-A	FS	Sobrenadante	0,144	256,17	6	<b>221,3</b>	<b>100</b>
F-Q/G-A	FES	Extracción 1	0,067	421,92	6	169,6	<b>108,89</b>
		Extracción 2	0,048	247,90	6	71,4	
		Total Extracción					
HTCH-A	FS	Sobrenadante	0,15	331,51	6	<b>298,4</b>	<b>100</b>
HTCH-A	FES	Extracción 1	0,068	527,40	6	215,2	<b>120,40</b>
		Lavado 1	0,051	470,75	6	144,0	
		Total Extracción					
HTCH-A	FS	Sobrenadante	0,15	376,72	6	<b>339,0</b>	<b>100</b>
HTCH-A	FES	Extracción 1	0,069	873,98	6	361,8	<b>176,99</b>
		Lavado 1	0,05	794,23	6	238,3	
		Total Extracción					
HC-A	FS	Sobrenadante	0,15	60,27	6	<b>54,2</b>	<b>100</b>
HC-A	FES	Extracción 1	0,068	150,69	6	61,5	<b>144,53</b>
		Lavado 1	0,049	57,54	6	16,9	
		Total Extracción					
HC-A	FS	Sobrenadante	0,15	75,34	6	<b>67,8</b>	<b>100</b>
HC-A	FES	Extracción 1	0,067	180,82	6	72,7	<b>150,95</b>
		Lavado 1	0,047	105,20	6	29,7	
		Total Extracción					

MC: Medio de cultivo; SC: Sistema de cultivo; %: Porcentaje. Los resultados son valores medios  $\pm$  SD de tres experimentos.

Sin embargo, en los medios formulados con HTCH, tanto en los cultivos sin aireación como en los cultivos con aireación la producción de quitinasa mediante FES es significativamente mayor que en FS: 359,2 y 298,4 UI respectivamente para los cultivos en un medio formulado con HTCH-A y 600,1 y 339 UI, respectivamente, para los cultivos en un medio formulado con HTCH+A, es decir, en este caso se obtiene un 20,40% más en las FES sin aireación y un 76,99% más en el caso de la FES con aireación.

Resultados análogos se obtuvieron para los cultivos en medios formulados con HC, si bien los valores de producción de quitinasas son significativamente menores que los obtenidos en los cultivos formulados con HTCH (ver Figura-R.6). Probablemente, esto sea debido a que cuando *T. harzianum* CEC-T24 crece en un medio formulado con HTCH o F-Q/G la utilización de la fuente carbonada es más eficiente, ya que la quitina de la HTCH y F-Q/G presenta una estructura mucho menos cristalina y con más zonas amorfas fácilmente atacable por las quitinasas producidas por *T. harzianum* CEC-T24 en el medio de cultivo, que la quitina presente en la HC.

El análisis conjunto de estos resultados se muestra de manera resumida en la siguiente Figura-R7.



**Figura R.7.** Producción de quitinasa en diferentes medios formulados con sustratos ricos en quitina (F-G/Q, HTCH y HC) mediante FS y FES con y sin aireación. [A) Análisis porcentual. B) Análisis por producción total (UI)].

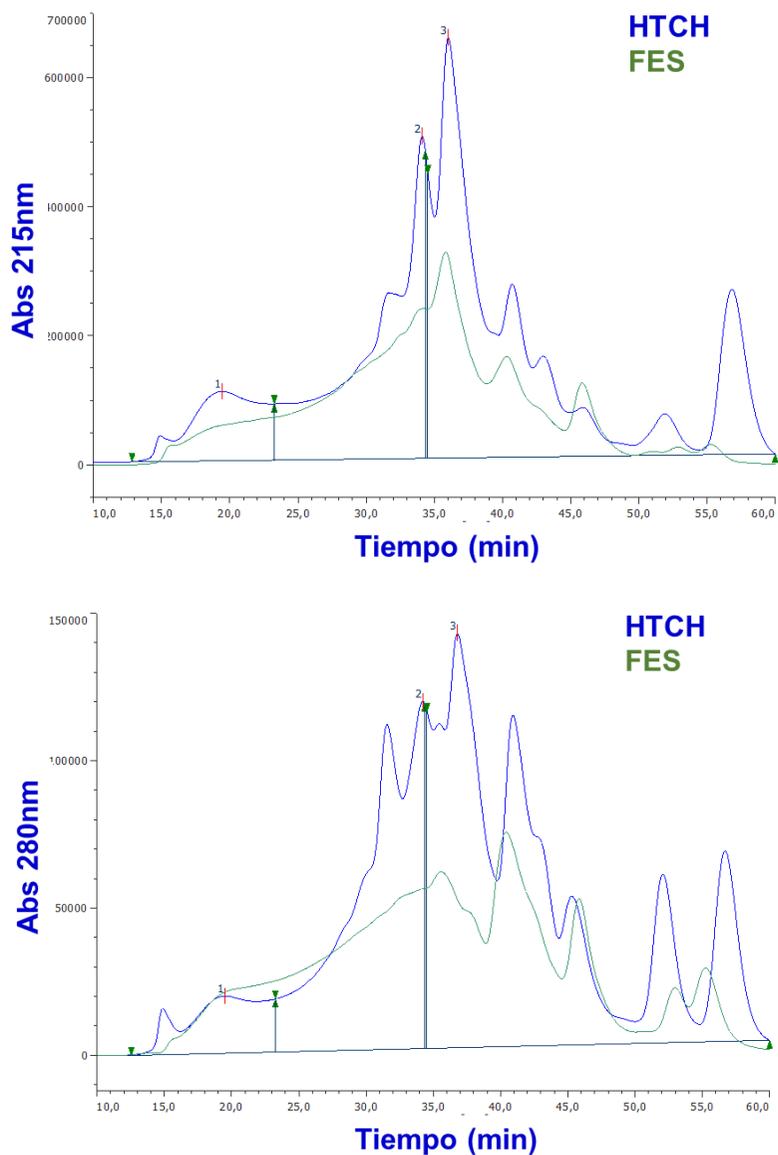
A partir de estos resultados, como puede verse de los datos expuestos en la Tabla-R.8 y resumidos en la Figura-R.7, se puede concluir que el mejor medio de fermentación para la producción industrial de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 es el formulado con HTCH<sub>+A</sub> cultivado en FES. Estos resultados también ponen de manifiesto que la mayor producción de quitinasa, en cantidad, tiene lugar en los medios formulados con HTCH, seguido de los medios formulados con F-Q/G, que deriva de la HTCH, y donde la producción es más baja es en los medios formulados con HC. Una posible explicación a este hecho es, que como ya hemos indicado anteriormente, que la quitina de la HC, al no estar probablemente completamente desmineralizada y a que presenta una estructura más cristalina, sea más difícil de atacar por las quitinasas secretadas al medio por *T. harzianum* CEC-T24, y por tanto se liberen menos moléculas de azúcares fermentables (N-acetil-glucosamina y/o glucosamina), utilizables como fuente de C por el microorganismo. Además, tanto en la HTCH como en la F-Q/G al poseer estas fuentes glucanos y *T. harzianum* CEC-T24 además de secretar quitinasas al medio secreta también glucanasas, como más adelante discutiremos, la liberación de azúcares utilizables como fuente de C, en estos medios, es bastante mayor y por tanto el crecimiento y la producción, ya que ambos fenómenos van parejos, al menos durante la fase de crecimiento exponencial.

### 4.3 Aproximación al secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios ricos en quitina

Una vez establecida la FES con aireación como mejor sistema para la producción de quitinasas por *T. harzianum* CEC-T24 en un medio formulado con un sustrato rico en quitina, la HTCH, el paso siguiente fue estudiar el patrón de proteínas secretadas al medio por dicho microorganismo, es decir, aproximarnos al secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 en dicho medio. Para lo que en una primera aproximación se realizó un estudio cromatográfico y otro electroforético en geles de PAGE-SDS, con el fin de obtener información sobre el perfil proteico del caldo de fermentación libre de células.

#### 4.3.1 Análisis cromatográfico

Para indagar si *T. harzianum* CEC-T24 consumía eficientemente las proteínas del medio, se realizó un estudio cromatográfico, mediante cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, del caldo fermentación inicial (0 días) y tras 6 días de cultivo (Figura-R.8).



**Figura R.8.** Perfil proteico del caldo de cultivo antes de inocular (línea azul 0 días) y del caldo de cultivo tras 6 días de crecimiento de *T. harzianum* CEC-T24 en FES (línea verde).

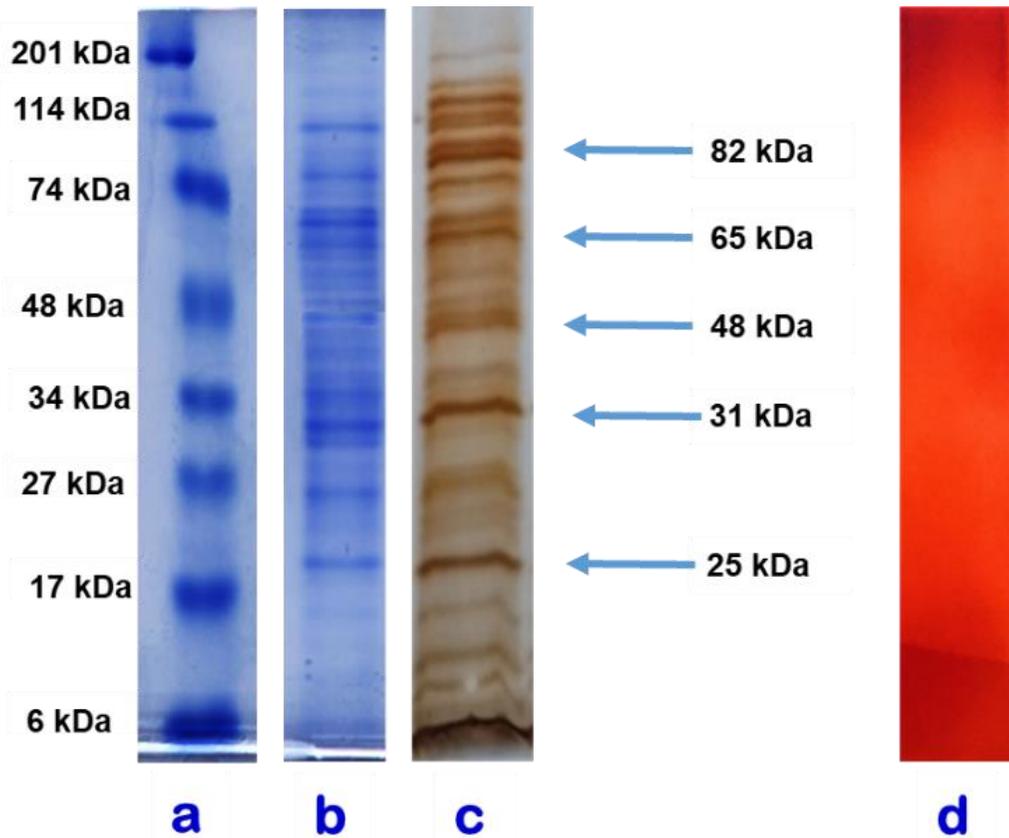
El análisis de las proteínas por cromatografía de exclusión o filtración en gel pone claramente de manifiesto que las proteínas

correspondientes a la HTCH se han consumido durante el crecimiento de *T. harzianum* CEC-T24 cuando se crece en FES, ya que el perfil proteico del caldo de cultivo a los 6 días de crecimiento es totalmente diferente al de la HTCH (ver Figura-R.8). Lo que nos indica que el microorganismo está utilizando esta fuente de N para su metabolismo.

#### 4.3.2. Análisis electroforético

El estudio de los caldos de fermentación libres de células, con el fin de estudiar el tipo de proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 al medio, se ha llevado a cabo por PAGE-SDS. En la Figura-R.9 se muestra un gel correspondiente al análisis electroforético realizado mediante PAGE-SDS, donde se observan las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 en el medio de cultivo rico en quitina (HTCH), tras seis días de cultivo.

Como se observa en dicha figura, en el gel teñido con azul de Coomassie, se distinguen claramente un importante número de bandas (más de 25 bandas), mientras que en el gel teñido con plata se detectan un número de bandas mayor, lo que no es de sorprender ya que la tinción de plata es unas 10 veces más sensible que la de azul de Coomassie. Cuando estos geles se tiñen por actividad (zimograma) se detectan cinco bandas, con masa molecular 82, 65, 48, 31 y 25 kDa, con actividad quitinasa, lo que podrían corresponder a quitinasas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 al medio.



**Figura R.9.** Separación electroforética por PAGE-SDS de proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en un medio de cultivo formulado HTCH. [**a:** marcadores; **b:** tinción con azul de Coomassie; **c:** tinción de plata y **d:** tinción de la actividad (zimograma)]. Marcadores de peso molecular: miosina 201 kDa,  $\beta$  galactosidasa 114 kDa, Albúmina de suero bovino 74 kDa, ovoalbúmina 48 kDa, Anhidrasa carbónica 34 kDa, inhibidor de la tripsina de soja 27 kDa, lisozima 17 kDa, Aprotinina 6 kDa.

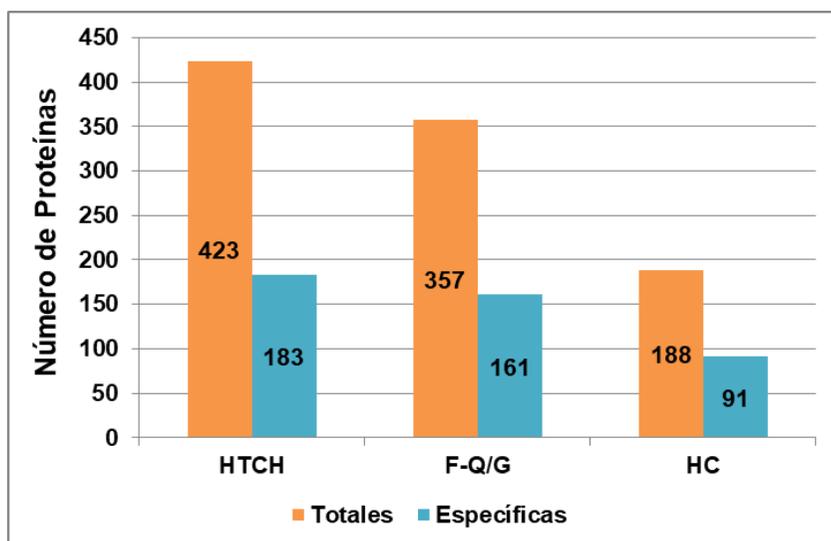
Sin embargo, esto no quiere decir que este sea el número total de enzimas y/o proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24, ya que en el medio de cultivo además de las proteínas y enzimas secretadas por el

microorganismo también están presente las proteínas del medio de cultivo no digeridas por el microorganismo durante su crecimiento. Además, en una banda de una electroforesis PAGE-SDS no hay una única proteína sino que puede haber varias, pudiendo en algunos casos haber más de 100 proteínas o péptidos diferentes de pesos moleculares muy próximos [Fröhlich y Arnold, 2006]. Por otro lado la tinción con azul de Coomassie únicamente detecta proteínas en el gel si estas están en cantidades del orden del microgramo y la tinción con plata, unas 10 veces más sensible que la tinción de azul de Coomassie, únicamente detecta proteínas en el gel si estas están en cantidades del orden de 0,1 µg. Por lo que proteínas presentes en cantidades más bajas no son detectadas en el gel por estas tinciones. Para detectar estas proteínas y/o enzimas presentes a concentraciones muy bajas es necesario utilizar técnicas más sensibles, sobre todo aquellas basadas en la espectrometría de masas. Por ello, basándonos en la disponibilidad de técnicas proteómicas altamente sensibles, una vez separadas las proteínas por electroforesis en PAGE-SDS, se llevó a cabo un análisis proteómico de dichos geles tras su digestión triptica *in gel*, como más adelante discutiremos.

#### 4.3.3. Análisis proteómico

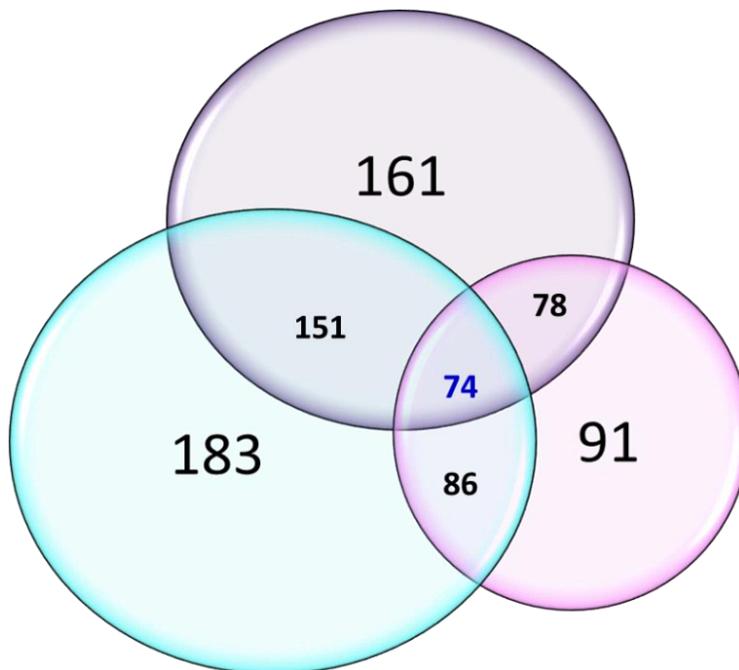
Separadas las proteínas, secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 al medio, por PAGE-SDS, los carriles se cortaron longitudinalmente y seguidamente cada carril se fraccionó en tres partes, sometiendo cada una de las fracciones a una digestión *in gel* con tripsina [Shevchenko y

**col., 2006]**, tal y como se describe detalladamente en el correspondiente apartado de Materiales y Métodos. Las muestras digeridas, una vez eliminadas las sales y componentes no deseables, se sometieron a un análisis proteómico mediante la técnica de nLC-MS/MS; análisis llevado a cabo en el Gene Center, de la Universidad Ludwig Maximilian Universität, de Munich (Alemania), y en la Unidad de Proteómica de la Universidad de Córdoba; si bien los resultados han sido analizados e interpretados por nosotros. De esta manera se han identificado 183 proteínas específicas de *T. harzianum* CEC-T24 cuando se crece en un medio formulado con HTCH, 161 proteínas cuando se crece en un medio formulado con F-Q/G y 91 proteínas cuando el cultivo se lleva a cabo en un medio formulado con HC o quitina coloidal de crustáceo [Urbina-Salazar y **col., 2018]** (ver Tabla-R.10,-R.11 y –R.12).



**Figura R.10.** Número de proteínas (totales y específicas de *T. harzianum* CEC-T24) detectadas por n-LC-MS/MS en el secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios formulados con HTCH, F-Q/G y HC.

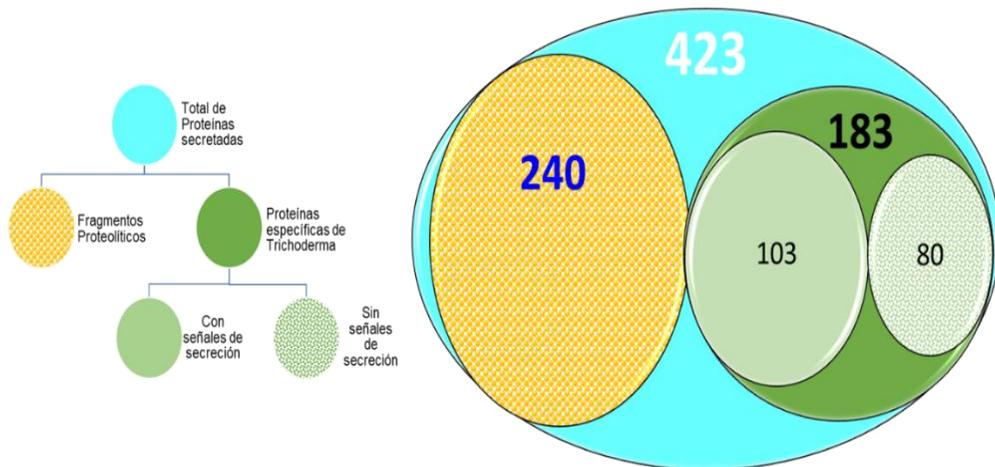
Esta diferencia en el número de proteínas podría deberse, a como ya hemos mencionado más arriba, a la presencia de glucanos en los medios formulados con HTCH y F-Q/G, que podrían inducir la producción de glucanasas en estos medios, mientras que en los medios formulados con HC o quitina coloidal de crustáceos los glucanos están ausentes. Y efectivamente el número de glucanasas detectadas en los medios formulados con HTCH y F-Q/G es mayor que el encontrado en los medios formulados con HC o quitina coloidal de crustáceos (ver Tabla-R.10,-R.11 y -R.12 y Figura-R.11).



**Figura R.11.** Número de proteínas específicas de *T. harzianum* CEC-T24 detectadas por n-LC-MS/MS en el secretoma de *T. harzianum* CEC-T24 crecido en medios formulados con HTCH, F-Q/G y HC.

Como se observa en la figura-R.11 existe un 43,89% de similitud entre las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 en los medios HTCH Y F-Q/G, y un porcentaje mas bajo (31,38%) cuando se compara las proteínas secretadas en HTCH y HC. De igual forma al comparar las proteínas en F-Q/G y HC se obtiene un 30,95%. Es decir como se observa el número de proteínas obtenidas en los medios HTCH y F-Q/G es mayor que en HC, debido a que estas tienen en común la presencia de glucanos lo que induce a la mayor producción de glucohidrolasas secretadas al medio. Mientras que al comparar entre los tres medios de fermentación (HTCH, F-Q/G y HC) el porcentaje de similitud es mínima (17,01%).

En el análisis por nLC-MS/MS de las proteínas secretadas en el medio formulado con HTCH se identificaron un total 423 proteínas en el sobrenadante, 183 proteínas específicas de *Trichoderma* (Tabla-R.10 y Figura-R.12) y el resto (240 proteínas) correspondientes a fragmentos proteolíticos de las proteínas específicas, probablemente generadas por la secreción de proteasas y peptidasas en el medio de cultivo, así como a proteínas propias del medio de cultivo y contaminaciones medioambientales (fundamentalmente queratinas). Dentro de las 183 proteínas específicas de *Trichoderma* (secretoma) se identificaron 103 proteínas (56,3% del total de proteínas detectadas) con señales de secreción dependientes de Sec N-terminal. Las restantes 80 proteínas, correspondiente al 43,7% de las proteínas secretadas, carecían de señales de secreción que indican una posible lisis celular, muerte celular o mecanismos secretores no clásicos.



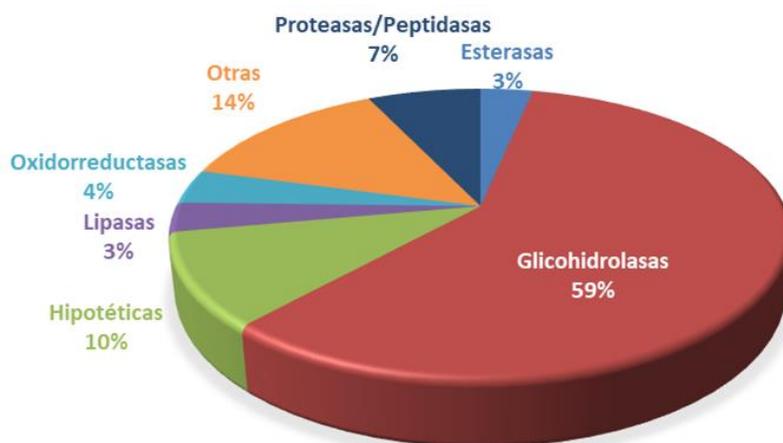
**Figura R.12.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HTCH.

**Tabla R.9.** Número de Proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 con actividad hidrolítica.

Actividad hidrolítica	HTCH	F-Q/G	HC
Total proteínas secretadas	<b>183</b>	<b>161</b>	<b>91</b>
Glicohidrolasas	107	98	54
Lipasas	6	3	2
Proteasas/Peptidasas	13	7	4
<b>Número de proteínas con actividad hidrolítica</b>	126	108	60
<b>% Proteínas de proteínas con actividad hidrolítica</b>	68,8	67,08	65,93
<b>Número de Glicohidrolasas</b>	107	98	54
<b>% Glicohidrolasas</b>	84,92	90,74	90

Las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 en **HTCH** se agruparon de acuerdo con su función biológica (Fig-R.13), se identificaron 126 proteínas (68,8% de las proteínas secretadas totales) con actividad hidrolítica, el 84,9% de ellas con actividad glucolítica

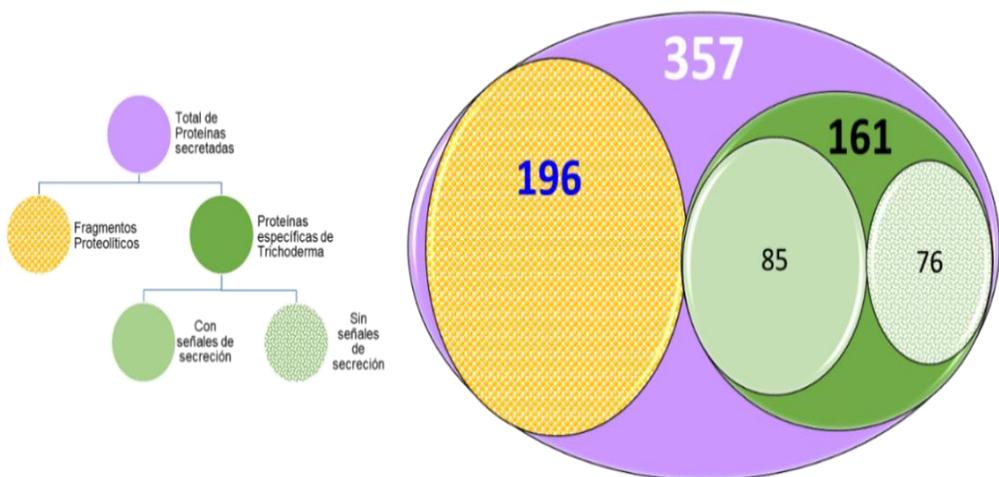
(celulasa, hemicelulasa, glucanasa, quitinasa, pectinasas y enzimas degradadas del almidón) relevantes para la degradación de celulosa, hemicelulosa, glucano y quitina.



**Figura R.13.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HTCH clasificadas según su función biológica.

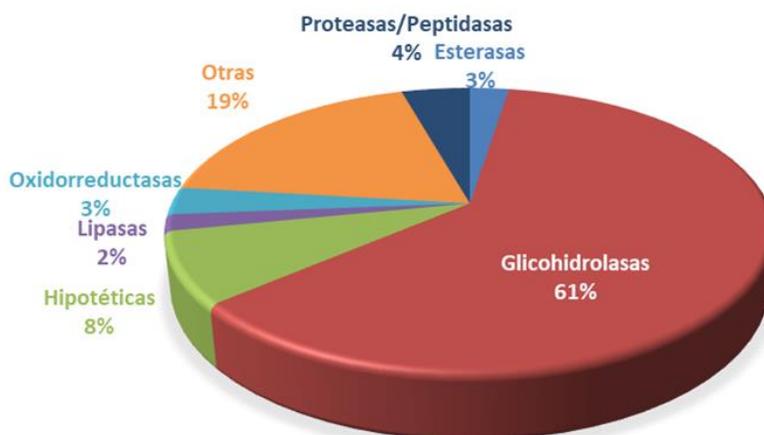
El estudio de las proteínas secretadas en el medio formulado con F-Q/G permite la identificación de un total 357 proteínas en el sobrenadante, 161 proteínas específicas de *Trichoderma* (Tabla-R.11 y Figura-R.14) y el resto (196 proteínas) correspondientes a fragmentos proteolíticos de las proteínas específicas, probablemente generadas por la secreción de proteasas y peptidasas en el medio de cultivo, así como a proteínas propias del medio de cultivo y contaminaciones medioambientales (fundamentalmente queratinas). Dentro del secretoma, específico de *T. harzianum* CEC-T24, se identificaron 85 proteínas (52.8% del total de proteínas detectadas) con señales de secreción dependientes de Sec N-terminal, correspondientes a *T.*

*harzianum* CEC-T24. El 47,2% de las proteínas secretadas (76 proteínas) carecían de señales de secreción que indican una posible lisis celular, muerte celular o mecanismos secretores no clásicos.



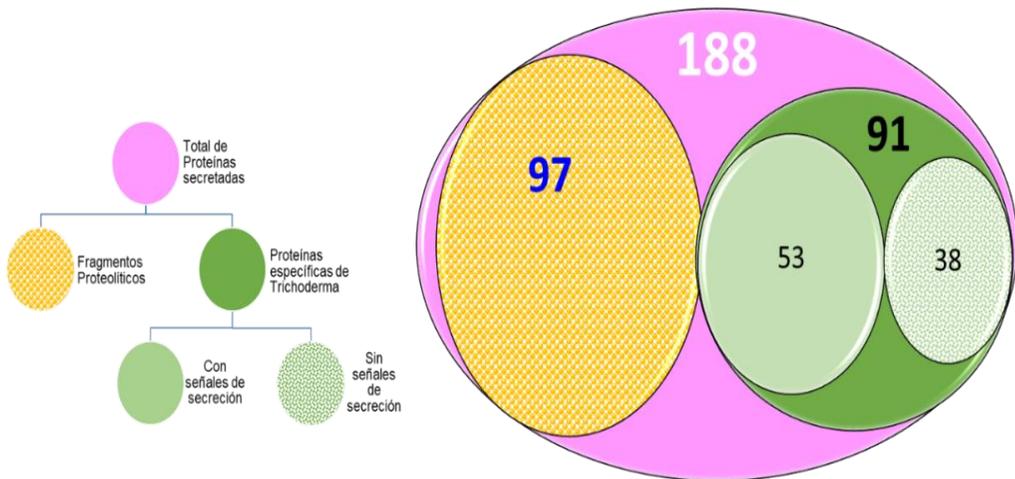
**Figura R.14.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con F-Q/G.

Las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 en **F-Q/G** se agruparon de acuerdo con su función biológica (Fig-R.15), se identificaron 108 proteínas (67,08% de las proteínas secretadas totales) con actividad hidrolítica, el 90,74% de ellas con actividad glucolítica (celulasa, hemicelulasa, glucanasa, quitinasa, pectinasas y enzimas degradadas del almidón) relevantes para la degradación de celulosa, hemicelulosa, glucano y quitina.



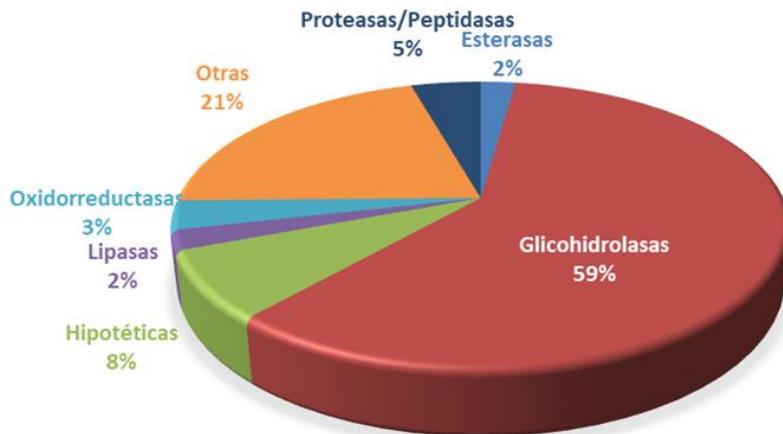
**Figura R.15.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con F-Q/G clasificadas según su función biológica.

Cuando se estudiaron las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en un medio formulado con HC se identificó un total de 188 proteínas en el sobrenadante, de las que 91 proteínas eran específicas de *Trichoderma* (Tabla-R.12 y Figura-R.16) y el resto (97 proteínas) correspondían a fragmentos proteolíticos de las proteínas específicas, probablemente generados por la secreción de proteasas y peptidasas al medio de cultivo, así como a proteínas propias del medio de cultivo y contaminaciones medioambientales (fundamentalmente queratinas). Dentro del secretoma, específico de *T. harzianum* CEC-T24, se identificaron 53 proteínas (58.2% del total de proteínas detectadas) con señales de secreción dependientes de Sec N-terminal, correspondientes a *T. harzianum* CEC-T24. El 41,8% de las proteínas secretadas (38 proteínas) carecían de señales de secreción que indican una posible lisis celular, muerte celular o mecanismos secretorios no clásicos.



**Figura R.16.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HC.

Las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 en **HC** se agruparon de acuerdo con su función biológica (Fig-R.17), se identificaron 60 proteínas (65,93% de las proteínas secretadas totales) con actividad hidrolítica, el 90% de ellas con actividad glucolítica (celulasa, hemicelulasa, glucanasa, quitinasa, pectinasas y enzimas degradadas del almidón) relevantes para la degradación de celulosa, hemicelulosa, glucano y quitina.



**Figura R.17.** Número de proteínas secretadas en el medio formulado con HC clasificadas según su función biológica.

**Tabla R.10.** Proteínas específicas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en FES en un medio formulado con HTCH.

gi number	Protein name	Family
G9MLT2	Cutinase; Carbohydrate Esterase Family 5 protein	Carbohydrate Esterase
G9MW33	Esterase; Carbohydrate Esterase Family 16 protein	Carbohydrate Esterase
G9MJQ6	Esterase; Carbohydrate Esterase Family 4 protein	Carbohydrate Esterase
G9N0G0	Esterase; Carbohydrate Esterase Family 1 protein	Carbohydrate Esterase
G9N3Y9	Acetyl xylan esterase; Carbohydrate Esterase Family 5 protein	Carbohydrate Esterase
G9MMP9	Pectinesterase; Carbohydrate Esterase Family 8 protein	Carbohydrate Esterase
G9MYG2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MIE9	$\beta$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N962	NAG1; Glycoside Hydrolase Family 20 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NAU7	candidate $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4L5	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 24 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUY4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N118	$\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 30 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N451	endo -1,4- $\beta$ -glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM35	chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCT3	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZE3	endo-1,3- $\beta$ -glucanase ; Glycoside Hydrolase Family 81 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NBU7	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 75 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRV6	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MWQ7	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MFN2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MSH8	$\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8J2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 75 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MF62	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MGP3	chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQD4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 25 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVG5	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9ML80	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCD8	$\beta$ -1,3-exoglucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRP4	$\alpha$ -amylase; Glycoside Hydrolase Family 13 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM76	glucoamylase; Glycoside Hydrolase Family 15 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4F2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQS0	$\alpha$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 31 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4W6	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 28 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWB3	candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N0T9	CHT1.1; candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXZ5	NAG2; candidate N-acetylglucosaminidase; Glycoside Hydrolase Family 20 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MR60	$\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N5J3	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZY7	candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8G8	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCJ4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXF0	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZT6	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 12 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MFK5	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MYA5	$\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein (not annotated by verena)	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N0U8	$\beta$ -1,3-exoglucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MLE1	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXG9	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 64 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQ83	candidate $\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MNF6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ53	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N0W8	candidate $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MS92	candidate $\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MX26	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 39 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWV6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4X2	candidate $\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVK7	candidate $\alpha$ -1,2-mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 47 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N047	candidate $\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 30 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRB7	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ65	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase B; Glycoside Hydrolase Family 54 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N1C8	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MK64	candidate $\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZV2	exo- $\beta$ -D-glucosaminidase ; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY26	candidate cellobiohydrolase; Glycoside Hydrolase Family 7 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV70	candidate glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 93 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ09	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MSS0	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 76 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N9E3	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MS91	candidate $\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MX73	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 64 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MHW8	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9ML76	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MLE5	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 79 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MMQ0	candidate $\beta$ -mannanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N9X8	candidate xylanase; Glycoside Hydrolase Family 11 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8R7	CHT1.2; candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MJ83	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 76 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N171	candidate b-1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MJY8	xylanase; Glycoside Hydrolase Family 11 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N168;REV__G9 MGP3	$\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVW6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 95 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MFS8	candidate endo-1,4-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWQ6	candidate endo- $\beta$ -1,6-galactanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein; C-type lectin	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUM1;G9NCA9	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUN0	cellobiohydrolase; Glycoside Hydrolase Family 6 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N626	$\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MGZ6	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N7Q9	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4S9	xyloglucanase; Glycoside Hydrolase Family 74 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NBD2	xylanase; Glycoside Hydrolase Family 10 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MQX4	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV09	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase; Glycoside Hydrolase Family 54 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MSH9	$\beta$ -xylosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N147	$\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 36 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUP6	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV83	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase; Glycoside Hydrolase Family 62 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ60	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MK43	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MU59	TVC6; candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N714	candidate $\beta$ -galactosidase/ galacto- $\beta$ -D-galactanase; Glycoside Hydrolase Family 35 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4X9	candidate endo-1,4-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N2S7	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY65	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase; Glycoside Hydrolase Family 62 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MT58	candidate endoglucanase; Glycoside Hydrolase Family 12 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MX23	polygalacturonase; Glycoside Hydrolase Family 28 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV41	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM38	Glycosyl hydrolase catalytic core; This family is probably a glycosyl hydrolase	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWB0	Glycosyl hydrolase catalytic core	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8M5	Glycoside Hydrolase superfamily	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY63	candidate $\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MF19	Glycosyl hydrolase catalytic core	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NB68	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQD2	336aa; 11cys; hypothetical	hypothetical

G9MPV7	982aa; hypothetical	hypothetical
G9MSJ3	314aa; 3cys; hypothetical	hypothetical
G9MEP9	392aa; hypothetical	hypothetical
G9N2F3	782aa; hypothetical	hypothetical
G9MMP1	548aa; contains WSC domain; hypothetical	hypothetical
G9MQ14	409aa hypothetical	hypothetical
G9MTV2	Ycil-like protein; Dimeric alpha+beta barrel superfamily	hypothetical
G9MKR4	236aa hypothetical	hypothetical
G9MKY0	719aa; hypothetical	hypothetical
G9N3V6	226aa; no cys; hypothetical	hypothetical
G9N1K1	207aa; 2cys; hypothetical	hypothetical
G9MSU0	277aa hypothetical	hypothetical
G9N0W0	292aa; hypothetical	hypothetical
G9MFM3	227aa; 2cys; Family 9 carbohydrate-binding modules (CBM9)	hypothetical
G9NA60	298aa hypothetical	hypothetical
G9MWA9	Hypothetical	hypothetical
G9N553	474aa ; hypothetical	hypothetical
G9MI01	164aa; 6cys	hypothetical
G9MU60	Secretory Lipase	Lipase
G9N0P8	Patatin-like phospholipase	Lipase
G9MFB0	Putative phospholipase C; putative phospholipase C	Lipase
G9MUE2	putative Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C	Lipase
G9MGZ5	Predicted lipase	Lipase
G9MNR4	Lipase; Alpha/beta hydrolase	Lipase
G9N475	Manganese and iron superoxide dismutase	Oxidoreductase

G9MLB5	Soluble quinoprotein glucose dehydrogenase	Oxidoreductase
G9N7N4	Superoxide dismutase, copper/zinc binding	Oxidoreductase
G9N3Y5	Haem peroxidase	Oxidoreductase
G9MV18	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	Oxidoreductase
G9NDF2	Putative Glyoxal oxidase	Oxidoreductase
G9MK38	FAD dependent oxidoreductase	Oxidoreductase
G9MKH2	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	Other
G9MNX1	Arylsulphatase	Other
G9NA55	S-adenosylmethionine synthetase	Other
G9MHR1	CHAP domain containing protein; This domain corresponds to an amidase function.	Other
G9MTV5	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, class-II; Aromatic-ring hydroxylase	Other
G9MNB2	putative endoribonuclease L-PSP	Other
G9N074	Protein-arginine deiminase (PAD)	Other
G9MMH1	FAD-binding-4 domain	Other
G9N5H1	Ribonuclease	Other
G9N2U2	laccase	Other
G9N456	FAD-binding-4 domain; Berberine/berberine-like	Other
G9N2D8	Ribonuclease T2	Other
G9N875	S-adenosylhomocysteine hydrolase	Other
G9MEP1	Amidase	Other
G9MFQ7	Cuperdoxin	Other
G9N380	Metallophosphoesterase	Other
G9N609	Tyrosinase	Other

G9MJN2	Putative glutaminase	Other
G9N109	Gamma-glutamyltransferase	Other
G9NAA9	Phosphoesterase	Other
G9MG46	contains sugar transporter domain; alpha/beta-Hydrolases superfamily	Other
G9N561	Carboxylesterase	Other
G9N7D3	acid phosphatase	Other
G9NBG3	flavin containing polyamine oxidase, putative	Other
G9N7T0	Metallophosphoesterase	Other
G9MFM5	Peptidase S28	proteolysis and peptidolysis
G9MRS1	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	proteolysis and peptidolysis
G9MEQ7	Peptidase T2, asparaginase 2	proteolysis and peptidolysis
G9MES4	Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding site	proteolysis and peptidolysis
G9MNF3	Peptidase M14, carboxypeptidase A	proteolysis and peptidolysis
G9MWZ0	Peptidase aspartic, active site; Peptidase A1, pepsin	proteolysis and peptidolysis
G9MY25	Peptidase G1, eqolisin	proteolysis and peptidolysis
G9NBQ3	Peptidase M20	proteolysis and peptidolysis
G9NBT0	Peptidase S53, propeptide	proteolysis and peptidolysis
G9MX31	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	proteolysis and peptidolysis
G9ML58	Peptidase G1, eqolisin	proteolysis and peptidolysis
G9MS88	Peptidase aspartic	proteolysis and peptidolysis
G9NBG4	Peptidase S28	proteolysis and peptidolysis

**Tabla R.11.** Proteínas específicas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en FES en un medio formulado con F-Q/G.

gi number	Protein name	Family
G9MLT2	Cutinase; Carbohydrate Esterase Family 5 protein	Carbohydrate Esterase
G9MW33	Esterase; Carbohydrate Esterase Family 16 protein	Carbohydrate Esterase
G9N0G0	Esterase; Carbohydrate Esterase Family 1 protein	Carbohydrate Esterase
G9N3Y9	Acetyl xylan esterase; Carbohydrate Esterase Family 5 protein	Carbohydrate Esterase
G9MYG2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MIE9	$\beta$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N962	NAG1; candidate N-acetylglucosaminidase; Glycoside Hydrolase Family 20 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4L5	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 24 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUY4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N118	$\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 30 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N451	endo-1,4- $\beta$ -glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM35	chitinase; CHT2; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCT3	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZE3	endo-1,3- $\beta$ -glucanase ; Glycoside Hydrolase Family 81 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NBU7	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 75 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRV6	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWQ7	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MFN2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MF62	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MGP3	chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQD4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 25 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVG5	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9ML80	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCD8	$\beta$ -1,3-exoglucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRP4	$\alpha$ -amylase; Glycoside Hydrolase Family 13 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM76	glucoamylase; Glycoside Hydrolase Family 15 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4F2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWB3	candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N0T9	CHT1.1; candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXZ5	NAG2; Glycoside Hydrolase Family 20 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MR60	$\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N5J3	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZY7	candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8G8	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCJ4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXF0	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZT6	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 12 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MLE1	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXG9	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 64 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQ83	candidate $\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MNF6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ53	candidate $\alpha$ -glycosidase ; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N0W8	candidate $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MS92	candidate $\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MX26	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 39 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWV6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4X2	candidate $\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVK7	candidate $\alpha$ -1,2-mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 47 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRB7	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ65	Alpha-L-arabinofuranosidase B; Glycoside Hydrolase Family 54 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N1C8	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MK64	candidate $\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZV2	exo- $\beta$ -D-glucosaminidase ; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY26	candidate cellobiohydrolase; Glycoside Hydrolase Family 7 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV70	candidate glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 93 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ09	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MSS0	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 76 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N9E3	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MS91	candidate $\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MX73	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 64 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MHW8	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9ML76	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MLE5	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 79 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MMQ0	candidate $\beta$ -mannanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N9X8	candidate xylanase; Glycoside Hydrolase Family 11 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8R7	CHT1.2; candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MJ83	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 76 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9N171	candidate $\beta$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MJY8	xylanase; Glycoside Hydrolase Family 11 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVV6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 95 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MFS8	candidate endo-1,4-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWQ6	candidate endo- $\beta$ -1,6-galactanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein; C-type lectin	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUN0	cellobiohydrolase; Glycoside Hydrolase Family 6 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N626	$\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MGZ6	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N7Q9	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4S9	xyloglucanase; Glycoside Hydrolase Family 74 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NBD2	xylanase; Glycoside Hydrolase Family 10 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQX4	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV09	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase; Glycoside Hydrolase Family 54 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MSH9	$\beta$ -xylosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N147	$\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 36 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUP6	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV83	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase; Glycoside Hydrolase Family 62 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ60	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MK43	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MU59	TVC6; candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N714	candidate $\beta$ -galactosidase/ galacto- $\beta$ -D-galactanase; Glycoside Hydrolase Family 35 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4X9	candidate endo-1,4-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N2S7	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY65	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase; Glycoside Hydrolase Family 62 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MT58	candidate endoglucanase; Glycoside Hydrolase Family 12 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MX23	polygalacturonase; Glycoside Hydrolase Family 28 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MV41	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM38	Glycosyl hydrolase catalytic core; This family is probably a glycosyl hydrolase	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWB0	Glycosyl hydrolase catalytic core	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8M5	Glycoside Hydrolase superfamily	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY63	candidate $\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MF19	Glycosyl hydrolase catalytic core	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NB68	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MGP3	$\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCA9	candidate b-glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQD2	336aa; 11cys; hypothetical	hypothetical
G9MPV7	982aa; hypothetical	hypothetical
G9MEP9	392aa; hypothetical	hypothetical
G9N2F3	782aa; hypothetical	hypothetical
G9MMP1	548aa; contains WSC domain; hypothetical	hypothetical
G9MQ14	409aa hypothetical	hypothetical
G9MTV2	Ycil-like protein; Dimeric alpha+beta barrel superfamily	hypothetical
G9MKR4	236aa hypothetical	hypothetical
G9MKY0	719aa; hypothetical	hypothetical
G9MSU0	277aa hypothetical	hypothetical
G9N0W0	292aa; hypothetical	hypothetical
G9MWA9	Hypothetical	hypothetical

G9N553	474aa ; hypothetical	hypothetical
G9N0P8	Patatin-like phospholipase	Lipase
G9MFB0	Putative phospholipase C; putative phospholipase C	Lipase
G9MUE2	putative Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C	Lipase
G9N475	Manganese and iron superoxide dismutase	Oxidoreductase
G9MLB5	Soluble quinoprotein glucose dehydrogenase	Oxidoreductase
G9N7N4	Superoxide dismutase, copper/zinc binding	Oxidoreductase
G9N3Y5	Haem peroxidase	Oxidoreductase
G9MK38	FAD dependent oxidoreductase	Oxidoreductase
G9MKH2	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	Other
G9MNX1	Arylsulphatase	Other
G9NA55	S-adenosylmethionine synthetase	Other
G9MHR1	CHAP domain containing protein; This domain corresponds to an amidase function.	Other
G9MTV5	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, class-II; Aromatic-ring hydroxylase	Other
G9MNB2	putative endoribonuclease L-PSP	Other
G9N074	Protein-arginine deiminase (PAD)	Other
G9MMH1	FAD-binding-4 domain	Other
G9N5H1	Ribonuclease	Other
G9N2U2	Laccase	Other
G9N456	FAD-binding-4 domain; Berberine/berberine-like	Other
G9N2D8	Ribonuclease T2	Other
G9N875	S-adenosylhomocysteine hydrolase	Other
G9MEP1	Amidase	Other
G9MFQ7	Cuperdoxin	Other
G9N380	Metallophosphoesterase	Other

G9N609	Tyrosinase	Other
G9MJN2	Putative glutaminase	Other
G9N109	Gamma-glutamyltransferase	Other
G9NAA9	Phosphoesterase	Other
G9MG46	contains sugar transporter domain; alpha/beta-Hydrolases superfamily	Other
G9N561	Carboxylesterase	Other
G9N7D3	acid phosphatase	Other
G9NBG3	flavin containing polyamine oxidase, putative	Other
G9N7T0	Metallophosphoesterase	Other
G9N7D3	acid phosphatase	Other
G9MJC2	putative phosphoglycerate mutase family protein	Other
G9N551	FAD-binding-4 domain; Berberine/berberine-like	Other
G9MKI6	Putative isomerase YbhE	Other
G9MUI5	candidate polysaccharide lyase; Polysaccharide Lyase Family 7 protein	Other
G9N4F0	S1/R1 nuclease	Other
G9MFM5	Peptidase S28	proteolysis and peptidolysis
G9MEQ7	Peptidase T2, asparaginase 2	proteolysis and peptidolysis
G9MNF3	Peptidase M14, carboxypeptidase A	proteolysis and peptidolysis
G9MWZ0	Peptidase aspartic, active site; Peptidase A1, pepsin	proteolysis and peptidolysis
G9NBQ3	Peptidase M20	proteolysis and peptidolysis
G9N3S5	Peptidase aspartic	proteolysis and peptidolysis
G9MUE5	Peptidase aspartic, active site; Peptidase A1, pepsin	proteolysis and peptidolysis

**Tabla R.12.** Proteínas específicas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 crecido en FES en un medio formulado con HC.

gi number	Protein name	Family
G9N0G0	Esterase; Carbohydrate Esterase Family 1 protein	Carbohydrate Esterase
G9N3Y9	Acetyl xylan esterase; Carbohydrate Esterase Family 5 protein	Carbohydrate Esterase
G9MYG2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N962	NAG1; candidate N-acetylglucosaminidase; Glycoside Hydrolase Family 20 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUY4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N118	$\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 30 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N451	endo-1,4- $\beta$ -glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM35	chitinase; CHT2; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCT3	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZE3	endo-1,3- $\beta$ -glucanase ; Glycoside Hydrolase Family 81 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRV6	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MFN2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MF62	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MQD4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 25 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVG5	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9ML80	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCD8	$\beta$ -1,3-exoglucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MM76	glucoamylase; Glycoside Hydrolase Family 15 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4F2	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWB3	candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MR60	$\alpha$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9N8G8	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 17 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCJ4	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 16 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZT6	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 12 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MLE1	$\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MXG9	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 64 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ53	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N0W8	candidate $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MS92	candidate $\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MX26	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 39 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWV6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 71 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N4X2	candidate $\beta$ -1,6-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVK7	candidate $\alpha$ -1,2-mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 47 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MRB7	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZ65	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase B; Glycoside Hydrolase Family 54 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N1C8	$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase; Glycoside Hydrolase Family 72 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MK64	candidate $\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MZV2	exo- $\beta$ -D-glucosaminidase ; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MY26	candidate cellobiohydrolase; Glycoside Hydrolase Family 7 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9ML76	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 92 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MLE5	candidate $\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 79 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MMQ0	candidate $\beta$ -mannanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N9X8	candidate xylanase; Glycoside Hydrolase Family 11 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N8R7	CHT1.2; candidate chitinase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>

G9MJ83	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 76 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N171	candidate $\beta$ -1,3-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 55 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MJY8	xylanase; Glycoside Hydrolase Family 11 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MVW6	candidate $\alpha$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 95 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MFS8	candidate endo-1,4-glucanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MWQ6	candidate endo- $\beta$ -1,6-galactanase; Glycoside Hydrolase Family 5 protein; C-type lectin	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MUN0	cellobiohydrolase; Glycoside Hydrolase Family 6 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N626	$\alpha$ -galactosidase; Glycoside Hydrolase Family 27 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MGZ6	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9N7Q9	$\beta$ -glycosidase; Glycoside Hydrolase Family 18 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MGP3	$\beta$ -mannosidase; Glycoside Hydrolase Family 2 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9NCA9	candidate $\beta$ -glucosidase; Glycoside Hydrolase Family 3 protein	<a href="#">Glycoside Hydrolase</a>
G9MMP1	548aa; contains WSC domain; hypothetical	hypothetical
G9MQ14	409aa hypothetical	hypothetical
G9MTV2	Ycil-like protein; Dimeric alpha+beta barrel superfamily	hypothetical
G9MKY0	719aa; hypothetical	hypothetical
G9MSU0	277aa hypothetical	hypothetical
G9N0W0	292aa; hypothetical	hypothetical
G9MWA9	Hypothetical	hypothetical
G9N0P8	Patatin-like phospholipase	Lipase
G9MFB0	Putative phospholipase C; putative phospholipase C	Lipase
G9N475	Manganese and iron superoxide dismutase	Oxidoreductase
G9N7N4	Superoxide dismutase, copper/zinc binding	Oxidoreductase
G9N3Y5	Haem peroxidase	Oxidoreductase
G9MKH2	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	Other

G9MNX1	Arylsulphatase	Other
G9NA55	S-adenosylmethionine synthetase	Other
G9MNB2	putative endoribonuclease L-PSP	Other
G9N074	Protein-arginine deiminase (PAD)	Other
G9MMH1	FAD-binding-4 domain	Other
G9N5H1	Ribonuclease	Other
G9N2U2	Laccase	Other
G9N875	S-adenosylhomocysteine hydrolase	Other
G9MEP1	Amidase	Other
G9MFQ7	Cuperdoxin	Other
G9N380	Metallophosphoesterase	Other
G9N609	Tyrosinase	Other
G9MJN2	Putative glutaminase	Other
G9N109	Gamma-glutamyltransferase	Other
G9NAA9	Phosphoesterase	Other
G9N7D3	acid phosphatase	Other
G9MPP2	Alkaline ceramidase	Other
G9MJC2	putative phosphoglycerate mutase family protein	Other
G9MFM5	Peptidase S28	proteolysis and peptidolysis
G9MNF3	Peptidase M14, carboxypeptidase A	proteolysis and peptidolysis
G9NBQ3	Peptidaze M20	proteolysis and peptidolysis
G9N3S5	Peptidase aspartic	proteolysis and peptidolysis

Los resultados anteriores nos dan una idea del amplio panel de enzimas/proteínas que *T. harzianum* CEC- T24 secreta al medio de cultivo, y que el grupo de las hidrolasas es el mayoritario, por ello, además de la actividad quitinasa, se han medido también otras actividades de interés industrial.

### 4.4 Producción de hidrolasas

Como ya se analizó anteriormente la producción de quitinasa entre FS y FES, lo mismo ocurre para la producción de las otras enzimas, la producción de estas otras enzimas también se ve influenciada por el tipo de fermentación y el otro factor que es la aireación.

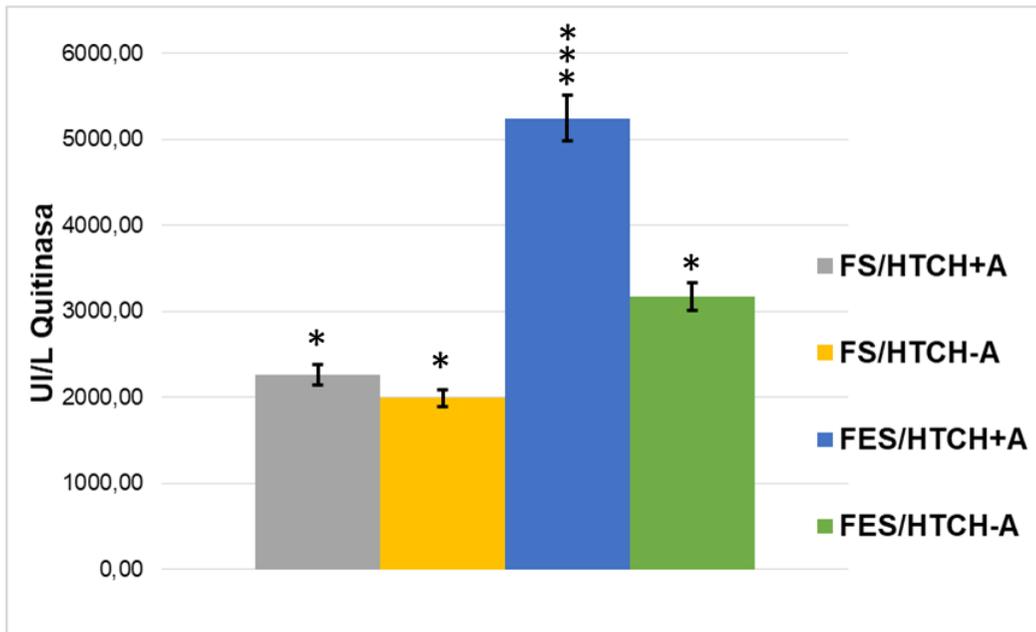
En la Tabla-R.13 se muestra los resultados de los análisis enzimáticos ensayados con los diferentes medios de fermentación.

La propiedad hidrolítica de las quitinasas la convierte en una alternativa atractiva como agente de control biológico seguro para el medio ambiente. Existe una variedad de casos en los que se utilizan organismos productores de quitinasa para inhibir el crecimiento de fitopatógenos [**Harman y col., 1993; Lorito y col., 1994**].

Además, la capacidad de la quitinasa para hidrolizar la quitina la hace muy útil para la producción de productos de valor agregado como edulcorantes, factores de crecimiento, proteínas de una sola célula, etc. [**Cosio y col., 1982; Sakai y col., 1991**].

**Tabla R.13.** Ensayo de actividades enzimáticas

	QUITINASA		CELULASA		XILANASA		PROTEASA	
	mg GlcNAc/mL	UI/L	mg Glucosa/mL	UI/L	mg Xilosa/mL	UI/L	muAbs	UI/L
<b>FS/HTCH+A</b>	15	2260,30	3,24	149,88	5,78	7693,33	90,50	36,20
<b>FS/HTCH-A</b>	13,2	1989,06	2,7	124,90	5,60	7460,20	82,00	32,80
<b>FES/HTCH+A</b>	34,8	5243,89	14,22	657,79	11,03	14687,27	352,50	141,00
<b>FES/HTCH-A</b>	21	3164,41	8,04	371,91	8,23	10957,17	245,00	98,00

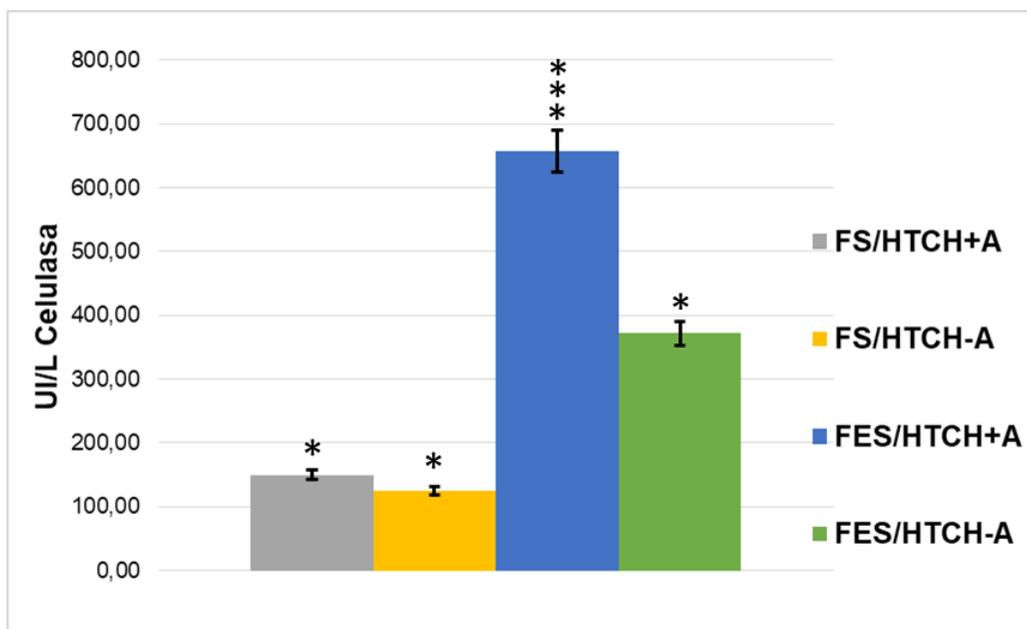


**Figura R.18.** Actividad quitinasa producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.

(P-valor, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  y \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

Como se observa en la Figura-R.18 la producción de quitinasas es mucho mayor en el medio HTCH<sub>+A</sub> utilizando la FES que en los otros medios de fermentación como ya se ha mencionado anteriormente.

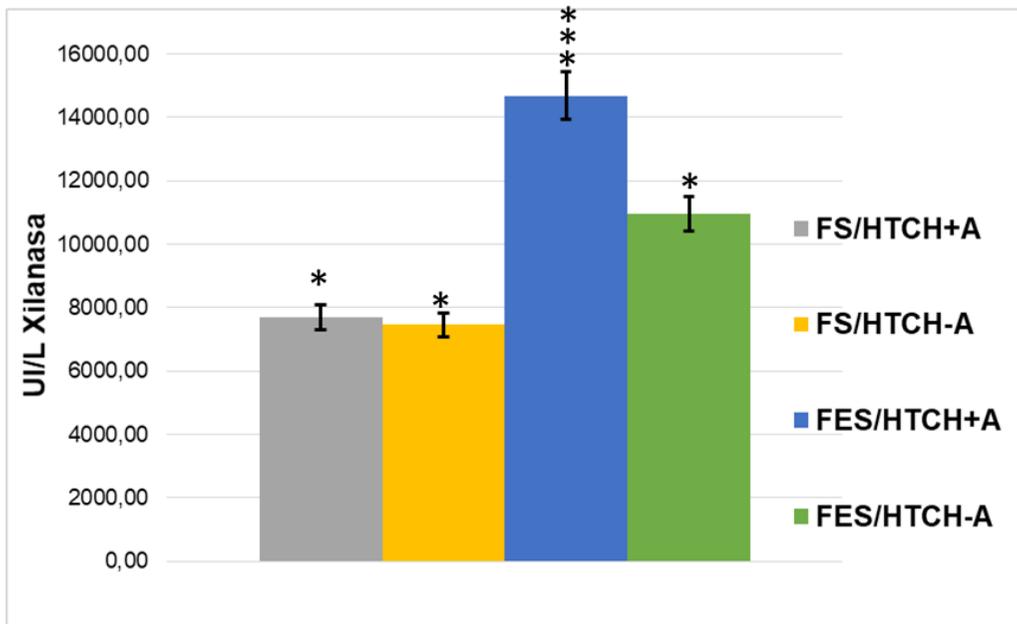
Como se puede observar la producción de celulasas (Figura-R.19) FES/HTCH<sub>+A</sub> es mucho mayor (657,79 UI/L) que en los otros medios de cultivo, el máximo de producción de esta enzima es al sexto día de fermentación, siendo estas enzimas de gran interés en la biorrefinería para producir biocombustibles y productos con un alto valor agregado.



**Figura R.19.** Actividad celulasa producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.  
(P-valor, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  y \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

Las xilanasas catalizan la ruptura de los enlaces xilosídicos internos de la molécula heteroxilana (xilano), un tipo de componente polisacárido de la hemicelulosa, un componente importante de la biomasa de la pared celular en los vegetales [Fang y col., 2012, Anthony y col., 2003]. Las enzimas que degradan el heteroxilano son las endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que rompen el esqueleto del xilano en oligosacáridos pequeños y las  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37), que a su vez las degradan a moléculas de xilosa [De Vries y Visser, 2001]. Las xilanasas se utilizan principalmente en procesos de clarificación de vinos, zumos y pulpas, y en procesos de biodegradación de papel [Krishna, 2005; Zhaoxin y col., 2008]. La producción máxima obtenida de esta enzima es de

14687,27 UI/L en el medio FES/HTCH<sub>A</sub> (Ver Figura-R.20).

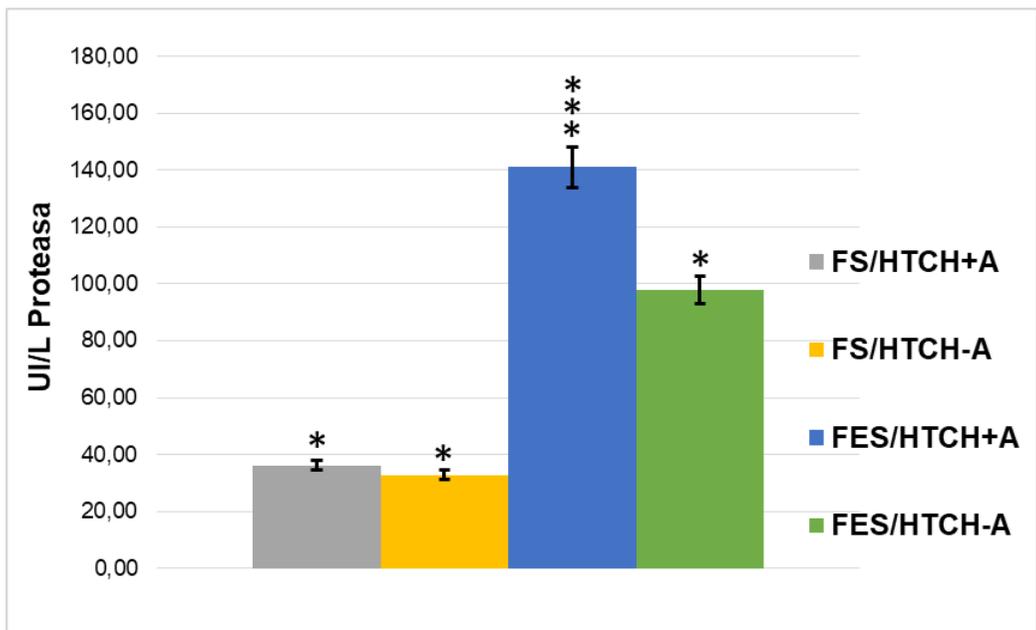


**Figura R.20.** Actividad xilanasas producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.

(P-valor, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  y \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

Las proteasas (EC 3.4.21-24 y 99) son enzimas hidrolíticas industrialmente útiles que dividen los enlaces peptídicos entre residuos y aminoácidos, es la enzima dominante en el mercado mundial, especialmente en la industria de los detergentes. La acción de las proteasas es fundamental durante el proceso de patogénesis de los hongos entomopatógenos, ya que rompen los enlaces entre la quitina y las proteínas, liberándola. Las proteasas son reprimidas por un sistema de regulación por inducción-represión que ajusta la velocidad de degradación de la cutícula de los insectos o en este caso la pared

celular de los hongos. Las quitinasas se expresan en sitios de degradación proteolítica, por lo que la producción de quitinasas depende de la accesibilidad del sustrato. La producción máxima obtenida de esta enzima es de 141,00 UI/L en el medio FES/HTCH<sub>+A</sub> (Ver Figura-R.21).



**Figura R.21.** Actividad proteasa producida en el medio HTCH utilizando FS y FES.

(P-valor, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  y \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

La producción de  $\beta$ -glucanasas, el otro grupo principal de enzimas involucradas en la degradación de las paredes miceliales del patógeno, también se induce en el medio de cultivo con HTCH como la principal fuente de carbono [Bautista, 2015].

Como se observa en la Tabla R.13, se analizan diferentes enzimas en cada medio de cultivo en el día 6 de fermentación, donde se puede

observar que *T. harzianum* CEC-T24 excreta la mayor cantidad de proteínas en el medio FES/HTCH+A, obteniendo 5243,89 UI /L de quitinasa, 657,79 UI /L de celulasa, 14687,27 UI /L de Xilanasa y 141,00 UI /L de proteasa,

El interés biotecnológico de las enzimas líticas (quitinasas,  $\beta$ -glucanasas y otras) se debe principalmente a sus aplicaciones potenciales en la industria farmacéutica, alimentaria y agronómica, y particularmente porque se pueden usar en el control biológico contra hongos fitopatógenos o para mejorar la actividad insecticida en el tratamiento de plagas. En consecuencia, la producción de estas enzimas en grandes cantidades a bajos costos es muy deseable.

Por lo general, estas enzimas se producen en presencia de sustratos específicos (quitina, glucanos, etc.) mediante mecanismos inductivos específicos. Por lo tanto, los estudios principales sobre la secreción de estas enzimas se han realizado utilizando micelio inactivado o paredes celulares de diferentes patógenos, como *Guignardia citricarpa*, *Pythium* sp., *Sclerotium rolfsii* o *Rhizoctonia solani* como sustratos específicos (fuente de carbono principal).

Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo utilizando sustratos baratos y abundantes, como subproductos agroindustriales ricos en quitina para mejorar la producción de estas enzimas líticas (quitinasas y glucanasas, etc.).

#### 4.5 Producción de quitinasas a escala semi-piloto.

La producción de quitinasas a escala semi-piloto se ha llevado a cabo en un reactor tipo tubular rotatorio con aproximadamente 1 Kg de HTCH adecuadamente humedecida, sin formación de fase acuosa detectable, con una humedad relativa del 99% - 100%, agitación suave de 60 rpm, y aireación constante (3 L/min). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla-R.14.

**Tabla R.14.** Producción y producción relativa de actividad quitinasa en un reactor tubular rotatorio a escala semi-piloto.

	UI/L día	UI/L
1er ensayo	3.766,18	22.597,06
2º ensayo	4.468,71	26.812,27
3er ensayo	3.902,75	23.416,52
<b>Valor medio</b>	<b>4.045,96±372,45</b>	<b>24.275,28±2234,97</b>
Ensayo en mataz	8,73,98	5.243,88

Como puede observarse de estos resultados, la producción en el reactor tipo tubular rotatorio incrementa la producción de actividad quitinasa en un factor de 4,63. Esto puede explicarse por el mayor control de parámetros como la humedad relativa, la agitación y sobre todo la aireación, que en el caso del cultivo en el reactor tipo tubular rotatorio son mucho más perfectos que en el cultivo en matraz con aireación. Todo ello contribuye a un mejor desarrollo de *T. harzianum* CEC-T24 en el medio de cultivo y por tanto de su producción.



# **= CONCLUSIONES =**



## 5. CONCLUSIONES

- ❖ Se ha estudiado la producción de quitinasas por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, *Trichoderma atroviride* CEC-T23 y *Trichoderma harzianum* CEC-T24 crecidos en diferentes medios de cultivo formulados con subproductos agroindustriales ricos en quitina procedentes de hongos comestibles (*Agaricus Bisporus*) y crustáceos (*Procambarus clarkii*) como fuente principal de carbono en un intento de producir estas enzimas de una manera económicamente viable, y darle un uso práctico a estos subproductos. Este trabajo es uno de los primeros, que aborda de manera sistemática la utilización de los subproductos ricos en quitina de la industria de los hongos y setas comestibles para obtener productos de alto valor añadido, diferentes de la quitina y el quitosano.
- ❖ Se ha preparado y caracterizado diferentes fuentes de fermentación a partir de subproductos industriales (harina de tallos de champiñón, HTCH, F-Q/G y harina de cangrejo, HC), para la producción de quitinasas por fermentación, ensayando dos sistemas diferentes de fermentación: Fermentación Sumergida (FS) y Fermentación en estado sólido (FES). *T. harzianum* CEC-T24 mostró la mayor productividad de quitinasa en comparación con los otros microorganismos ensayados, ( $873,98 \text{ UI L}^{-1}\text{día}^{-1}$ ) en el medio HTCH<sub>+A</sub> en Fermentación en estado sólido. Los mejores resultados se obtuvieron en dicho medio, en el que se puede observar que en el medio HTCH<sub>-A</sub> en FES produce 1,6 veces más cantidad de quitinasas que en FS, y de igual manera el cultivo en el medio HTCH<sub>+A</sub> produce

2,3 veces más cantidad de quitinasas en FES que en FS. Observándose que este sistema de fermentación incrementa significativamente la producción enzimática.

- ❖ Se determinó la producción de quitinasa mediante la medida de actividad y de proteína y el perfil de enzimas/proteínas secretadas al medio de cultivo, el análisis electroforético permitió la detección de 25 proteínas diferentes entre ellas cinco quitinasas con masas moleculares 82, 65, 48, 31 y 25 kDa, respectivamente, que fueron comprobadas mediante un zimograma.
- ❖ Se estudiaron las proteínas secretadas por *T. harzianum* CEC-T24 mediante técnicas proteómicas el número de enzimas/proteínas detectadas es mucho mayor en HTCH (183 proteínas específicas de *T. harzianum* CEC-T24), 161 proteínas específicas de *T. harzianum* CEC-T24 en medios formulados con F-Q/G y 91 proteínas específicas de *T. harzianum* CEC-T24 en medios formulados con HC.
- ❖ Además cuando se crece *T. harzianum* CEC-T24 en un reactor tipo tambor rotatorio, a escala semi-piloto (1 Kg de medio de cultivo), bien controlado, la productividad es 6,72 veces superior a la descrita para medios aireados en matraces.
- ❖ Estas enzimas tienen aplicaciones potenciales en la industria farmacéutica, alimentaria y agronómica donde podrían desempeñar un importante papel en biocontrol y tratamiento de enfermedades de

las plantas, debido a que no son tóxicas, son biodegradables y biocompatibles.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdul Manan M., Webb C., (2017). Modern Microbial Solid State Fermentation Technology for Future Biorefineries for the Production of Added-Value Products. *Biofuel Res. J.* 4:730–740.
2. Adrangi, S., & Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnology advances*, 31(8), 1786-1795. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.012
3. Adrangi, S., Faramarzi, M. A., Shahverdi, A. R., & Sepehrizadeh, Z. (2010). Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. *Carbohydrate research*, 345(3), 402-407. doi.org/10.1016/j.carres.2009.11.015
4. Adler-Nissen J (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
5. Al-Ahmadi, K. J., Yazdi, M. T., Najafi, M. F., Shahverdi, A. R., Faramarzi, M. A., Zarrini, G., & Behravan, J. (2008). Optimization of medium and cultivation conditions for chitinase production by the newly isolated: *Aeromonas* sp. *Biotechnology*, 7(2), 266-272. Doi: 10.3923 / biotech.2008.266.272
6. Alkan N., Fortes A.M., (2015). Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Front Plant Sci.* 20(6):889. doi: 10.3389/fpls.2015.00889.
7. Anthony, T., Chandra Raj, K., Rajendran, A., Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase - free xylanase from alkali - tolerant *Aspergillus fumigatus* AR 1. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 647-654.
8. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 13th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC,1995.
9. AOAC. 18th ed. Washington, D.C.: Official Methods of Analysis, 2006
10. Arrignon, J. (1985). *Cría del cangrejo de río*. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza. España. 201 pp. ISBN : 8420005533
11. Askolin, S., Nakari-Setälä, T., & Tenkanen, M. (2001). Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(1-2), 124-130. doi.org/10.1007/s002530100728
12. Atila, F., Owaid, M. N., & Shariati, M. A. (2017). The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(3), 281–286
13. Baranwal A., Kumar A., Priyadharshini A., Oggu G.S., Bhatnagar I., Srivastava A., Chandra P., (2018). Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int J Biol Macromol.* 110:110-123.
14. Barboza-Corona, J.E., Reyes-Rios, D.M., Salcedo-Hernández, R., Bideshi, D.K.: Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73)

- from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-73. *Mol. Biotechnol.* 39, 29-27 (2008). doi.org/10.1007/s12033-007-9025-4
15. Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annual Reviews in Microbiology*, 22(1), 87-108. doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.000511
  16. Bautista J.(2015). Preparacion de hidrolizados de paredes fungicas. Informe Biotechnic S.A
  17. Bautista J, Chico E, Machado A. Effects of discharged fraction in repeated batch culture for hyaluronate lyase production. *J Ferment Technol* 1986;64:419–24.
  18. Bautista J., Jover M., Gutierrez J.F., Corpas R., Cremades O., Fontiveros E., Iglesias F., Vaga J., (2001). Preparation of crayfish chitin by *in situ* lactic acid production. *PROCESS BIOCHEMISTRY* 37:229-234
  19. Beelman, R. B., Guthrie, B. D., & Royse, D. J. (1989). Influence of bacterial populations on postharvest deterioration of fresh mushrooms. *Mushroom Science*, 12(Part II), 655-666.
  20. Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in microbiology*, 4, 149. doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149
  21. Bernfeld, P., (1955) Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, 1, 149-158. http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5
  22. Biekman, E. S. A., Van Remmen, H. H. J., Kroese-Hoedeman, H. I., Ogink, J. J. M., & Schijvens, E. P. H. M. (1997). Effect of shrinkage on the temperature increase in evacuated mushrooms (*Agaricus bisporus*) during blanching. *Journal of Food Engineering*, 33(1-2), 87-99. doi.org/10.1016/S0260-8774 (97)00044-7
  23. Blackshear, P.J. Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 1984; 104: 237-255.
  24. Blandino, A., Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal* 26: 100-106.
  25. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976). https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527 -3
  26. Brurberg, M. B., Nes, I. F., & Eijsink, V. G. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 142(7), 1581-1589.
  27. Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., & Walczak, M. (2013). Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 104-110. doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.038
  28. Burlo, F., J.M. Esteve, F. Martínez -Sánchez & A.A. Carbonell -Barrachina (2004). Métodos de conservación de *Agaricus bisporus* L. en fresco: 231-235. In: Da Graca, M. (Ed.). *Maturação e pós-colheita 2004*. Instituto Nacional de Investigacao Agrariae das Pescas. Olhao.

29. Buruleanu, L. C., Radulescu, C., Georgescu, A. A., Danet, F. A., Olteanu, R. L., Nicolescu, C. M., & Dulama, I. D. (2018). Statistical characterization of the phytochemical characteristics of edible mushroom extracts. *Analytical Letters*, 51(7), 1039–1059.
30. Busby, J. N., Landsberg, M. J., Simpson, R. M., Jones, S. A., Hankamer, B., Hurst, M. R., & Lott, J. S. (2012). Structural analysis of Chi1 chitinase from *Yen-Tc*: the multisubunit insecticidal ABC toxin complex of *Yersinia entomophaga*. *Journal of molecular biology*, 415(2), 359-371. doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.018
31. Byrne, G. S., & Ward, O. P. (1989). Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and bioengineering*, 33(7), 912-914. doi.org/10.1002/bit.260330715
32. Carbonero-Aguilar, P. Estudio de la oxidación de proteínas en ratas con encefalopatía hepática: una aproximación Proteómica. Doctoral thesis. Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain (2012)
33. Chatelain, P. G., Pintado, M. E., & Vasconcelos, M. W. (2014). Evaluation of chitooligosaccharide application on mineral accumulation and plant growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*, 215, 134-140. doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.11.009
34. Chen, J., An, Y., Kumar, A., & Liu, Z. (2017). Improvement of chitinase *Pachi* with nematicidal activities by random mutagenesis. *International journal of biological macromolecules*, 96, 171-176. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.093
35. Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millán, F., 1997. Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnology* (11): 273-291.
36. Cohen-Kupiec, R., & Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current opinion in biotechnology*, 9(3), 270-277. doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80058-X
37. Cosio I.G., R.A. Fisher, P.A. Carroad, *J. Food. Sci.* 47 (1982) 901.
38. Costa J.A.V., Treichel H., Kumar V., Pandey A., (2018). Advances in Solid-State Fermentation. En: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation*. Editado por: Ashok Pandey, Christian Larroche, Carlos Ricardo Soccol. Capítulo 1, pp: 1-18. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00001-3>
39. Craig, R., Beavis, R.C.: A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2310–2316 (2003). <https://doi.org/10.1002/rcm.1198>
40. Cremades, O., Parrado J., Alvarez-Ossorio M.C., Jover M., Collantes de Teran L., Gutierrez J.F., Bautista J., (2003). Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*). *FOOD CHEMISTRY* 82: 559-566.
41. Cremades, O., Ponce, E., Corpas, R., Gutierrez, J. F., Jover, M., Alvarez-Ossorio, M. C., ... & Bautista, J. (2001). Processing of crawfish (*Procambarus*

- clarkii) for the preparation of carotenoproteins and chitin. Journal of agricultural and food chemistry, 49(11), 5468-5472. DOI: 10.1021/jf0104174
42. Cremades O., Diaz-Herrero M.M., Carbonero-Aguilar P., Gutierrez-Gil J.F., Fontiveros, E., Rodríguez-Morgado B., Parrado J. and Bautista J., (2012) Preparation and characterisation of selenium-enriched mushroom aqueous enzymatic extracts (MAEE) obtained from the white button mushroom (*Agaricus bisporus*), *Food Chem.*, 133, 1538–1543. doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.046
  43. Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M., & Luyben, K. C. A. (1997). Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5), 715-726. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<715::AID-BIT2>3.0.CO;2-E
  44. Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., ... & Ludwicki, J. K. (2015). Biopesticides—towards increased consumer safety in the European Union. *Pest management science*, 71(1), 3-6. doi.org/10.1002/ps.3829
  45. Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(6), 773-782. doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7
  46. Devece, C., Rodríguez-López, J.N., Fenoll, J.T., Catalá, J.M., De los Reyes, E. y García-Cánovas, F. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 4506-4511, 1999.
  47. De Vries, R. P., Visser, J. 2001. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65 (4): 497-522.
  48. da Silva R.R., (2019). Enzyme technology in food preservation: A promising and sustainable strategy for biocontrol of post-harvest fungal pathogens. *Food Chemistry* 277 (2019) 531–532
  49. de Lima, F.B., Félix, C., Osório, N., Vitorino, A.A., Domingues, P., Correia, A., da Silva-Ribeiro, R.T., Esteves, A.C.: Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. *Biocontrol Sci.* 99, 38–46 (2016). https://doi.org/10.1016/j.bioco ntrol .2017.01.003
  50. De Ory, I., Caro, I., Díaz, A. B., Blandino, A. 2007. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, 41:302-306.
  51. Di Rosa, M., Distefano, G., Zorena, K., & Malaguarnera, L. (2016). Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions. *Immunobiology*, 221(3), 399-411. doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.014
  52. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
  53. Duo-Chuan, L. (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161, 345–

- 360, <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0024-y>
54. Duru, S., Yücege, M., & Ardiç, S. (2013). Chitinases and lung diseases. *Tuberk Toraks*, 61(1), 71-75. doi: 10.5578/tt.3773
  55. Einsele, A. (1978). Scaling-up bioreactors. *Process Biochem.*, 7, 13-14.
  56. El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine drugs*, 8(4), 968-987. doi:10.3390/md8040968
  57. Evans, H.C., Samson, R. A. & Latge, J-P (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi*. Berlin: Springer Verlag. p. 186. Fry, William E. (2012). *Principles of Plant Disease Management*. Academic Press. p. 187. ISBN 978-0-08-091830-3.
  58. Falcón Rodríguez, A., Costales Menéndez, D., Martínez Téllez, M. Á., & Gordon, T. A. (2012). Respuesta enzimática y de crecimiento en una variedad comercial de tabaco (*Nicotiana tabacum*, L.) tratada por aspersión foliar de un polímero de quitosana. *Cultivos Tropicales*, 33(1), 65-70.
  59. Fang, W., Azimzadeh, P., & Leger, R. J. S. (2012). Strain improvement of fungal insecticides for controlling insect pests and vector-borne diseases. *Current opinion in microbiology*, 15(3), 232-238. doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.012
  60. FAO, 2018a. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO Global Statistical Yearbook. Fecha de consulta 2018.
  61. FAO, 2018b. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO Regional Statistical Yearbooks. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Fecha de consulta 2018.
  62. FAO FishStat, 2016: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Procambarus\\_clarkii/es#tcNA00ED](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Procambarus_clarkii/es#tcNA00ED) Accedido el 11 de junio de 2019
  63. Felse, P. A., & Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioproc. Eng.* 20: 505-512. doi.org/10.1007/s004490050622
  64. Fenice, M., Di Giambattista, R., Raetz, E., Leuba, J. L., & Federici, F. (1998). Repeated-batch and continuous production of chitinolytic enzymes by *Penicillium janthinellum* immobilised on chemically-modified macroporous cellulose. *Journal of biotechnology*, 62(2), 119-131. doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00051-0
  65. Fletcher J (2001) 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, The Netherlands: 15 – 19 May, 2000. BSPP News Spring 2001. Online Edition, <http://www.bspp.org.uk/bsppnews/bsppnews38/bsppnews38-13.htm> (Accessed April 4, 2007).
  66. Flint, Maria Louise & Dreistadt, Steve H. (1998). Clark, Jack K., ed. *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control*. University of California Press. ISBN 978-0-520 21801-7.
  67. Fortuna-González, J.M.: Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Doctoral thesis. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México, (2010)
  68. Fry, William E. (2012). *Principles of Plant Disease Management*. Academic

- Press. p. 187. ISBN 978-0-08-091830-3.
69. Fröhlich T., Arnold G.J., (2006). Proteome research based on modern liquid chromatography-tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *J Neural Transm (Vienna)* 113:973-994
  70. Fu, X., Yan, Q., Wang, J., Yang, S., & Jiang, Z. (2016). Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. *International journal of biological macromolecules*, 91, 973-979. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.050
  71. Gamazo C, López-Goñy y Díaz R. Manual práctico de Microbiología (3ª ed.). Elsevier/Masson, Barcelona (2009)
  72. García Mendoza, C., Sanchez, E. & Novaes-Ledieu, M. (1987). Differences in microfibrils in the walls of *Agaricus bisporus* secondary mycelium. *FEMS Microbiol Lett* 44, 161-165. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02261.x
  73. Gherardi F. & Holdich D.M., (1st Edt) (1999). Crayfish in Europe as Alien Species. How to Make the Best of a Bad Situation? Balkema, Rotterdam, The Netherlands. ISBN: 9789054104698
  74. Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., Manni, L., Salem, M. O., & Nasri, M. (2011). A solvent-stable metalloprotease produced by *Pseudomonas aeruginosa* A2 grown on shrimp shell waste and its application in chitin extraction. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(4), 410-425. doi: 10.1007 / s12010-010-9144-4.
  75. Gil-Sánchez, J. M., & Alba-Tercedor, J. (2006). The decline of the endangered populations of the native freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in southern Spain: it is possible to avoid extinction?. *Hydrobiologia*, 559(1), 113-122. doi.org/10.1007/s10750-005-1024-5
  76. Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 809-812. doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00278-8
  77. Girard, C.F. 1852. A revision of the North American Astaci, with observations on their habits and geographical distribution. *Proc. Acad. of Nat. Sci. Philadelphia* 6: 87 – 91.
  78. Gómez Elba Fiorella. 2014. Evaluación del valor nutricional y pigmentante de la harina de cangrejo *Procambarus clarkii*, para la alimentación de gallinas semipesadas y pollos de engorde como método de control poblacional del cangrejo. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.
  79. Gooday, G. W. (1999). Aggressive and defensive roles for chitinases. *Exs*, 87, 157-169.
  80. Gooday, G. W., Zhu, W. Y., & O'Donnell, R. W. (1992). What are the roles of chitinases in the growing fungus?. *FEMS Microbiology Letters*, 100(1-3), 387-391. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb14067.x
  81. Görs, S., Schumann, R., Häubner, N., Karsten, U.: Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll *a* as

- biomarkers. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 60, 50–59 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.10.003>
82. Ha, M. T., & Huang, J. W. (2007). Control of Fusarium wilt of asparagus bean by organic soil amendment and microorganisms. *Plant Pathol. Bull*, 16, 169-180.
  83. Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50. doi: 10.1016 / j.tifs.2015.11.007
  84. Han, B., Zhou, K., Li, Z., Sun, B., Ni, Q., Meng, X., ... & Zhou, C. (2016). Characterization of the first fungal Glycosyl Hydrolase family 19 chitinase (NbchiA) from *Nosema bombycis* (Nb). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 37-45. doi: 10.1111 / jeu.12246
  85. Harman G.E , C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer, A. Tronsmo, *Phytopathol.* 83 (1993) 313.
  86. Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 533-543. doi.org/10.1007/s00253-011-3723-3
  87. Hassainia A., Satha H., Boufi S., (2018). Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization *International Journal of Biological Macromolecules* 117 (2018) 1334–1342
  88. Hayes W.A. 1977 Mushroom nutrition and the role of micro-organisms in composting. En: *Composting*, W. A. Hayes (ed.), The Mushroom Growers' Association. Leeds, pp 1-20.
  89. Hernández Peñaranda, Alicia. *Microbiología Industrial*. Primera edición. San José: Universidad Estatal a Distancia de Costa Rica, 2013. págs. 47-48. ISBN: 978-9968-31-255-4
  90. Herrera-Estrella, A. and Chet, I. (1999) Chitinases in biological control. In *Chitin and Chitinases*. Carbohydrate Polymers (Jolles, P. and Muzzarelli, R.A.A., eds), vol. 43, pp. 170–184, BirkhauserVerlag Basel, Switzerland
  91. Heukeshoven, J., Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6: 103-112.
  92. Hobbs, H.H. Jr. 1984. On the Distribution of the Crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Cambaridae). *Journal of Crustacean Biology*, 4: 12-24.
  93. Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., ... & Eijsink, V. G. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18089-18094. Proc. Natl Acad. Sci. USA doi: 10.1073 / pnas.0608909103
  94. Horwitz, M., Reid, J. & Ogrydziak, D. 1984 Genetic improvement of chitinase production by *Serratia marcescens*. In *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*, ed Zikakis, J.P. pp. 191-208. Orlando: Academic Press. doi.org/10.1016/B978-0-12-

- 780950-2.50018-6
95. Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M., & Hutcheson, S. W. (2003). Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 627-635. doi.org/10.1007/s10295-003-0096-3
  96. Huerta Ochoa S. 2000. Temperatura, Contenido de Humedad, a, y pH. Fermentación en Medio Sólido. Curso teórico-práctico. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Memorias.
  97. Huffaker, C. B.; Berryman, A. A.; Laing, J. E. (1984). «Natural control of insect populations». En C. B. Huffaker and R. L. Rabb. *Ecological Entomology* (Wiley Interscience): 359-398
  98. Inokuma K, Hasunuma T, Kondo A (2016) Ethanol production from Nacetyl-D-glucosamine by Scheffersomyces stipitis strains.
  99. Jones BL., Fontanini D., Jarvinen M, Pekkarien A., Simplified Endoproteinase Assays Using Gelatin or Azogelatin. *Anal Biochem* 1998. 263: 214-20. doi:10.1006/ABIO.1998.2819.
  100. Joshi, S., Kozlowski, M., Selvaraj, G., Iyer, V.N. & Davies, R.W. 1988 Cloning of genes of the chitin utilization regulon of *Serratia liquefaciens*. *Journal of Bacteriology* 170, 2984-2988. doi: 10.1128 / jb.170.7.2984-2988.1988
  101. Joshi S., Kozlowski M., Richens S., Comberbach D.M., (1989).° Chitinase and chitobiase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology* 11:289-296
  102. Jung, W. J., & Park, R. D. (2014). Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine drugs*, 12(11), 5328-5356. doi: 10.3390 / md12115328
  103. Jüsten, P., Paul, G. C., Nienow, A. W., & Thomas, C. R. (1996). Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), 672-684. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961220)52:6<672::AID-BIT5>3.0.CO;2-L
  104. Karasuda, S., Tanaka, S., Kajihara, H., Yamamoto, Y., & Koga, D. (2003). Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(1), 221-224. doi.org/10.1271/bbb.67.221
  105. Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 1-9. doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6
  106. Kaur, S., & Dhillon, G. S. (2015). Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 35(1), 44-61. Doi: 10.3109 / 07388551.2013.798256.
  107. Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., & Watanabe, T. (2006). Comparison of enzymatic and antifungal properties

- between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3 (2). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(4), 988-998. doi.org/10.1271/bbb.70.988
108. Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T. et al. (2006) Structural Studies of a Two-domain Chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Mol. Biol.* 358, 472–484, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.013>
109. Komi, D. E. A., Sharma, L., & Cruz, C. S. D. (2018). Chitin and its effects on inflammatory and immune responses. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 54(2), 213-223. doi.org/10.1007/s12016-017-8600-0
110. Komi, D.E.A, Kazemi, T., y Bussink, AP (2016). New insights into the relationship between chitinase-3-like-1 and asthma. *Current allergy and asthma reports*. 16 (8), 57. doi: 10.1007/s11882-016-0637-2
111. Kotwaliwale, N., Bakane, P. y Verma, A. Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. *Journal of Food Engineering*, 78:1207-1211, 2007.
112. Krishna, C. 2005. Solid State Fermentation Systems – An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 1-30.
113. Krishnaveni, B., & Rangunathan, R. (2015). Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from *F. solani* CBNR BKRR, Synthesis of their Bionanocomposites and Study of their Productive Application. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(4), 197.
114. Krolicka, M., Hinz, S. W., Koetsier, M. J., Joosten, R., Eggink, G., van den Broek, L. A., & Boeriu, C. G. (2018). Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(7), 1658-1669. Doi: 10.1021 / acs.jafc.7b04032
115. Kumar, M., Brar, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2017). Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitooligosaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1641-1647. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.100
116. Kuo, Y. H., Liang, T. W., Liu, K. C., Hsu, Y. W., Hsu, H. C., & Wang, S. L. (2011). Isolation and identification of a novel antioxidant with antitumor activity from *Serratia ureilytica* using squid pen as fermentation substrate. *Marine biotechnology*, 13(3), 451-461. doi: 10.1007 / s10126-010-9316-9.
117. Labarère, J. (1994). Métodos de la genética aplicados a la obtención y mejora de variedades comerciales de los hongos comestibles cultivados. In I Jornadas técnicas del champiñón y otros hongos comestibles en Castilla-La Mancha: celebradas en Motilla del Palancar (Cuenca), 3 y 4 de noviembre de 1993 (pp. 9-36). Diputación Provincial de Cuenca. Patronato de Promoción Económica.
118. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685
119. Langner T, Göhre V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Curr Genet*. 2016;62(2):243–54.

120. Leger, R. J. S., Joshi, L., & Roberts, D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 709-713.
121. Lemaux, Peggy G. (2008). «Genetically Engineered Plants and Foods: A Scientist's Analysis of the Issues (Part I)». *Annual Review of Plant Biology* 59: 771-812. PMID 18284373. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103840.
122. Liang, T. W., Jen, S. N., Nguyen, A. D., & Wang, S. L. (2016). Application of chitinous materials in production and purification of a poly (L-lactic acid) depolymerase from *Pseudomonas tamsuui* TKU015. *Polymers*, 8(3), 98. doi: 10.3390 / polym8030098.
123. Liang, Rui; Li, Xueyun; Yuan, Wanling; et ál., (2018). Antifungal Activity of Nanochitin Whisker against Crown Rot Diseases of Wheat. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* 66:9907-9913.
124. Liu, B. L., Kao, P. M., Tzeng, Y. M., & Feng, K. C. (2003). Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 410-415. doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00138-8
125. Liu, C. L., Lin, T. H., & Juang, R. S. (2013). Optimization of recombinant hexaoligochitin-producing chitinase production with response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 62, 518-522. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.048
126. Lodhi, G., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Kim, S. K., Jeon, Y. J., Je, J. Y., ... & Park, P. J. (2014). Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. *BioMed research international*, *Biomed Res Int*: 1: 1–13. doi.org/10.1155/2014/654913
127. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495. doi.org/10.1093/nar/gkt1178
128. López, M. D. B. (2003). Bases celulares y moleculares de la verticiliosis (producida por " *Verticillium fungicola*") de los cultivos industriales de champiñón (" *Agaricus bisporus*") y efecto del fungicida procloraz-Mn (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
129. Lorito M., A. Di Pietro, C. Hayes, S.L. Woo, G.E. Harman, *Phytopathol.* 84 (1994) 398.
130. Lupetti, A., de Boer, M. G., Erba, P., Campa, M., & Nibbering, P. H. (2011). Radiotracers for fungal infection imaging. *Medical mycology*, 49(Supplement\_1), S62-S69. doi.org/10.3109/13693786.2010.508188
131. McGavin, George C. (2000). *Insectos arañas y otros artrópodos terrestres*. Barcelona Omega. p. 11.
132. Martínez, E. A., Boer, H., Koivula, A., Samain, E., Driguez, H., Armand, S., & Cottaz, S. (2012). Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family

- glycoside hydrolases into transglycosylases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1-2), 89-96. doi: 10.1016 / j.molcatb.2011.09.003
133. Mediterranean Business Consulting. S.L. 2001. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Estudio sobre el impacto económico de cangrejo de río en Andalucía.
  134. Meruvu, H., & Donthireddy, S. R. R. (2014). Purification and Characterization of an Antifungal Chitinase from *Citrobacter freundii* str. nov. haritD11. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(1), 196-205. doi.org/10.1007/s12010-013-0540-4
  135. Merzendorfer H. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol*. 2003;206(24):4393–412
  136. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428 (1959)
  137. Mohamed S., Bouacem K., Mechri S., Addou N.A., Laribi-Habchi H., Fardeau M.L., Jaouadi B., Hacène H., (2019). Purification and biochemical characterization of a novel acido-halotolerant and thermostable endochitinase from *Melghiribacillus thermohalophilus* strain Nari2A(T). *CARBOHYDRATE RESEARCH* 473: 46-56
  138. Munoz G., Valencia C., Valderruten N., Ruiz-Durante E. Zuluaga F., (2015). Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine. *REACTIVE & FUNCTIONAL POLYMERS* 91-92:1-10
  139. **Muszyńska, B., Kaźa, K., Rojowski, J., Grzywacz, A., & Opoka, W. (2017). Composition and biological properties of *Agaricus bisporus* fruiting bodies - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(3), 173-182.**
  140. Muzzarelli, R. A. (2010). Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine drugs*, 8(2), 292-312. DOI: 10.3390/md8020292
  141. Nagpure, A., Choudhary, B., & Gupta, R. K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical reviews in biotechnology*, 34(3), 215-232. doi.org/10.3109/07388551.2013.790874
  142. Nakanishi, E., Okamoto, S., Matsuura, H., NAGASAWA, H., & SAKUDA, S. (2001). Allosamidin, a chitinase inhibitor produced by *Streptomyces*, acts as an inducer of chitinase production in its producing strain. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 77(5), 79-82. doi: 10.2183 / pjab.77.79
  143. Nava, I. Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. [Tesis Maestro en Ciencias Químico-biológicas]. México D.F (México): Instituto Politécnico Nacional, 2009, p. 82.
  144. Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., Aebersold, R.: A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 4646–4658 (2003). <https://doi.org/10.1021/ac0341261>
  145. Nguyen, V. B., & Wang, S. L. (2017). Reclamation of marine chitinous materials for the production of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors via microbial conversion. *Marine*

- drugs, 15(11), 350. doi: 10.3390 / md15110350.
146. Nguyen, V. B., & Wang, S. L. (2018). New novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors produced by microbial conversion. *Process Biochemistry*, 65, 228-232. doi: 10.1016 / j.procbio.2017.11.016.
  147. Nguyen, V. B., Nguyen, A. D., & Wang, S. L. (2017). Utilization of Fishery Processing By-Product Squid Pens for  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors Production by *Paenibacillus* sp. *Marine drugs*, 15(9), 274. doi: 10.3390 / md15090274.
  148. Nguyen-Thi, N., & Doucet, N. (2016). Combining chitinase C and N-acetylhexosaminidase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2) provides an efficient way to synthesize N-acetylglucosamine from crystalline chitin. *Journal of biotechnology*, 220, 25-32. doi: 10.1016 / j.jbiotec.2015.12.038
  149. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>  
Fecha de consulta: 2018
  150. Ogata , M., Nakajima M., Kato T., Obara T., Yagi H., Kato K., Usui T., Park E., (2009). Synthesis of sialoglycopolyptide for potentially blocking influenza virus infection using a rat alpha 2,6-sialyltransferase expressed in BmNPV bacmid-injected silkworm larvae. *BMC BIOTECHNOLOGY* 9:54 doi:10.1186/1472-6750-9-54
  151. Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M., & Watanabe, T. (1996). A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of bacteriology*, 178(17), 5065-5070. doi:10.1128 / jb.178.17.5065-5070.1996
  152. Oldshue, J. Y. (1966). Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnology and Bioengineering*, 8(1), 3-24. doi.org/10.1002/bit.260080103
  153. Orts Gomez A., Parrado Rubio J. Tejada Moral M., (2017). Okara valorization process by fermentation with *Bacillus licheniformis*: Obtention of hydrolytic enzymes, bioactive compounds, and protein hydrolysates. *Journal of Biotechnology* 256:S62-S63.
  154. Oshima, H., Miyazaki, R., Ohe, Y., Hayashi, H., Kawamura, K., & Kikuyama, S. (2002). "Molecular cloning of a putative gastric chitinase in the toad *Bufo japonicus*". *Zoological science*, 19(3), 293-297. doi.org/10.2108/zsj.19.293
  155. Ospina Álvarez S.P., Ramírez Cadavid D.A., Escobar Sierra D.M., Ossa Orozco C.P., Rojas Vahos D.F., Zapata O.P., Atehortúa L., (2014). Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture, *Biomed Res. Int.* Volume 2014, Article ID 169071, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/169071>
  156. Ozdemir, M. y Floros, J. D. 2010. Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(3): 195-193.
  157. Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 27(2), 109-117. doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W
  158. Pardo, J. (1994). Productividad de un compost y economía de su elaboración:

- criterios de evaluación basados en una analítica sistemática. In I Jornadas técnicas del champiñón y otros hongos comestibles en Castilla-La Mancha: celebradas en Motilla del Palancar (Cuenca), 3 y 4 de noviembre de 1993 (pp. 37-58). Diputación Provincial de Cuenca. Patronato de Promoción Económica. ISBN 84-605-0338-0
159. Parrado, J., Millan, F., Hernández-Pinzón, I., Bautista, J., y Machado, A. (1993). Caracterización de hidrolizados enzimáticos de la proteína del girasol. *Diario de química agrícola y alimentaria*, 41 (11), 1821-1825.
  160. Parrado J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada M., Hernández T., García C., (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme and Microbial Technology* 57:1-7
  161. Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*, 26(7), 473-483. doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00134-4
  162. Pérez-Rodríguez, N., Moreira, C. D., Agrasar, A. T., & Domínguez, J. M. (2016). Feruloyl esterase production by *Aspergillus terreus* CECT 2808 and subsequent application to enzymatic hydrolysis. *Enzyme and microbial technology*, 91, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2016.05.011>
  163. Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S. et al. (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169–1180, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00119-7)
  164. Polaina, J., 2004. Estructura, Función e ingeniería molecular de las enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. *Mensaje Bioquímico Vol. XVIII*
  165. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 26-27. doi.org/10.4067/S0717-34581998000300007
  166. Ramírez, M. V., & Calzadiaz, L. (2016). Industrial enzymes and metabolites from Actinobacteria in food and medicine industry. In Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications. InTech. *World's largest Science, Technology & Medicine*; 2016.315–28. doi: 10.5772/61286
  167. Ramírez, M.G., Avelizapa, L.I., Avelizapa, N.G.R., Camarillo, R.C.: Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *J. Microbiol. Methods* 56, 213–219 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.011>
  168. Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2015). Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. *Enzyme research*, 2015, 1-8, (Artículo ID 791907) doi:10.1155 / 2015/791907
  169. Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E., & Aerts, J. M. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2198-2202. doi: 10.1074 / jbc.270.5.2198

170. Ridout, C.J., Coley-Smith, J.R. & Lynch, J.M. 1988 Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology* 10,180-187. doi.org/10.1016/0141-0229(88)90085-3
171. Rodríguez, C. F., Bécares, E., Fernández-Aláez, M., & Fernández-Aláez, C. (2005). Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological Invasions*, 7(1), 75. doi.org/10.1007/s10530-004-9636-7
172. Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M. I., Rodríguez-Vázquez, R., & Ibarra, J. E. (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 299-308. doi.org/10.1023/A:1008947029713
173. Russ, W., & Meyer-Pittroff, R. (2004). Utilizing waste products from the food production and processing industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 57-62. doi.org/10.1080/10408690490263783
174. Sahai, A. S., & Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 317-338. doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x
175. Sakai K., T. Uchiyama, Y. Matahira, F. Nanjo, J. *Ferment. Bioeng.* 72 (1991) 168
176. Salvatore S, Heuschkel R, Tomlin S, Davies SE, Edwards S, Walker-Smith JA, French I, Murch SH (2000) A pilot study of N-acetylglucosamine, a nutritional substrate for glycosaminoglycan synthesis, in paediatric chronic inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14:1567–1579
177. Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., ... & Aiba, S. I. (2002). Production of N-acetyl-D-glucosamine from  $\alpha$ -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Carbohydrate Research*, 337(8), 761-763. doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00034-4
178. Sastoque, C.: Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis para optar el título de microbiólogo industrial, agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia, (2005)
179. Schultze, M., & Kondorosi, Á. (1996). The role of lipochitooligosaccharides in root nodule organogenesis and plant cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(5), 631-638. doi.org/10.1016/S0959-437X(96)80094-3
180. Shen, C. R., Liu, C. L., Lee, H. P., & Chen, J. K. (2013). The identification and characterization of chitotriosidase activity in pancreatin from porcine pancreas. *Molecules*, 18(3), 2978-2987. doi.org/10.3390/molecules18032978
181. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856–2860 (2006).
182. Shikhman AR, Amiel D, D'Lima D, Hwang SB, Hu C, Xu A, Hashimoto S, Kobayashi K, Sasho T, Lotz MK (2005) Chondroprotective activity of N-

- acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 64(1):89–94. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.019406>
183. Shimosaka, M., Fukumori, Y., Narita, T., Zhang, X. Y., Kodaira, R., Nogawa, M., & Okazaki, M. (2001). The bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101 produces two different kinds of chitinases belonging to families 18 and 19 of the glycosyl hydrolases. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(1), 103-105.
  184. Shinoda, T., Kobayashi, J., Matsui, M., & Chinzei, Y. (2001). Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene. *Insect biochemistry and molecular biology*, 31(6-7), 521-532. [doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00133-8)
  185. Shuhui, L., Mok, Y. K., & Wong, W. F. (2009). Role of mammalian chitinases in asthma. *International archives of allergy and immunology*, 149(4), 369-377. [doi.org/10.1159/000205583](https://doi.org/10.1159/000205583)
  186. Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijssink, V. G., & Vårum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*, 45(31), 9566-9574. doi: 10.1021 / bi060370I
  187. Singh, G., Bhalla, A., Bhatti, J.S., Chandel, S., Rajput, A., Abdullah, A. et al. (2014) Potential of chitinases as a biopesticide against agriculturally harmful fungi and insects. *Res. Rev. J. Microbiol. Biotechnol.* 3, 27–32
  188. Smith, J. J., Lilly, M. D., & Fox, R. I. (1990). The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and bioengineering*, 35(10), 1011-1023. [doi.org/10.1002/bit.260351009](https://doi.org/10.1002/bit.260351009)
  189. Souty-Grosset, C., Holdich, D. M., Noel, P. Y., Reynolds, J. D., & Haffner, P. (2006). *Atlas of Crayfish in Europe*. Museum national d'Histoire naturelle, Paris, 187 p. Patrimoines naturels, 64.
  190. Stoykov, Y. M., Pavlov, A. I., & Krastanov, A. I. (2015). Chitinase biotechnology: production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 30-38. [doi.org/10.1002/elsc.201400173](https://doi.org/10.1002/elsc.201400173)
  191. Subha Narayan Das, Jogi Madhuprakash, P. V. S. R. N. Sarma, Pallinti Purushotham, Katta Suma, Kaur Manjeet, Samudrala Rambabu, Nour Eddine El Gueddari, Bruno M. Moerschbacher & Appa Rao Podile (2015) Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35:1, 29-43, doi: 10.3109/07388551.2013.798255
  192. Suresh, P. V. & Chandrasekaran, M. (1998). Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 655-660. [doi.org/10.1023/A:1008844516915](https://doi.org/10.1023/A:1008844516915)
  193. Suresh, P. V. & Chandrasekaran, M. (1999). Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state

- fermentation. *Process Biochemistry*, 34(3), 257-267. doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00092-2
194. Suresh, P. V. & Anil PKK. ( 2012 ). Degradación mejorada de los materiales de alfa-quitina preparados a partir del subproducto del procesamiento del camarón y la producción de N-acetil- d- glucosamina por quitinasas termoactivas de hongos mesófilos del suelo. *Biodegradación*, 23, pp. 597 – 607
  195. Suzuki, M., Morimatsu, M., Yamashita, T., Iwanaga, T., & Syuto, B. (2001). “A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver”. *FEBS letters*, 506(2), 127-130. doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02893-9
  196. Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(5), 1075-1083. doi.org/10.1271/bbb.66.1075
  197. Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A., & Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current microbiology*, 68(1), 71-81. doi.org/10.1007/s00284-013-0440-4
  198. Takuo, B. (1999) Three-dimensional structure of the catalytic domain of Chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution. *Proc. Japan Acad.* 75, 269–274
  199. Tayel A.A., Moussa S.H., El-Tras W.F., Elguindyc N.M., Opwis K., (2011). Antimicrobial textile treated with chitosan from *Aspergillus niger* mycelial waste. *International Journal of Biological Macromolecules* 49 (2011) 241–245
  200. Tengerdy, R. P. (1985). Solid substrate fermentation. *Trends in biotechnology*, 3(4), 96-99.
  201. Trouvelot, S., Héloir, M. C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., ... & Adrian, M. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in plant science*, 5, 592. doi.org/10.3389/fpls.2014.00592
  202. Tsujibo, H., Orikoshi, H., Shiotani, K., Hayashi, M., Umeda, J., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y., Inamori, Y. (1998). Characterization of chitinase C from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7, and its corresponding gene and domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 472-478
  203. Umemoto, N., Kanda, Y., Ohnuma, T., Osawa, T., Numata, T., Sakuda, S. et al. (2015) Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class v chitinases: The cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *Plant J.* 82, 54–66, https://doi.org/10.1111/tpj.12785
  204. Ueno, H., Miyashita, K., Sawada, Y. & Oba, Y. 1990 Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* species S-84. *Journal of General and Applied Microbiology* 36, 377-392. doi.org/10.2323/jgam.36.377.
  205. Urbina-Salazar, A., Inca-Torres, AR, Falcón-García, G. Carbonero-Aguilar, P.,

- Rodríguez-Morgado, B., del Campo, J. A., ... & Bautista, J. 2018. Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. *Waste and Biomass Valorization*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328>
206. Vaaje-Kolstad, G., Horn, S.J., Sørlie, M. and Eijsink, V.G.H. (2013) The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - A model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J.* 280, 3028–3049, <https://doi.org/10.1111/febs.12181>
207. Vásquez Cárdenas, J. A. Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias). [Tesis Microbiología Agrícola y Veterinaria] Bogotá : Pontificia Universidad Javeriana, 2010
208. Viniegra González G. 2000. Definición y Características del Proceso de Fermentación en Medio Sólido. *Fermentación en Medio Sólido. Curso teórico-práctico.* Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Memorias
209. Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godinez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 157-167. [doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
210. Vocadlo, D.J. and Davies, G.J. (2008) Mechanistic insights into glycosidase chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 539–555, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.05.010>
211. Vyas, P.R. & Deshpande, M.V. 1989 Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation. *Journal of General and Applied Microbiology* 35, 343-350. [doi.org/10.2323/jgam.35.343](https://doi.org/10.2323/jgam.35.343)
212. Wang, S. L. (2012). Microbial reclamation of squid pen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(2), 177-180. [doi: 10.1016 / j.bcab.2012.01.002](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.01.002).
213. Wang, S. L., & Liang, T. W. (2017). Microbial reclamation of squid pens and shrimp shells. *Research on Chemical Intermediates*, 43(6), 3445-3462. [doi: 10.1007 / s11164-016-2425-y](https://doi.org/10.1007 / s11164-016-2425-y).
214. Wang, S. L., Chen, H. J., Liang, T. W., & Lin, Y. D. (2009a). A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. *Process Biochemistry*, 44(1), 70-76. [doi: 10.1016 / j.procbio.2008.09.009](https://doi.org/10.1016 / j.procbio.2008.09.009).
215. Wang, S. L., Wu, P. C., & Liang, T. W. (2009b). Utilization of squid pen for the efficient production of chitosanase and antioxidants through prolonged autoclave treatment. *Carbohydrate research*, 344(8), 979-984. [doi: 10.1016 / j.carres.2009.03.011](https://doi.org/10.1016 / j.carres.2009.03.011).
216. Wang, S. L., Huang, T. Y., Wang, C. Y., Liang, T. W., Yen, Y. H., & Sakata, Y. (2008). Bioconversion of squid pen by *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* TKU010 for the production of proteases and lettuce growth enhancing biofertilizers. *Bioresource technology*, 99(13), 5436-5443. [doi: 10.1016 / j.biortech.2007.11.006](https://doi.org/10.1016 / j.biortech.2007.11.006).

217. Wang, S. L., Li, H. T., Zhang, L. J., Lin, Z. H., & Kuo, Y. H. (2016). Conversion of squid pen to homogentisic acid via *Paenibacillus* sp. TKU036 and the antioxidant and anti-inflammatory activities of homogentisic acid. *Marine drugs*, 14(10), 183. doi: 10.3390 / md14100183.
218. Wang, S. L., Lin, T. Y., Yen, Y. H., Liao, H. F., & Chen, Y. J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*, 341(15), 2507-2515. doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.027
219. Wang, S. L., Liu, C. P., & Liang, T. W. (2012). Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027. *Carbohydrate polymers*, 90(3), 1305-1313. doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.077
220. Ward, Owen. *Bioteconología de la fermentación*. Zaragoza (España): Acribia, S.A, 1989. p.18. ISBN : 8420007064
221. Warren, R. A. J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 183-212. doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.183
222. Wortman, A.T., Somerville, C.C. & Colwell, R.R. 1986 Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and applications of a chitinase probe. *Applied and Environmental Microbiology* 52,142-145
223. Wu, Jianming; Cheng, Xi; Yang, Guisheng, (2019). Preparation of nanochitin-contained magnetic chitosan microfibers via continuous injection gelation method for removal of Ni(II) ion from aqueous solution. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES* 125:404-413
224. Xia, G., Jin, C., Zhou, J., Yang, S., Zhang, S., & Jin, C. (2001). A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *European Journal of Biochemistry*, 268(14), 4079-4085. doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02323.x
225. Yan X.C.N., (2015). Don't waste seafood waste, *Nature* 524: 155–157.
226. Yang H., Gozaydin G., Nasaruddin R.R., et al., (2019). Toward the Shell Biorefinery: Processing Crustacean Shell Waste Using Hot Water and Carbonic Acid. *ACS SUSTAINABLE CHEMISTRY & ENGINEERING* 7:5532-5542.
227. Yang, J., Gan, Z., Lou, Z., Tao, N., Mi, Q., Liang, L., ... & Rao, Z. (2010). Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine. *Microbiology*, 156(12), 3566-3574. doi: 10.1099 / mic.0.043653-0
228. Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., & Jiang, Z. (2016a). Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food chemistry*, 192, 1041-1048. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.092
229. Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Jiang, Z., & Wang, J. (2016b). Biochemical characterization of a novel acidic exochitinase from *Rhizomucor miehei* with antifungal activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(2), 461-469. Doi:

- 10.1021 / acs.jafc.5b05127
230. Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N., Buranabanyat, B.: Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnol. J.* 133, 50–57 (2008) <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.005>
231. Yamane, T., & Shimizu, S. (2005). Fed-batch techniques in microbial processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 30, 147-194. [doi.org/10.1007/BFb0006382](https://doi.org/10.1007/BFb0006382)
232. Yin, H., Zhao, X., & Du, Y. (2010). Oligochitosan: a plant diseases vaccine—a review. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 1-8. [doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.066](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.066)
233. Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174. [doi: 10.3390 / md13031133](https://doi.org/10.3390/md13031133).
234. Younes, I., Hajji, S., Rinaudo, M., Chaabouni, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2016). Optimization of proteins and minerals removal from shrimp shells to produce highly acetylated chitin. *International journal of biological macromolecules*, 84, 246-253. [doi: 10.1016 / j.ijbiomac.2015.08.034](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.034).
235. Yu, G., Xie, L. Q., Li, J. T., Sun, X. H., Zhang, H., Du, Q., ... & Pan, H. Y. (2015). Isolation, partial characterization, and cloning of an extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Mol. Res*, 14, 2275-2289. [doi: 10.4238/2015.March.27.13](https://doi.org/10.4238/2015.March.27.13)
236. Zhang, H-L., Wei J-K., Wang Q-H., Yang R., Gao X-J., Sang Y-X., Cai P-P., Zhang G-Q., and Chen Q-J., (2019). Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *SCIENTIFIC REPORTS* ) 9:1151 | <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37681-6>
237. Zhang, A., Gao, C., Wang, J., Chen, K., & Ouyang, P. (2016). An efficient enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from crude chitin powders. *Green Chemistry*, 18(7), 2147-2154. [Doi:10.1039 / C5GC02242H](https://doi.org/10.1039/C5GC02242H)
238. Zhang, H., Liu, M., Tian, Y., & Hu, X. (2011). Comparative characterization of chitinases from silkworm (*Bombyx mori*) and bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Cell biochemistry and biophysics*, 61(2), 267-275. [doi.org/10.1007/s12013-011-9196-2](https://doi.org/10.1007/s12013-011-9196-2)
239. Zhang, R., Zhou, J., Song, Z., & Huang, Z. (2018). Enzymatic properties of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(1), 93-103. [doi.org/10.1007/s00253-017-8624-7](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8624-7)
240. Zhaoxin, L., Fengxia, L., Mei, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z., Yi, W. 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF - 98. *Bioresource Technology* 99: 5938-5941.
241. Zhu, Q., Arakane, Y., Beeman, RW, Kramer, KJ, y Muthukrishnan, S. (2008). "Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

## BIBLIOGRAFIA

---

*States of America*, vol. 105, no. 18, pp. 6650–6655.  
[doi.org/10.1073/pnas.0800739105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800739105)



# **ANEXOS**



## ANEXOS

**Anexo 1:****PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DE  
PROTEINAS EN GELES DE ACRILAMIDA  
EN TRIS-GLICINA****Soluciones stock****1. Tris-HCl 100 mM (pH 6,8):**

Tris	1,211 g
H <sub>2</sub> O	80 mL
Ajustar el pH a 6,8	
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

**2. SDS 10% (p/v):**

SDS	10 g
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

**3. Azul de Bromofenol 0,5% (p/v):**

Azul de Bromofenol	0,25 g
H <sub>2</sub> O	50 mL

**Soluciones de trabajo****1. Acrilamida 30% (p/v):**

Acrilamida	30 g
H <sub>2</sub> O	100 mL

**2. Bis-acrilamida 1% (p/v):**

Bis-acrilamida	0,5 g
H <sub>2</sub> O	50 mL

**3. Running buffer 4X:**

1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	36 g
H <sub>2</sub> O	150 mL
Ajustar pH 8,8	
0,4% SDS	8 mL de SDS al 10%
Revisar pH	
H <sub>2</sub> O csp	200 mL

**4. Solución A (Solución stock de acrilamida, T= 30%, C= 2,7%)**

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

Durante la preparación de esta solución trabajar siempre con guantes y en campana. (Acrilamida es Neurotóxica)

**5. Stacking buffer 4X (Solución C):**

0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	6,05 g
H <sub>2</sub> O	50 mL
Ajustar pH 6,8	
0,4% SDS	4 mL de SDS al 10%
Revisar pH	
H <sub>2</sub> O csp	100 mL

**6. Tampón de electroforesis 1X:**

Tris-HCl 25mM	3 g
Glicina 190mM	14,258 g
SDS 0,1%	10 mL de SDS al 10%
H <sub>2</sub> O	900 mL

Ajustar pH a 8,4 con HCl gota a gota

H<sub>2</sub>O csp 100 mL

Estable a temperatura ambiente varias semanas. Preferible preparar cada semana.

**7. Tampón de muestra 4X (de carga, de disociación, Mixer):**

0,02M Tris-HCl pH 6,8	2 mL de Tris-HCl 100mM
20% β-mercaptoetanol	2 mL
4,6% SDS	0,46 g
40% glicerol	4 mL de glicerol al 99%
0,01% azul de Bromofenol	0,3 mL de AdB al 0,5% (p/v)
H <sub>2</sub> O csp	10 mL

Hacer alícuotas y guardar a -20 °C

**Anexo 2:****XIII EUCHIS & VIII SIAQ****Production of chitinases by submerged fermentation in media formulated with colloidal chitin of fungi.**

**Anabell Del Rocío Urbina Salazar**, Alberto Renato Inca Torres, Pilar Carbonero Aguilar, Gonzalo Falcón García and Juan D. Bautista.

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, Spain.*

**ABSTRACT**

Production of chitinases is essential for obtaining chitin-oligosaccharides with potential use as elicitors in biocontrol (1). Chitinase production by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 grown in different culture medium formulated with powder chitin (pCH), colloidal chitin (cCH and fungal chitin (fCH) as the main carbon source was studied. The growth of this microorganism produced higher chitinase activity in a medium formulated with fungal (*Agaricus bisporus*) chitin (fCH) than in the other culture media (2). *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 shows the highest chitinase productivity after 8 days of growth with a productivity of 81.25 mU/L/day. Chitinase production, under these conditions, was studied by electrophoretic methods, in which two bands with molecular mass around 90 and 74 kDa are detected. These results show that the culture of *B. licheniformis* ATCC 21415 in a medium formulated with fCH, a cheap and abundant fermentation medium, could be a good procedure for the regular production of glycosidases, particularly chitinases at practical and/or industrial scale.

**References**

- (1) N.N. Nawani, B.P. Kapadnis (2005) Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs *Process Biochemistry*, Volume 40, Issue 2, Pages 651-660.
- (2) Shailesh R. Waghmare, Jai S. Ghosh. (2010) Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroombed. *Carbohydrate Research* Volume 345, Issue 18, Pages 2630-2635.

**Anexo 3:****IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia****Mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) suppress TNF- $\alpha$  and MMP-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts.**

Anabell del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup>, Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup>, Pilar Carbonero Aguilar<sup>1</sup>, Olga Cremades de Molina<sup>1</sup>, Juan Bautista<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor 7 García González 2, 41012 - Sevilla, Spain, [jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es); <sup>2</sup> Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 9 1 1/2, EC060155 - Riobamba, Ecuador, [jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com).

Ergothioneine (ERG), is a dietary antioxidant that scavenges hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), hydroxyl radical ( $\bullet\text{OH}$ ) and nitric oxide (NO) derivatives [1]. ERG exhibits potential applications as a food additive and as an antioxidant for the treatment and/or prevention of oxidative stress related diseases [2]. Natural ERG is preferred by consumers rather than the synthetic.

In this work we study the nature of the antioxidant activity and investigate the effect of M-ERG-EAE, a natural product enriched in natural ERG in the form of extract, M-ERG-EAE, obtained from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) [3], on UV-induced cellular response.

In cultured fibroblasts, M-ERG-EAE suppressed TNF- $\alpha$  upregulation by UV-B radiation. In addition, in fibroblasts exposed to UV-A, M-ERG-EAE suppressed the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein by nearly 50% and reduced MMP-1 mRNA expression.

From these results, we concluded that M-ERG-EAE, as pure ERG, scavenges reactive oxygen species generated by both type-I and type-II photosensitization and suppressed both TNF- $\alpha$  expression and MMP-1 at their translational level. M-ERG-EAE may reduce skin antiaging effects after UV irradiation by the scavenging of  $\bullet\text{O}_2^-$  and  $^1\text{O}_2$ , and reducing signals for protease and inflammatory activity.

**References:**

- (1) Servillo L., D'Onofrio N., Casale R., Cautela D., Giovane A., Castaldo D., Balestrieria M.L. (2017). Ergothioneine products derived by superoxide oxidation in endothelial cells exposed to high-glucose. *Free Radical Biology and Medicine*, 108:8–18.
- (2) Halliwell B., Cheah I.K., Drum C.L. (2016). Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:245–250.
- (3) Cremades O., Diaz-Herrero M.M., Carbonero-Aguilar P, Gutierrez-Gil J.F., Fontiveros E., Bautista J. (2015). White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10:42 – 47.

**Anexo 4:**

## III JORNADAS DOCTORALES DE FARMACIA

**PRODUCCIÓN DE QUITINASAS A PARTIR DE LOS  
SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA:  
Aplicación a los Hongos comestibles y Crustáceos.****Anabell del Rocío Urbina-Salazar.***Departamento de Bioquímica y Biología Molecular***Introducción**

La quitina, es un polímero lineal  $\beta$ -1,4 insoluble de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), es un importante componente estructural de la mayoría de los crustáceos, insectos, algas y hongos. Las quitinasas son enzimas que degradan la quitina a acetil glucosamina y son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos (1). Estas enzimas tienen aplicaciones potenciales en la industria farmacéutica, alimentaria y agronómica donde podrían desempeñar un importante papel en Biocontrol y tratamiento de enfermedades de las plantas, debido a que son no-tóxicas, biodegradables y biocompatibles (2). Este trabajo trata sobre la producción de quitinasas por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 y *Trichoderma harzianum* CEC-T24 crecidos en diferentes medios de cultivo formulados con sub-productos agroindustriales de hongos comestibles (*Agaricus Bisporus*) y crustáceos (*Procambarus clarkii*) como fuente principal de carbono.

**Objetivos**

- Preparación y caracterización de la fuentes de fermentación a partir de subproductos agroindustriales (harina de tallos de champiñón, HTCH y harina de cangrejo, CFM).
- Producción de quitinasas por fermentación en estado sólido (FES) y fermentación sumergida (FS)
- Extracción, concentración/fraccionamiento y estabilización de enzimas (quitinasas).
- Estudio de la secreción de proteínas (secretoma) de *B. licheniformis* ATCC 21415 o *T. harzianum* CEC-T24 crecido en los diferentes medios de cultivo, mediante técnicas electroforéticas y proteómica.
- Producción de quitinasas a escala semi-piloto. (*Pendiente*).

- Estabilización y/o inmovilización de concentrado de quitinasas en forma de nano/micropartículas para su uso como plaguicida alternativo al uso de productos químicos altamente tóxicos para el medio ambiente. (Pendiente).

### Material y Métodos

Los microorganismos se han mantenido en placas de PDA y se cultivaron en FS y FES utilizando diferentes medios formulados con HTCH, M-Ch/G-F y CFM y CF-ChF como principal fuente de carbono, bajo control de pH, temperatura, O<sub>2</sub>-disuelto y agitación, utilizando polvo de quitina (Ch<sub>p</sub>) y quitina coloidal (CH<sub>c</sub>) como controles positivos (3).

La productividad y secreción de la enzima (quitinasa) se ha seguido mediante el análisis de la actividad quitinasa (midiendo la cantidad de N-AcGln liberada), la concentración de proteína (4) y de biomasa. La evolución de las diferentes etapas se ha seguido mediante PAGE SDS (5).

### Resultados y Discusión

Todos los microorganismos produjeron una mayor actividad de quitinasa en un medio formulado con M-Ch/G-F como fuente de carbono en comparación con el medio formulado con Ch<sub>p</sub> o CH<sub>c</sub>. *T. harzianum* CEC-T24 mostró la mayor productividad de quitinasa (261.5 mU L<sup>-1</sup>/día). La producción de quitinasa se controló mediante la medida de actividad y proteína y PAGE-SDS. El análisis electroforético permitió la detección de 28 proteínas diferentes -tres diferentes quitinasas con 82, 50 y 31 kDa-. Estos resultados apunta a que el cultivo de *T. harzianum* CEC-T24 en un medio de fermentación barato y abundante representa un buen procedimiento para la producción a gran escala de quitinasas.

### Bibliografía

1. Sahai A.S., Manocha M.S., (1993). *Microbiol.* 11:317-338.
2. Nawani N.N. and Kapadnis B.P., (2005). *Process Biochemistry* 40:651-660.
3. Urbina-Salazar et al., (2018). *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>
4. Bradford M.M., (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
5. Laemli U.K., (1970). *Nature* 227:680-685.

## Anexo 5:



## *Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives.*

1st Global Congress of Pharmacy Faculties. September 24-28th, Salamanca, Spain  
2018

### **Preparation of Fungal-Nano chitin crystals: Application to Mushroom (*Agaricus bisporus*) by-products.**

**Anabell del Rocío URBINA-SALAZAR<sup>a,b\*</sup>**, Alberto Renato INCA-  
TORRES<sup>a,b</sup>, and Juan BAUTISTA<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de  
Sevilla, C/ Profesor García González nº2, 41012 Sevilla, Spain,  
[jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es)

<sup>b</sup> Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias,  
Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba, Ecuador,  
[jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com)

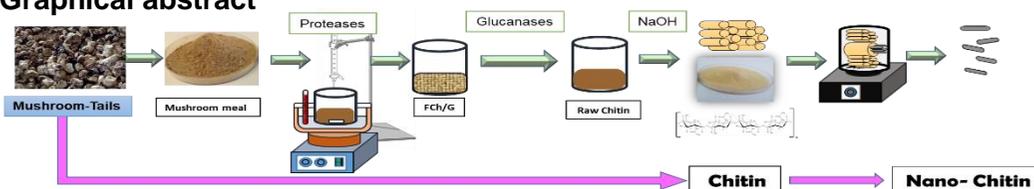
#### **Abstract:**

Chitin is a crystalline polysaccharide of high molecular weight, found in crustacean shells, insect cuticles and in yeast, green algae and cell walls of fungi. It occurs as a highly-organized micro- and nano-fibril structure [1]. Transformation of micro-fibrils in nano-crystals can be achieved dissolving the amorphous regions followed by acidic breaking [2,3]. Functionalized fungal-chitin nanocrystals (FChNC) can be used in the medical-pharmaceutical and food industry do to it antifungal activity [4].

In this work we report on FChNC preparation using fungal chitin (*Agaricus bisporus*) as raw material, obtained by a sequential process based on the use of proteases, glucanases [5]. The concentration of raw fungal chitin obtained by this process, determined as N-acetylglucosamine, is  $83 \pm 1.8\%$ , being a chitin of good quality, similar to that

commercially available for food and medical uses. Preparation of fungal nano-chitin fibres (FNChF) was obtained disintegrating chitin aggregates in a wet-type grinder, generating chitin gel-suspension. Disintegration was achieved due to a high surface-to-volume ratio. Obtained uniform chitin fibers with a width of approximately 10 nm which still maintained their original chemical and crystalline structures [6]. These fibrils form highly crystalline regions and disordered (amorphous) regions that can be turned in nanocrystals via top-down methods such as acid hydrolyses by dissolving the amorphous regions [2,3]. Functionalization of FNChC allows it uses in different composites with medico-pharmaceutical and food uses.

### Graphical abstract



### References

- [1] Salaberria A.M., et al., (2015). *Eur. Polym. J.* 68:503–515.
- [2] Salaberria A.M., et al., (2015). *React. Funct. Polym.* 89:31–39.
- [3] Paillet, M. and Dufresne, A., (2001). *Macromolecules* 34:6527–6530.
- [4] Lopez, O., et al., (2014). *LWT Food Sci. Technol.* 57:106–115.
- [5] Cremades et al., (2012).
- [6] Ifuku S., (2014). *Molecules.* 19:18367-18380

### Financial support and/or acknowledgments

Spanish Ministry of Science and Innovation (project RTC-2015-4039-2), FEDER funds of the European Union.  
CITIUS, Universidad de Sevilla, Servicio de Biología, Invernadero y Servicio de Microanálisis.

**Anexo 6:***XIII EUCHIS & VIII SIAQ***PREPARATION OF FUNGAL CHITIN FROM AGROINDUSTRIAL BY-PRODUCTS: APLICATION TO EDIBLE MUSHROOMS (*Agaricus bisporus*) BY-PRODUCTS.**

Alberto Renato Inca Torres, **Anabell Del Rocío Urbina Salazar**, Gonzalo Falcón García, Pilar Carbonero Aguilar, and Juan Bautista Palomas.

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, Spain.*

The use of chitin-oligosaccharides for use as potential elicitors requires abundant chitin rich materials, readily available and cheap (1). For this purpose, the production of enriched chitin fractions from by-products of the edible mushroom processing industry are of great interest if appropriated procedures were developed (2).

Traditional methods for the commercial preparation of chitin involve alternate hydrochloric acid and alkali treatment, followed by a bleaching stage with chemical reagents to obtain a colorless product. These processes are highly contaminant. Therefore, the developments of environmental friendly processes are of high interest. In this work we report on preliminary results obtained with an enzymatic procedure, environmental friendly, based on the use on proteases and glucanases that lead to fungal chitin fraction with a chitin concentration  $> 80\pm 2\%$ .

**References**

1. (1). Gianfranco Romanazzi, Simona Marianna Sanzani, Yang Bi, Shiping Tian, Porfirio Gutiérrez Martínez, Noam Alkan, (2016). [Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables](#). *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82-94
2. (2). K.S. Matsumoto, R.G. Guevara-González, I. Torres-Pacheco, (2006). Fungal chitinases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, pp. 289–304

## Anexo 7:

IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia

**“In vitro” study of mushroom ergothioneine enriched aqueous extracts (M-ERG-EAE) against oxygen activated substances.**

Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup>, Anabell Del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup>, Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup>, Olga Cremades de Molina<sup>1</sup>, and Juan Bautista<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor 7 García González 2, 41012 - Sevilla, Spain, [jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es); <sup>2</sup> Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 9 1 1/2, EC060155 - Riobamba, Ecuador, [jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com).

Ergothioneine (ERG), 2-mercapto-L-histidine betaine, is a dietary component acting as antioxidant and cytoprotectant. ERG scavenges hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), lipid peroxides, hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) and nitric oxide (NO) derivatives **(1)**. ERG exhibits potential applications as a food additive and as an antioxidant for the treatment and/or prevention of oxidative stress related diseases **(2)**.

Commercial ERG are mainly synthetic, however natural ERG is preferred by consumers. In this work we present a natural product enriched in natural ERG in the form of extract, M-ERG-EAE, obtained from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) using enzymes and membrane technology (MAE) **(3)**. This product can be incorporated in solid or liquid foods or used as a component of cosmetic creams such as sunscreen creams.

“In vitro” studies show that M-ERG-EAE, as pure ERG, scavenged the superoxide anion radical ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), preventing the formation of the high dangerous radical  $\cdot\text{OH}$  and preventing the damage in biomolecules, mainly proteins, nucleic acids and lipids.

From these results, we concluded that M-ERG-EAE, as pure ERG, scavenged  $\cdot\text{O}_2^-$  and  $^1\text{O}_2$ , reducing the formation of the high dangerous radical  $\cdot\text{OH}$  mainly in presence of transition metals such as Fe<sup>2+</sup> and Cu<sup>+</sup>.

**References:**

1. Servillo L., D'Onofrio N., Casale R., Cautela D., Giovane A., Castaldo D., Balestrieria M.L. (2017). Ergothioneine products derived by superoxide oxidation in endothelial cells exposed to high-glucose. *Free Radical Biology and Medicine*, 108:8–18.
2. Halliwell B., Cheah I.K., Drum C.L. (2016). Ergothioneine, an adaptive antioxidant for the protection of injured tissues? A hypothesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:245–250.
3. Cremades O., Diaz-Herrero M.M., Carbonero-Aguilar P., Gutierrez-Gil J.F., Fontiveros E., Bautista J. (2015). White button mushroom ergothioneine aqueous extracts obtained by the application of enzymes and membrane technology. *Food Bioscience*, 10:42 – 47.

## Anexo 8:



## *Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives.*

1st Global Congress of Pharmacy Faculties. September 24-28th, Salamanca, Spain  
2018

### **Preparation of Nanochitin from Crawfish (*Procambarus clarkii*) by-products.**

Alberto Renato INCA-TORRES<sup>a,b\*</sup>, Anabell del Rocío URBINA-SALAZAR<sup>a,b</sup>, and Juan BAUTISTA<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González nº2, 41012 Sevilla, Spain,  
[jdbaut@us.es](mailto:jdbaut@us.es)

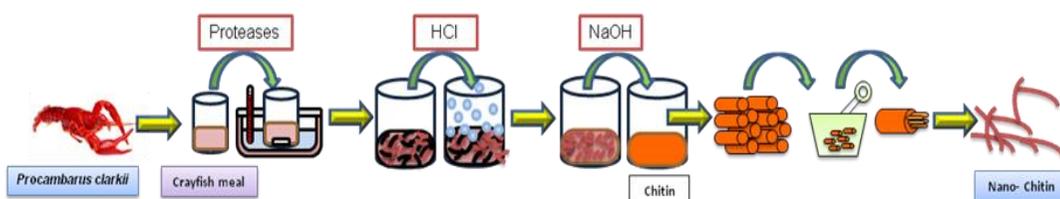
<sup>b</sup> Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba, Ecuador,  
[jannethjara@hotmail.com](mailto:jannethjara@hotmail.com)

#### **Abstract:**

Nanochitin fibers (NChC) were prepared from crawfish chitin (*Procambarus clarkii*) by-products. Raw chitin has been obtained by two different processes: **Process A** consists of a first deproteinization with a protease treatments, followed by a demineralization *in situ* by lactic acid fermentation (1) and a second deproteinization by alkaline treatment; **Process B** consists of acid demineralization step, followed by an enzymatic treatment with proteases and a final alkaline treatment. The concentration of raw crab chitin obtained from Process-A and -B determined as N-acetyl-glucosamine is  $85 \pm 1.8\%$  and  $83 \pm 2.3\%$ , being a chitin of good quality, similar to that commercially available for food and medical uses. Subsequently, the preparation of chitin nanofibers were carried out disintegrating the chitin aggregates by a milling process. After a treatment cycle with a wet-type grinder, the chitin suspension

formed a gel; disintegration was achieved due to a high surface-to-volume ratio. Obtaining highly uniform chitin fibers with a width of approximately 10 nm which still maintained their original chemical and crystalline structures (2,3). The obtained product can be used for industrial applications in pharmacy, cosmetic, agriculture and wastewater treatments.

### Graphical abstract



### REFERENCES

1. Bautista et al., (2001). *Process Biochemistry*, 37: 229-234.
2. Abe K., et al., (2007). *Biomacromolecules*. 8: 3276–3278.
3. Ifuku S., (2014). *Molecules*, 19: 18367-18380.

#### Financial support and/or acknowledgments

- Spanish Ministry of Science and Innovation (project RTC-2015-4039-2), FEDER funds of the European Union.
- CITIUS, Universidad de Sevilla, Servicio de Biología, Invernadero y Servicio de Microanálisis.

## Anexo 9:

*XIII EUCHIS & VIII SIAQ***USE OF CRAYFISH (*Procambarus clarkii*) CHITIN AS CARBON SOURCE FOR THE PRODUCTION OF CHITINASES BY SUBMERGED FERMENTATION**

Pilar Carbonero Aguilar, Gonzalo Falcón García, **Anabell Urbina Salazar**, Alberto Inca Torres and Juan Bautista.

There is an increasing interest in chitinases for its uses in biocontrol and control of plagues, so as for the production of chitino-oligosaccharides (elicitors) (1). But an effective practical use requires a viable production of these enzymes. For that purpose it is necessary to have an abundant, easily acquired, seasonally independent and cheap fermentation media, obtained by environmentally friendly processes. Such a fermentation media can be obtained from crayfish (*Procambarus clarkii*) sub-products by treatment with enzymatic and chemical procedures which originate a chitin enriched fraction. This chitin enriched fraction can be used as carbon sources and as an inductor for chitinase production by fermentation procedures, using defined media culture (Media-I, -II, -III and -IV) inoculated with a genetically modified *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 (2).

Production of chitinase was studied in the following media: Media-I: Coloidal Chitin (positive control); Media-II: *P. clarkii*-Chitin (65.3±2,7 %); Media-III: *P. clarkii*-Chitin (78±3,2 %) and Media-IV: *P. clarkii*-Chitin (23.1±1.03. %). Our results show that the production of chitinase activity is higher than that observed with colloidal chitin (prepared from commercial chitin, and used as positive control). Chitinase productivity after 7 days of growth was of 73.25 mU/L/day. Secretion of chitinase to culture medium was studied by electrophoretic methods, and two bands with molecular mass around 91 and 75 kDa were detected. These results show that the growth of *B. licheniformis* ATCC 21415 in a medium formulated with *P. clarkii*-Chitin, could be a good procedure for the regular production of chitinases.

**References**

1. S. Das, D. Roy, R. Sen., (2016). Utilization of Chitinaceous Wastes for the Production of Chitinase. *Advances in Food and Nutrition Research*. Volume 78, pp. 27–46
2. Saima, M. Kuddus, Roohi, I.Z. Ahmad, (2013). Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 11, 39–46

**Anexo 10:*****XIII EUCHIS & VIII SIAQ*****Production of Crawfish (*Procambarus clarkii*) enriched fractions by enzymatic procedures for fermentation uses and chitin-oligosaccharides.**

Falcón-García G., Carbonero-Aguilar P., Inca-Torres A.R., **Urbina-Salazar A.R.**, and Bautista J.

Currently, chitin, chitosan, and their derivatives are widely used in chemistry, medicine, pharmacy, cosmetics, food technology, water treatment, etc. [1,2].

A prerequisite to increase the use of chitin is the development of environmental friendly manufacturing processes, or the development of profitable processes to recover chitin and other products such as proteins, protein-hydrolyzates and pigments, if crustacean-processing waste products are used as starting material [3]. Traditional methods for the commercial preparation of chitin from crustacean shell (exoskeleton) involve alternate hydrochloric acid and alkali treatment stages to remove calcium carbonate and proteins, respectively, followed by a bleaching stage with chemical reagents to obtain a colourless product. These processes are highly contaminant [2].

Therefore, the development of environmental friendly processes is of high interest.

The in-situ production of lactic acid at low cost from agroindustrial by-products, and protease treatment could contribute to the development of this type of processes for the recovery of chitin.

In this work, we report on the in-situ production of lactic acid using crayfish meal supplemented with brewer's grains soluble as fermentation media, for the demineralization of crayfish exoskeleton followed by protease treatment as deproteinization step.

**References**

1. Fatma Gassara, Candice Antzak, Chandran Matheyambath Ajila, Saurabh Jyoti Sarma, Satinder Kaur Brar, M. Verma. Chitin and chitosan as natural flocculants for beer clarification Journal of Food Engineering 166 (2015), 80–85
  2. Imen Hamed , Fatih Ozogul, Joe M. Regenstein. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. Trends in Food Science & Technology 48, (2016), 40–50
- J. Bautista\*, M. Jover, J.F. Gutierrez, R. Corpas, O. Cremades, E. Fontiveros , F. Iglesias, J. Vega. Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production, Process Biochemistry 37 (2001) 229–234

**Anexo 10:****5th International Conference Enzymes in the Environment. Ecology, Activity and Application. Bangor, Gales, Reino Unido. 2016****OBTAINING A SOIL BIOSTIMULANT FROM SEWAGE SLUDGE: EFFECT ON SOIL BIOCHEMISTRY**

Bruno RODRIGUEZ-MORGADO\* (bromo@us.es); Pablo CABALLERO JIMENEZ; Alberto Renato INCA TORRES; **Anabell URBINA SALAZAR**; Juan PARRADO RUBIO\*, *Dept. Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, Spain*; Manuel TEJADA MORAL, *Dept. Crystallography, Mineralogy and Agricultural Chemistry, University of Seville, Spain*

Sewage sludge is a byproduct of wastewater treatment plants. These sludges present a serious problem because current management consists mainly in composting, a process that requires large amounts of space and time, resulting in a final product with low added-value. In order to promote a more dynamic use of sewage sludge while increasing their added-value, we implemented a fermentative technology using *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, a microorganism widely used in industry, that excreted different hydrolytic enzymes, which together with the *Bacillus* itself have a great potential in soil applications. We studied both the production of various enzymes associated with geochemical cycles, such as proteases, cellulases, lipases, etc., and the total production of extracellular proteins by proteomic analysis thereof. Finally, we have applied these fermented products as edafic biostimulants, evaluating its effect on the biochemical properties of soil, mainly in enzymatic activities related to microbiota, such as dehydrogenase, phosphatase and glucosidase.

**References**

1. Parrado, J., Rodríguez-Morgado, B., Tejada, M., Hernández, T., & García, C. (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme and microbial technology*, 57, 1-7.
2. Tejada, M., García-Martínez, A. M., Rodríguez-Morgado, B., Carballo, M., García-Antras, D., Aragón, C., & Parrado, J. (2013). Obtaining biostimulant products for land application from the sewage sludge of small populations. *Ecological engineering*, 50, 31-36.

## Anexo 11: Artículo 1

Waste and Biomass Valorization  
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>

ORIGINAL PAPER



## Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium

Anabell del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup> · Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup> · Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup> · Pilar Carbonero-Aguilar<sup>1</sup> · Bruno Rodríguez-Morgado<sup>1</sup> · José A. del Campo<sup>3</sup> · Juan Parrado<sup>1</sup> · Juan Bautista<sup>1</sup>

Received: 24 January 2018 / Accepted: 7 May 2018  
 © Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

### Abstract

**Purpose** The aim of this work was to evaluate the use of chitin-rich mushroom (*Agaricus bisporus*) by-products chitin/glucan enriched fraction (M-Ch/G-F) as main carbon source for the production of chitinases by three different microorganisms (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* and *Bacillus licheniformis*), in an attempt to obtain these enzymes using a cheap and abundant fermentation medium.

**Methods** Microorganisms were grown in submerged fermentation using different media formulated with chitin powder ( $Ch_p$ ), colloidal chitin ( $Ch_c$ ) and M-Ch/G-F as the main carbon source, respectively. Enzyme productivity and secretion (secretome) was studied by electrophoretic and proteomic methods.

**Results** All microorganisms produced higher chitinase activity in a medium formulated with M-Ch/G-F as a carbon source compared to medium formulated with  $Ch_p$  or  $Ch_c$ . *T. harzianum* showed the highest chitinase productivity (261.5  $mU L^{-1}$  per day). Chitinase production was monitored by electrophoretic and proteomic methods. Electrophoretic method allowed the detection of 28 different proteins—three different chitinases with 82, 50 and 31 kDa. Proteomic analysis could identify 161 different proteins: 60 of them hydrolases, and 80% having glycolytic activity—5 of them were chitinases. These results show that cultivation of *T. harzianum* in a cheap and abundant fermentation medium represents a good procedure for large scale production of chitinases.

**Conclusions** Our results show that cultivation of *T. harzianum* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F, a cheap and abundant fermentation medium, is a good procedure for large scale production of glycosidases, particularly chitinases within a relatively short cultivation period of 6 days.

### Graphical Abstract



**Keywords** Chitin-rich mushroom byproduct · *Trichoderma harzianum* · *Bacillus licheniformis* · *Agaricus bisporus* · Chitinase

✉ Juan Bautista  
 jbaut@us.es

Extended author information available on the last page of the article

### Abbreviations

M-Ch/G-F Mushroom chitin/glucan enriched fraction  
 Mm Minimal medium  
 GlcNAc *N*-acetylglucosamine  
 $Ch_p$  Chitin powder

Published online: 14 May 2018

Springer

Ch<sub>2</sub> Colloidal chitin  
PDB Potato dextrose broth

## Introduction

Chitin is the most abundant organic compound in nature after cellulose; it is a key structural component of most crustaceans, mollusks, insects, fungi, algae and marine invertebrates, constituting 75% of the weight of these microorganisms [1, 2]. Enormous amounts of this insoluble linear  $\beta$ -1,4-linked polymer of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) are synthesized in the biosphere, and about  $10^{11}$  metric tons are produced annually only in the aquatic biosphere [3].

Chitin is found in three polymorphic forms that differ in their molecular arrangement:  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -chitin [4].  $\alpha$ -Chitin is the most abundant, with an antiparallel configuration form. It presents a highly ordered crystalline structure, caused by strong H-bonding, which leads to a rigid, intractable and insoluble structure. It is assumed that chitin plays a skeleton role.  $\beta$ -Chitin, with a parallel configuration and weak H-bonding, is unstable and soluble in water; while  $\gamma$ -chitin is a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chitin and presents intermediate properties [5]. The latter two have more flexible mechanical properties and are easily degraded by enzymes (chitinases).

The enzymatic hydrolysis of chitin to acetyl-D-glucosamine is carried out by a two-hydrolases system: chitinases and chitobiases. Chitinases are enzymes that degrade chitin, being synthesized mainly by bacteria and fungi, and according to the mechanism, are classified into two broad categories: endochitinases (EC 3.2.1.14) and exochitinases. The former randomly divided chitin into the internal sites of the reducing end, thereby forming the dimeric di-cetylchylbiose and the low molecular mass soluble multimers of GlcNAc, such as chitotriose, chitotetraose and chitopentose. The exochitinases act on the non-reducing end of the chain, and are divided into two subcategories: chitobiosidases (EC 3.2.1.29), involved in the catalysis of the progressive release of di-acetylchylbiose from the non-reducing end of the chitin microfibril, and the *N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52), that cleaves the oligomeric products of endochitinases and chitobiosidases generating GlcNAc [6].

These enzymes have high potential applications in the pharmaceutical, food and agronomic industry, and can be used in biocontrol against phytopathogenic fungi or to enhance insecticidal activity because they are not toxic, biodegradable, and biocompatible [2]. They can be used for biological control on plants because their mechanism against infection of fungal pathogens, which allows their use as an alternative pesticide, avoiding the use of chemical pesticides that are expensive, pollute the environment and produce resistance to certain pathogens.

One of the major bottlenecks for the industrial application of enzymes is the high production cost, where culture media may represent up to 40% of the total production costs [7]. Thus, great interest in the development of efficient and cheap cultivation media has arisen. Among the media developed to address this issue, those derived from agro-industrial byproducts are of special interest, and in particular those based on the use of mushroom byproducts due to the high growth rate of *Trichoderma* on media formulated with this substrate, its abundance, low cost and independence of the annual season.

Among the microorganisms that produce chitinases, *Bacillus* and *Trichoderma* species are of industrial interest. *Bacillus licheniformis* is a gram-positive microorganism isolated from soil and plant material [8] and used in large-scale industrial production of exoenzymes, as it can secrete large amounts of proteins [9]. *Trichoderma* spp., a common soil fungus belonging to Mitosporic Fungi group, is used in agriculture as biological control agent because of its properties as biopesticide and biofertiliser.

The aims of this study were: (i) to produce chitinolytic enzymes in a cheap and abundant fermentation media (mushroom byproducts); and (ii) to investigate enzyme expression patterns of chitinolytic-producing microorganisms of industrial interest: *B. licheniformis*, *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*, growing on different cultivation media formulated with chitin-rich byproducts, using electrophoretic and proteomic methods for monitoring production.

## Materials and Methods

### Microorganisms

*Bacillus licheniformis* ATCC 21415 was obtained from American Type Culture Collection, stored at  $-80$  °C and refreshed 24 h before inoculation in LB medium ( $10$  g L<sup>-1</sup> peptone,  $5$  g L<sup>-1</sup> yeast extract, and  $10$  g L<sup>-1</sup> NaCl, adjusted to pH 7), and incubated at  $37$  °C. *T. atroviride* CEC-T03 and *T. harzianum* CEC-T24 were obtained from Spain Type Culture Collection (Burjasot, University of Valencia, Spain).

### Culture Medium and Growth Conditions

Microorganisms were grown in seven different culture media in aerobiosis, with mechanical stirring, whose composition is shown in the Table 1.  $150$  mL of medium, pH 7.0 for *B. licheniformis*, and pH 6.0 for *Trichoderma*, was dispensed into  $500$  mL flasks and sterilized at  $121$  °C for  $20$  min. The flasks were inoculated in triplicate and grown for  $14$  days as described below. Minimal medium (Mm) is composed by the following components:  $8.2$  g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

## Waste and Biomass Valorization

**Table 1** Composition of the culture media

Culture medium	Mm (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	Ch <sub>p</sub> (%)	Ch <sub>c</sub> (%)	M-Ch/G-F (%)	PDB (%)	Czapek medium
H <sub>2</sub> O/Ch <sub>p</sub>	–	150	1	–	–	–	–
H <sub>2</sub> O/Ch <sub>c</sub>	–	150	–	1	–	–	–
M <sub>m</sub> /Ch <sub>p</sub>	150	–	1	–	–	–	–
M <sub>m</sub> /Ch <sub>c</sub>	150	–	–	1	–	–	–
PDB/Ch <sub>c</sub>	–	–	–	1	–	150	–
Czapek's/Ch <sub>c</sub>	–	–	–	1	–	–	150
M-Ch/G-F	150	–	–	–	2	–	–0

Ch<sub>p</sub> chitin powder, Ch<sub>c</sub> colloidal chitin, M<sub>m</sub> minimal medium, PDB Potato Dextrose Broth, M-Ch/G-F mushroom Chitin/Glucan enriched fraction

M<sub>m</sub> composition: 8.2 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mushroom peptone 10 g L<sup>-1</sup> and 10 mL L<sup>-1</sup> of trace element solution

Composition of trace element solution (g L<sup>-1</sup>): 0.55 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.67 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.10 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.17 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.043 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.06 g CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

3.8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> NaCl, 2 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mushroom peptone 10 g L<sup>-1</sup> and 10 mL L<sup>-1</sup> of trace element solution; and the composition of trace element solution (g L<sup>-1</sup>) is: 0.55 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.67 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.10 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.17 g ZnCl<sub>2</sub>, 0.043 g CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.06 g CoCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

### Preparation of Carbon Sources

#### Preparation of Colloidal Chitin

Colloidal chitin (Ch<sub>c</sub>) was prepared according to the method described by Ramírez et al. [10] with slight modifications. Briefly, 10 g of chitin powder were mixed with 200 mL of cold concentrated HCl (37%), maintaining constant and vigorous agitation for 24 h at 4 °C. Then, 96% ethanol was added to a final volume of 2 L and stirred vigorously. After 24 h incubation at –20 °C, the suspension was centrifuged at 5000×g for 20 min. Finally, the precipitate was washed with distilled water until the pH of the supernatant reach a value of 7 ± 0.1, and the former dissolved in the appropriate buffer.

#### Preparation of Mushroom Chitin/Glucan Enriched Fraction (M-Ch/G-F)

M-Ch/G-F was prepared according to the procedure described by Bautista et al. [11]. Briefly, 1000 g of mushroom (*Agaricus bisporus*) meal was suspended in 10 L of 100 mM phosphate buffer of pH 7.8 and treated with Alcalase (Novozyme) in a 1/50 enzyme/substrate (w/w) ratio and hydrolyzed for 3 h at 55 °C. The hydrolysate was centrifuged at 4 °C for 15 min at 10,000×g, the supernatant was discarded and the precipitate was treated three times with 10 L of tap water and autoclaved at 121 °C for 20 min, cooled at room temperature in a water bath at 22 °C, and centrifuged

at room temperature for 15 min at 10,000×g. The supernatant was discarded and the precipitate used as M-CH/G-F.

### Bacillus licheniformis Growth

*Bacillus licheniformis* was grown on sterilized culture media, prepared as shown in Table 1, inoculated with 15 mL of inoculum grown in brain heart infusion (BHI)-broth at 37 °C and pH 7 until fermentation-broth reach a 30% of transmittance (approximately for 18 h), and grown for 14 days at 37 ± 1 °C with constant stirring (150 rpm). Aliquots of 5 mL were taken every day, and stored at –20 °C until use for biomass and enzymatic activity analyses.

### Trichoderma Growth

*Trichoderma atroviride* and *T. harzianum* were grown in the culture media described above (Table 1). 2 mL of an aqueous 2% (w/v) MgCl<sub>2</sub> spore suspension (1 × 10<sup>7</sup> spores mL<sup>-1</sup>) of *T. atroviride* or *T. harzianum* grown on solid Czapek medium containing 4% glucose as a carbon source was used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL medium, and grown for 14 days at 28 ± 1 °C with constant stirring (150 rpm). Aliquots of 5 mL were taken every day, and stored at –20 °C until use for biomass and enzymatic activity analyses.

### Biomass Assay

Biomass was determined directly in the thawed samples. For *B. licheniformis*, the growth was followed by direct measurement of transmittance of the samples 1:100 diluted with water. Biomass concentration was determined by interpolation from a standard curve of biomass against %T. For *T. harzianum* and *T. atroviride* biomass was estimated indirectly by quantifying ergosterol [12]. Biomass concentration

was calculated by interpolation in a standard curved biomass against ergosterol.

### Enzymatic Assays

For determination of the enzymatic activity samples were centrifuged at  $12,000\times g$  for 20 min, and the obtained supernatants were used for enzymatic assays and electrophoretic analysis.

### Chitinase Assay

Chitinase activity was determined by measuring the reducing sugars produced from colloidal chitin, using the dinitrosalicylic acid (DNS) method [13]. Briefly, the reaction mixture, consisting of 0.25 mL of 1% (w/v) colloidal chitin, 0.25 mL of Tris-HCl (pH 7.4) and 0.50 mL of enzyme sample, was incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 1 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) aqueous solution, and the mixture heated for 10 min in a boiling water bath. After cooling, the absorbance of the solution was determined at 575 nm using an Ultrospec 2100pro UV/Visible spectrophotometer (GE Healthcare, Barcelona, Spain). In parallel, the same volume of deionized water was used negative control. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that produced 1 mg mL<sup>-1</sup> of reducing sugar per 1 h at 37 °C. The concentration of the reducing sugar was determined by interpolation in a standard curved prepared with GlcNAc.

**Preparation of Dinitrosalicylic Acid Aqueous Solution** Ten grams of DNS were dissolved in 200 mL of 2 M NaOH solution. Subsequently, 300 g of sodium potassium tartrate, 5 g of steamed phenol, and 5 g of sodium sulfite were added to 800 mL of hot deionized water. The volume was adjusted to 1 L using pre-cooled deionized water to obtain DNS aqueous solution.

### Protein Assay

Protein was quantified by the method of Bradford with bovine serum albumin as standard [14].

### SDS-PAGE Protein Profiling

Extracellular protein profile was obtained by SDS-PAGE. After precipitation with HCl-acetone, pH 2.0, the pellet was solubilized in the buffer used for sample preparation—1 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 5% (w/v) SDS and 7% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. Samples were kept at room temperature for 2 h, and then centrifuged at  $12,000\times g$  for 15 min. Supernatant was collected and run in triplicate on 12% gel, each replicate containing 20  $\mu$ L of supernatant (approximately

50  $\mu$ g of protein) and 5  $\mu$ L of loading buffer—0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 10% (w/v) SDS, 5% (v/v) bromophenol blue. Samples were boiled for 5 min, centrifuged at  $10,000\times g$  for 30 s and cooled before being loaded on the gel. Electrophoresis was carried out at constant intensity (25 mA) using a Tris-glycine buffer system containing 0.1% SDS until the bromophenol front ran out the gel. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) and/or silver staining (GE Healthcare, Barcelona, Spain) and digitized on Gel Doc™ XR+ Imaging system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Gels for proteomic analysis were not stained.

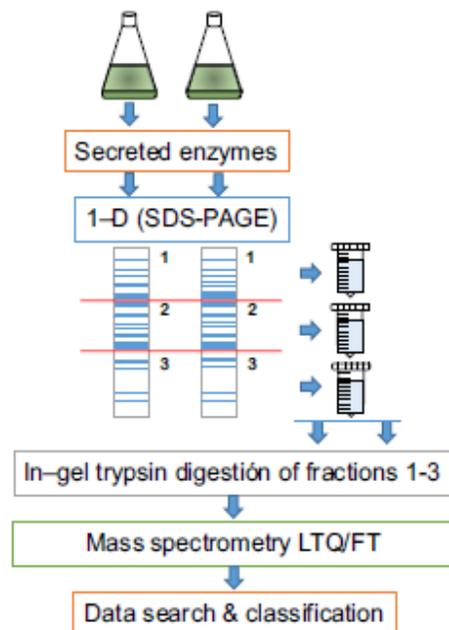
### Zymogram Analysis

For zymogram analysis of chitinase, 10% separating gel containing 0.1% colloidal chitin as the substrate of chitinase was used to detect chitinase activity. Samples were mixed with loading buffer without reducing agent and heated prior to loading in the electrophoresis gel. After electrophoresis, gel was incubated in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 4 °C for 18 h. Chitinase activity on the gel was visualized by staining with 0.1% Congo Red followed by de-staining with 1 M NaCl. The lytic zone on the gel observed at daylight against a dark red background indicated the presence of active enzyme [15].

### Proteomic Study

The global process followed in this study is schematically shown in Fig. 1.

Briefly, protein preparations (50  $\mu$ g proteins per line) were separated by electrophoresis in 12% SDS polyacrylamide gels as described above. Each of the unstained gel lanes was divided into three slices and each slice placed in a different tube. After fractionation of each slice in smaller pieces, it was individually "in gel" processed, following the protocol described in [16]. Each slice was incubated in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 30% (v/v) acetonitrile at 30 °C for 120 min. The proteins within the pieces were reduced with 10 mM dithiothreitol for 20 min. After washing with 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, the gels were alkylated by incubation in 20 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. The alkylated samples were washed with 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and dehydrated with 100% ACN. Proteins in gel were digested with sequencing-grade modified porcine trypsin (Promega, Madrid, Spain) in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> at 37 °C overnight. Tryptic peptides were extracted twice from the gel pieces with 50% (v/v) ACN, and dried by vacuum in a Savant. The dried peptides were stored at -80 °C until analysis by nano-liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nLC-MS/MS). Briefly, the digested peptides were resuspended in Milli-Q water and desalted with



**Fig. 1** Scheme of the experimental design used for proteomic analysis of *T. harzianum*-294 secretome

buffer-A (99.9% water + 0.1% formic acid) onto a Zorbax 300 SB-C18, 5 × 0.3 mm, peptide trap column (Agilent, Madrid, Spain) for 10 min. Bound peptides were eluted onto a 10 cm × 75 μm Picofrit column packed with Microm Magic C18 AQ and eluted over 120 min with a gradient of 5% buffer-B (99.9% acetonitrile + 0.1% formic acid) to 50% buffer-B in 75 min, then 50% buffer-B to 90% buffer-B from 75 to 79 min using a Thermo Electron Surveyor HPLC. The peptides were eluted into a Thermo Electron LTQ/FT mass spectrometer at a flow rate of 250 nL min<sup>-1</sup>. Survey scans were taken at a resolution of 100,000 and the top ten ions in each survey scan were subjected to automatic low-energy collision-induced dissociation (CID) in the linear trap (LTQ). Fragment tolerance was set at 0.80 Da (monoisotopic), and the parent tolerance was of 200 ppm (monoisotopic). Complete and partial residue modifications were allowed as well as point mutations and two missed cleavage sites. For probabilistic validation of protein identifications in the *T. harzianum* proteome (v. 2.0, DOE Joint Genome Institute) Scaffold version 01.07.00 (Proteome Software, Portland, Oregon) was applied, using for that purpose the X-Tandem and Protein Prophet computer algorithms [17,

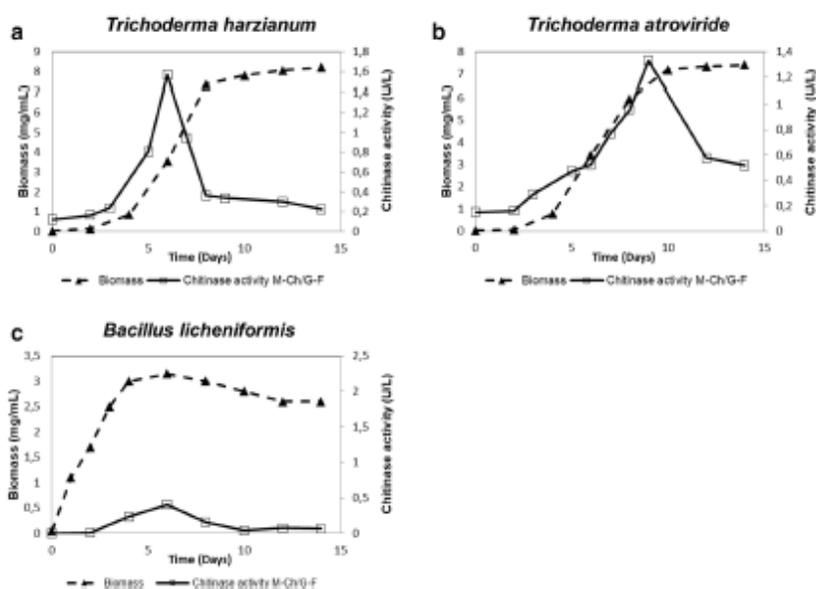
18]. Minimum criteria for positive identification were set at least two peptides and a probability > 95%.

## Results and Discussion

The biotechnological interest of lytic enzymes (chitinases, β-glucanases and others) is mainly due to its high potential applications in pharmaceutical, food and agronomic industry, and particularly because they can be used in biocontrol against phytopathogenic fungi or to enhance insecticidal activity in pests treatments. Consequently, the production of these enzymes in high quantities at low costs is very desirable.

Usually these enzymes are produced in the presence of specific substrates (chitin, glucans, etc.) by specific inductive mechanisms. Therefore, the main studies on the secretion of these enzymes have been conducted using inactivated mycelium or cell walls of different pathogens, such as *Guignardia citricarpa* [19], *Pythium* sp., *Sclerotium rolfsii* or *Rhizoctonia solani* [20] as specific substrates (main carbon source). However, few studies have been carried out using abundant and cheap substrates such as chitin-rich agroindustrial byproducts to improve the production of these lytic enzymes (chitinases and glucanases, ...). In this respect, the production of chitinase and β-glucanase activities by *B. licheniformis*, *T. harzianum* and *T. atroviride* growing for 14 days in culture medium containing chitin-rich substrates (chitin powder, colloidal chitin and M-Ch/G-F as carbon sources) was studied. Figure 2a, b, and c shows typical growth curves of *T. harzianum*, *T. atroviride* and *B. licheniformis* grown on a medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source. Similar results, but with lower biomass production were obtained for the other culture media. Table 2 summarizes the results obtained after 14 days of growth in the different culture media under study.

As shown in Table 2, the growth of *T. harzianum* and *T. atroviride* in the culture medium formulated with M-Ch/G-F is significantly greater than in the Czapeck's/Ch<sub>c</sub>, PDB/Ch<sub>c</sub> or Mm/Ch<sub>c</sub> culture medium; while *B. licheniformis* growth is similar in a culture medium formulated with PDB/Ch<sub>c</sub> or M-Ch/G-F. However, the growth of all three microorganisms is better in colloidal chitin than in chitin powder as carbon source, probably due to the amorphous structure present in colloidal chitin that facilitate the action of chitinase, in contrast to the crystalline structure of chitin powder. Greater growth observed for the three microorganism studied in the culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source can be explained by the presence of chitin and glucans as carbon source, which, probably, could be used easier by the microorganism by liberating fermentable sugar in a more efficient manner than from chitin.



**Fig. 2** Time course study of Biomass (spaced dashed line with triangle) and chitinase activity (dashed line with square) of: **a** *T. harzianum*, **b** *T. atroviride*, and **c** *B. licheniformis*, grown on a medium with M-Ch/G-F as main carbon source

**Table 2** Biomass production in the different culture media after 14 days growth

Culture medium	<i>T. harzianum</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>T. atroviride</i> (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>B. licheniformis</i> (mg mL <sup>-1</sup> )
H <sub>2</sub> O/Ch <sub>p</sub>	–	–	0.2±0.2
H <sub>2</sub> O/Ch <sub>c</sub>	–	–	1.3±0.1
Mm/Ch <sub>p</sub>	0.7±0.2	0.5±0.3	0.4±0.1
Mm/Ch <sub>c</sub>	3.2±0.4	2.9±0.2	2.3±0.3
PDB/Ch <sub>c</sub>	4.6±0.5	3.7±0.3	2.6±0.2
Czapeck'w/Ch <sub>c</sub>	0.2±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1
M-Ch/G-F	8.2±0.6	7.4±0.4	2.7±0.4

Ch<sub>p</sub> chitin powder, Ch<sub>c</sub> colloidal chitin, Mm minimal medium, PDB Potato Dextrose Broth, M-Ch/G-F mushroom Chitin/Glucan enriched fraction

Figure 2(a, b and c, biomass curves) shows the growth of *T. harzianum*, *T. atroviride* and *B. licheniformis* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source. Figure 2(a, b and c, activity curves) also shows the production of chitinase by the three studied microorganisms grown in a culture medium with M-Ch/G-F as main carbon source. These results show that *Trichoderma* produced more chitinase activity than *B. licheniformis* grown in the same

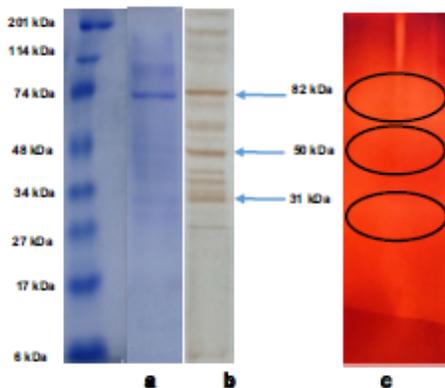
culture medium. In all three cases a maximum of production is observed 261.5 mU L<sup>-1</sup> per day, 147.6 mU L<sup>-1</sup> per day and 67.83 mU L<sup>-1</sup> per day at day 6, 9 and 6, after which the activity is drastically reduced, probably owing to induction of protease production [21]. It was also observed that the production of chitinase is lower in the culture medium formulated with colloidal chitin than in that formulated with M-Ch/G-F as main carbon source (results non shown). The production of β-glucanases, the other main group of enzymes involved in the degradation of mycelial walls of pathogen, is also induced in the culture medium with M-Ch/G-F as main carbon source [11].

Taking into account the above results, we focused our work on *Trichoderma* as source for production of chitinase using M-Ch/G-F as carbon source for formulation of culture medium. Our results using M-Ch/G-F are similar to those described by other groups using chitin-rich substrates such as fungi cell walls [19, 20]. These results suggest that the regulation of the expression of chitinases and β-glucanases in these fungi can be influenced by the amount and complexity of the chitin and β-glucan present in the culture medium. Fungal cell walls are composed mainly by β-1,3 and β-1,6-glucans (a glucose polymer) linked to chitin (GlcNAc polymer) via β-1,4 bonds. This chitin/glucan complex is linked to other polysaccharides whose composition varied

with the species (galactomannan, mannan and galactosaminogalactan). These polysaccharides constitute 80–85% of the mass of cell wall, while glycoproteins constitute the remaining 20–15% [22].

The chitinases and glucanases enzymes are constitutively produced by *Trichoderma*, but in the presence of their substrates (chitin, chitinoligosaccharides, glucans, glucanoligosaccharides) the production of these enzymes is clearly induced [23, 24]. The induction of the hydrolytic activities (chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase) suggests that these enzymes may be involved in the mycoparasitism process of *T. harzianum* and *T. atroviride* against pathogen fungi. In relation to this behavior, it is known that chitin and  $\beta$ -1,3-glucans are structural components of the fungal wall, suggesting that chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *T. harzianum* and *T. atroviride* are important elements of cell lysis enzymes during mycoparasitic action [21, 25]. But probably other enzymes are also involved in the process of cell wall lysis of pathogens (mycoparasitism). To obtain more information about the involvement of these and other proteins in the mycoparasitism and/or cell lysis mechanisms, we studied the set of proteins excreted (secretome) by *T. harzianum* using electrophoretic and proteomic techniques.

Proteins of *T. harzianum* growth on the culture medium formulated with M-Ch/G-F separated by SDS-PAGE are shown in Fig. 3. As this figure shows, while only 14 bands are clearly distinguished in Coomassie Blue stained gel, in the silver stained gel 28 bands could be clearly detected; three of them with molecular mass 82, 50 and 31 kDa could



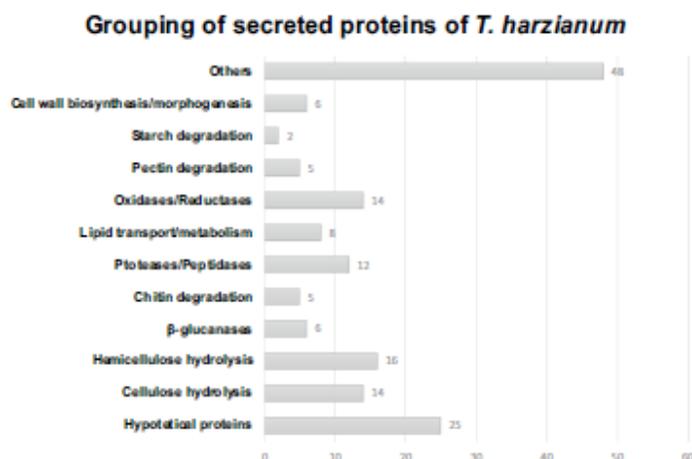
**Fig. 3** Electrophoretic separation by SDS-PAGE of proteins secreted by *T. harzianum* growth on an M-Ch/G-F formulated culture medium. Molecular weight standards: myosin 201 kDa,  $\beta$ -galactosidase 114 kDa, Bovine Serum Albumin 74 kDa, ovalbumin 48 kDa, carbonic anhydrase 34 kDa, soybean trypsin inhibitor 27 kDa, lysozyme 17 kDa, aprotinin 6 kDa [a Coomassie Blue staining; b silver staining and c activity staining (zymogram)]

correspond to chitinases secreted by *T. harzianum* in the culture medium. However, when the gel lanes were divided into three slices and each slice was individually “in gel” processed with trypsin and the digested samples analyzed by proteomic procedures, 161 *T. harzianum* specific proteins were identified, versus the 91 proteins identified when *T. harzianum* was grown in a colloidal chitin formulated culture medium (results not shown). This behavior is probably due to the presence of glucans as carbon source in the culture medium formulated with M-Ch/G-F, which could induce the production of  $\beta$ -glucanases.

The current understanding of the enzymes involved in the effective hydrolysis of complex substrates is greatly facilitated by the modern proteomics and bioinformatics techniques. The first proteomic investigation into the secretome of *Trichoderma*, specifically in *T. reesei* [26], identified 36 proteins, the majority of them linked to cellulose and hemicellulose hydrolysis. More recently, studies using iTRAQ-systems have enabled quantitative analysis of the secretome, in which 636 secreted proteins were identified, 230 of them (36%) associated with cellulolytic and proteolytic enzymes [27]. In this study, a proteomic approach using nLC-MS/MS was used to analyze the *T. harzianum* secretomes growth for 6 days (maximum production of chitinase activity) on a culture medium with M-Ch/G-F as main carbon source. In total, 357 proteins were identified in the supernatant—161 of them proteins specific of *T. harzianum*, and the rest (196 proteins) proteolytic fragments of the specific proteins, probably generated by the secretion of proteases and peptidases to the growth medium. Within the *T. harzianum* secretome, N-terminal Sec-dependent secretion signals [28] were identified in silico for 85 proteins (52.8% of the total proteins detected), with 76 secreted proteins being predicted for *T. harzianum*. The presence of more than 47.2% of the proteins in the secretome without predicted secretion signals indicates possible cell lysis, cell death or non-classic secretory mechanisms.

The proteins secreted by *T. harzianum* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source were grouped according to their biological function (Fig. 4). As can be observed, within the *T. harzianum* secretome, 60 proteins (37.3% of total secreted proteins) were identified as having hydrolytic activity, and 80% of them having glycolytic activity (cellulase, hemicellulase, glucanase, chitinase, pectinase and starch degrading enzymes), relevant to cellulose, hemicellulose, glucan and chitin degradation. In addition to the glycolytic-related enzymes, the *T. harzianum* secretome contained a set of proteases and peptidases (12 proteins), involved in lipid transport and metabolism (8 proteins), proteins implicated in oxidation/reduction processes (14 proteins), in cell wall biosynthesis and morphogenesis (6 proteins), and 48 proteins with no-clear function. Of special interest for us are the five chitinases described in

**Fig. 4** Grouping of secreted proteins of *T. harzianum* grown on a culture medium formulated with M-Ch/G-F as main carbon source, according to its biological function



this work which can be related with the three bands found by electrophoretic studies.

## Conclusions

The obtained results show that cultivation of *T. harzianum* in a culture medium formulated with M-Ch/G-F, a cheap and abundant fermentation medium, is a good procedure for large scale production of glycosidases, particularly chitinases within a relatively short cultivation period of 6 days. Enzyme recovery by ultrafiltration, followed by ethanol fractionation, represents a promising process for the preparation of products with high chitinolytic activity (further studies underway). Immobilization of these enzymes on nano- or micro-particles as appropriate vehicle for their application as powders or sprays for the treatment of insect pests or other applications in biocontrol is a pending goal.

**Acknowledgements** We are grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support of this work (Project RTC-2015-4039-2), which has partial financial support from the FEDER funds of the European Union. J.A. del Campo was supported by *Nicolás Monardes Program* from Servicio Andaluz de Salud (SAS). The authors thank Paula Bautista for assistance in the preparation of the manuscript.

## References

- Shaikh, S.A., Deshpande, M.V.: Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 468–475 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF00328035>
- Barboza-Corona, J.E., Reyes-Rios, D.M., Salcedo-Hernández, R., Bideshi, D.K.: Molecular and biochemical characterization of an endoquitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-73. *Mol. Biotechnol.* **39**, 27–29 (2008). <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9025-4>
- Tsujiho, H., Orikoshi, H., Shiotani, K., Hayashi, M., Umeda, J., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y., Inamori, Y.: Characterization of chitinase C from marine bacterium *Aeromonas* sp. strain 0-7, and its corresponding gene and domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 472–478 (1998)
- Fortuna-González, J.M.: Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Doctoral thesis. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México, (2010)
- Sastoque, C.: Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis para optar el título de microbiólogo industrial, agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia (2005)
- Sahai, A.S., Manocha, M.S.: Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *Microbiol.* **11**, 317–338 (1993). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x>
- Gessesse, A.: The use of Nug meal as a low cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresour. Technol.* **62**, 59–61 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00059-X)
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore (1986)
- Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P.: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**, 1–17 (2004). <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Ramírez, M.G., Avelizapa, L.I., Avelizapa, N.G.R., Camarillo, R.C.: Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *J. Microbiol. Methods* **56**, 213–219 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.011>
- Bautista, J.: CHAMPI-D. Project RTC-2015-4039-2 (2015)
- Göts, S., Schumann, R., Hübner, N., Karsten, U.: Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll *a* as biomarkers. *Int. Biodeterior.*

- Biodegradation **60**, 50–59 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.biode.2006.10.003>
13. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959)
  14. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  15. Yamahai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jarusanee, N., Buranabanyat, B.: Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnol. J.* **133**, 50–57 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.005>
  16. Carbonero-Aguilar, P. Estudio de la oxidación de proteínas en ratas con encefalopatía hepática: una aproximación Proteómica. Doctoral thesis. Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain (2012)
  17. Craig, R., Beavis, R.C.: A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2310–2316 (2003). <https://doi.org/10.1002/rcm.1198>
  18. Nesvizhskii, A.I., Keller, A., Kolker, E., Aebersold, R.: A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658 (2003). <https://doi.org/10.1021/ac0341261>
  19. de Lima, F.B., Félix, C., Osório, N., Vitorino, A.A., Domingues, P., Correia, A., da Silva-Ribeiro, R.T., Esteves, A.C.: Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Gaïgnardía citricarpa*. *Biocontrol Sci.* **99**, 38–46 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.003>
  20. Giese, E.C., Corradi da Silva, M.I., Barbosa, A.M.: Fungal glucanase: production and application of  $\beta$ -1, 3 and  $\beta$ -1, 6-glucanases. *Rev. Biotechnol. Cienc. Desenvol.* **30**, 97–104 (2003)
  21. Mohamed, H.A.A., Wafaa, M.H., Attallah, A.G.: Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to over produce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potential against root rot and white mold diseases in plants. *Agric. Biol. J. N. Am.* **1**, 273–284 (2010)
  22. Latgé, J.P.: Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**, 863–872 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x>
  23. Rana, I.A., Loerz, H., Schaefer, W., Becker, D.: Over expression of chitinase and chitosanase genes from *Trichoderma harzianum* under constitutive and induced promoters in order to increase disease resistance in wheat (*Triticum aestivium*). *Mol. Plant Breed.* **3**, 37–49 (2012). <https://doi.org/10.5376/mpb.2012.03.0004>
  24. Gajera, H.P., Vakharia, D.N.: Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolated during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 43–52 (2012). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100005>
  25. Kubicek, C.P., Mach, R.J., Peterbauer, C.K., Lorito, M.: *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Plant Pathol. J.* **83**, 11–23 (2001). <http://www.jstor.org/stable/41998018>
  26. Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Mollé, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.C., Monot, F., Asther, M.: Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnol. Biofuels* **1**, 1–12 (2008). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-18>
  27. Adav, S.S., Chao, L.T., Sze, S.K.: Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Mol. Cell Proteomics.* **11**, 1–15 (2012). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012419>
  28. Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G., Brunak, S.: Improved prediction of signal peptide: signalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783–795 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>

## Affiliations

Anabell del Rocío Urbina-Salazar<sup>1,2</sup> · Alberto Renato Inca-Torres<sup>1,2</sup> · Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup> · Pilar Carbonero-Aguilar<sup>1</sup> · Bruno Rodríguez-Morgado<sup>1</sup> · José A. del Campo<sup>3</sup> · Juan Parrado<sup>1</sup> · Juan Bautista<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Panamericana Sur km 1 1/2, Riobamba, Ecuador

<sup>3</sup> CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, 41014 Sevilla, Spain

## Anexo 12: Artículo 2

Journal of Biotech Research [ISSN: 1944-3285]

2018; 9: 14-26

**Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge**

Alberto Renato Inca-Torres<sup>1, 2</sup>, Anabell Del Rocío Urbina-Salazar<sup>1, 2</sup>, Gonzalo Falcón-García<sup>1</sup>, Pilar Carbonero-Aguilar<sup>1</sup>, Bruno Rodríguez Morgado<sup>1</sup>, Juan Parrado<sup>1</sup>, Juan Bautista<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, C/ Professor García González nº2, 41012-Seville, Spain. <sup>2</sup>Polytechnical High School of Chimborazo, Faculty of Science, Panamericana Sur km 1 1/2, EC060155- Riobamba, Ecuador.

Received: January 23, 2018; accepted: March 27, 2018.

In this work, the production of hydrolytic enzymes by *Bacillus licheniformis* grown in media formulated with sewage sludge as the main carbon and nitrogen source with induction by keratins has been studied. The three main types of enzymes of industrial interest produced were proteases, lipases and cellulases. The addition of an inductor, keratin in our case, improves the production of these enzymes to reach a productivity of 16.89 mU/mL-day, 0.25 mU/mL-day, and 0.51 mU/mL-day for proteases, lipases and cellulases, respectively. The secretion of proteins and enzymes into the fermentation media was studied by electrophoretic and proteomic methods, which revealed the presence of proteases, lipases, and cellulases in the fermentation media, among other excreted proteins. Our results show that the growth of *B. licheniformis* in fermentation media formulated with sewage sludge as the main carbon and nitrogen sources, supplemented with keratin from feather meal as an inductor could be used for the industrial production of these enzymes, particularly of proteases.

**Keywords:** Hydrolytic enzymes; *Bacillus licheniformis*; sewage sludge; proteases; lipases; cellulases.

**Abbreviations:** GRAS: generally regarded as safe; CDDGs: corn dried distillers grains with solubles; TCA: trichloroacetic acid; DNS: dinitrosalicylic acid; EA: enzymatic activity; p-NPG: p-nitrophenyl- $\beta$ -glucopyranoside; MUB: Modified Universal Buffer; CBB: Coomassie Brilliant Blue.

\*Corresponding author: Juan Bautista, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, C/ Professor García González nº2, 41012-Seville, Spain. Phone: +34 954556854. E-mail: [jobaut@us.es](mailto:jobaut@us.es).

### Introduction

Industrial application of enzymes began in the mid-sixteen centuries, although its stable implementation was not achieved until the mid-twenty centuries, between 1950-1960 [1]. The main industrial applications of enzymes are in the production of food, textiles and detergents, representing approximately 90% of the market volume. Other applications, such as organic synthesis, medical and pharmaceutical applications, agronomic uses, etc., are much less used [2]. However, recently, the application of

enzymes in agricultural and environmental applications has experienced a significant increase, mainly due to the development of new production methods using cheap culture media derived from agricultural products and urban residues [3].

Most industrial enzymes are bacterial enzymes, although fungal enzymes have lately become increasingly important, both quantitatively and qualitatively. Bacterial enzymes produced by the genus *Bacillus* are of special interest for both research and industrial applications due to the

high rate of growth of these bacteria and their ability to secrete a high volume of enzymes into culture medium (20-25 g/L) [4]. In addition, these microorganisms are "generally regarded as safe" (GRAS). The *Bacillus* strains considered of industrial interest are the species *B. licheniformis* and *B. subtilis*.

One of the major bottlenecks for the industrial application of enzymes is the high production cost, while the cultivation medium may represent 30-40% of total production costs [5]. This has produced great interest in the development of efficient and cheap cultivation media. Among the media developed to address this issue, those derived from agroindustrial byproducts (whey, brewers grains, rice bran, defatted sunflower flour, and corn dried distillers grains with solubles (CDDGs)) and urban wastes (water and sewage sludge) are two types of promising substrates [6]. In addition to the economic benefit associated with the use of agroindustrial byproducts and urban waste, another important advantage is the resulting contribution to environment maintenance [7, 8]. In industrialized countries, the high rates of production of household and industrial liquid waste results in a high polluting effect [9, 10]. The treatment of these wastes in depuration plants generates two main products: purified water and sewage sludge. While the purification of water has received great attention, much less attention has been devoted to the management of sewage sludge, which is a dangerous source of environmental pollution if not treated properly. However, it has recently been shown that sewage sludge, when adequately processed, may serve as a useful substrate in the treatment and regeneration of soil and/or as an inexpensive cultivation media for the production of microorganisms and enzymes [11]. Sewage sludge is one of the most abundant and inexpensive substrates available for the culture of microorganisms and has practically zero cost.

Sewage sludge may be processed to modify and/or adjust its physical, chemical, and biological properties to yield acceptable material

for use as fertilizer and/or culture medium for the production of substances of high added value [12, 13]. Currently, sewage sludge is transformed mainly into bio-fertilizer, while only a small portion is used for the production of high value-added products such as enzymes. The goal of this work was to study the use of sludge from water treatment plants as a cultivation medium for the production of hydrolytic enzymes (proteases, cellulases, lipases, acid phosphatase, and  $\beta$ -glucosidase) using *Bacillus licheniformis*.

## Materials and methods

### Microorganisms

*Bacillus licheniformis* strain 21415 provided by the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) was used for the production of enzymes in this study. The bacteria were stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and refreshed in LB medium (10 g/L peptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl, adjusted to pH 7) 24 h before inoculation. Briefly, after thawing at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight, 2 mL of bacteria was inoculated into a flask containing 30 mL of LB medium at pH 7 and  $37^{\circ}\text{C}$ , and then grown until the transmittance at 620 nm reached 20%.

### Substrates: Sludge samples, medium composition, and fermentation

Sludge samples were provided by the experimental treatment plant of Carrión de los Céspedes (Sevilla, Spain) of the CENTA Foundation. Thickened sludge with a humidity of  $90\pm 1.5\%$  was used both alone and in the preparation of cultivation medium (table 1). Culture medium was sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 30 min prior to inoculation to eliminate pre-existing sludge bacteria. Six hundred mL sterile media was inoculated with 30 mL inoculum and grown over 14 days at  $37^{\circ}\text{C}$  with constant agitation (150 rpm). During growth, 10 mL samples were taken each day and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use for measurement of biomass and enzymatic activities, including protease, cellulase, lipase, acid phosphatase, and  $\beta$ -glucosidase.

**Table 1.** Compositions of culture media formulations.

Media	Sludge (g)	Inductor (g)	
		Feathers	Inoculum (mL) <i>B. licheniformis</i>
M1	600	0	0
M2	600	0	30
M3	588	12	30

**Sample preparation**

Samples were thawed at 4°C and either used directly for biomass determination or centrifuged at 12,000 × g for 20 min to obtain the supernatant used for enzyme activity assays.

**(1) Determination of biomass.**

Biomass was determined indirectly by measuring the protein content of samples at different growth times using the Bradford method [14]. Biomass concentration was determined in µg/mL by interpolation from a standard curve plotting biomass (µg/mL) against protein concentration (µg/mL) (Figure 1).

**(2) Enzymatic assays**

The supernatant obtained after centrifugation was used for determination of enzyme activities.

**Protease activity assay**

The total extracellular protease activity was determined following the method described by Beynon and Bond [15]. Briefly, 250 µL of the sample was mixed with 250 µL of a reaction mixture containing 0.1 g azocasein and 0.2 mL of ethanol dissolved in 4.8 mL of 0.1 M phosphate buffer at pH 7. Samples were then incubated for 10 min at 40°C. The reaction was then terminated by adding 2.5 mL of 5% (w/v) TCA solution. The reaction mixture was centrifuged at 10,000 × g for 2 min. The absorbance of the supernatant at 440 nm was measured. One unit of proteolytic activity was defined as the amount of enzyme required to produce an increase in optical density of 0.001.

**Cellulase activity assay**

The total cellulase activity was determined by the method described by Galindo [16], modified for application to cellulolytic enzymes. Briefly,

250 µL of a 2% soluble microcrystalline cellulose (Avicel PH-101, Sigma- Aldrich, Barcelona, Spain) solution in 0.1 M acetate buffer (pH 5) was incubated with 250 µL of the sample for 2 hours at 37°C. The reaction was stopped by adding 1 mL of DNS reagent, and the mixture was heated to 95°C for 10 min. The reaction mixture was then cooled to room temperature and the absorbance at 575 nm was measured. A standard curve was obtained using glucose for used in the calculation of cellulase activity. One unit of cellulase activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 mg/mL of reduced sugars into the test solution.

**Lipase activity assay**

The total extracellular lipase activity was determined using a modified version of the method described by Kilcawley et al. [17]. Briefly, 1.75 mL of buffer (0.1 M sodium phosphate pH 7, 0.15 M NaCl, and 0.5% (v/v) Triton-X) was mixed with 0.25 mL of sample that had been previously centrifuged for 30 min at 12,000 × g, along with 20 µL of 50 mM p-nitrophenol laurate in acetonitrile. This mixture was then incubated for 30 min at 37°C. Afterward, the mixture was cooled in an ice bath for 5 min, then centrifuged for 1 min at 9,000 × g. The supernatant absorbance at 400 nm was measured. Activity was quantified using the molar extinction coefficient of p-nitrophenol (14,800 /M-cm) at 400 nm. The activity units were defined as one unit corresponding to the release of 1 nmol of p-nitrophenol/min-mg protein under the test conditions.

**β-glucosidase activity assay**

The β-glucosidase activity was determined using the colorimetric method described by Eivazi and Tabatabai [18] with slight modifications. Into 250 µL of the sample, 2 mL of modified universal buffer (MUB, pH 6) and 0.5 mL of p-nitrophenyl-β-glucopyranoside 25 mM (7.53 mg/mL) were added. The mixture was then incubated at 37°C for 30 to 60 min. The reaction was stopped by placing the mixture in an ice bath. Subsequently, 2 mL of 0.5 M NaOH was added and the solution absorbance at 400 nm was measured. The

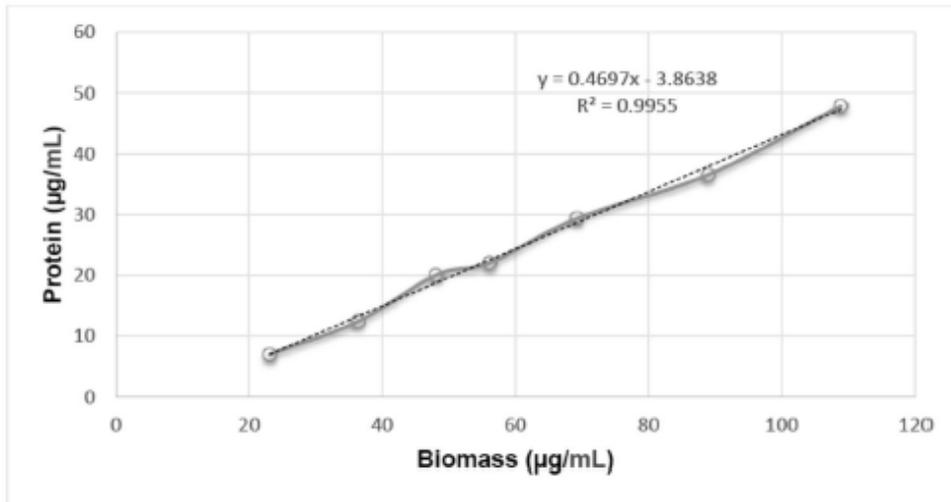


Figure 1. Standard curve of biomass versus protein concentration for *Bacillus licheniformis* grown in a defined medium.

enzymatic activity (EA) was expressed in  $\mu\text{mol/g}$  of sample-min and was calculated by the following formula:

$$EA = C \times V / T \times G$$

where C is the concentration of liberated p-nitrophenyl (mM); V is the sample volume (mL); T is the incubation time (min); and G is the sample weight (g). One  $\beta$ -glucosidase unit of activity was defined as the amount of  $\beta$ -glucosidase needed to release 1 nmol p-nitrophenol from p-nitrophenyl- $\beta$ -glucopyranoside in 1 min under the specified conditions.

#### Acid phosphatase activity assay (APHA)

Acid phosphatase activity was determined by the method established by Tabatabai and Bremner [19] with slight modifications. The procedure was initiated by creating a mixture containing 250  $\mu\text{L}$  of sample, 2 mL of MUB, pH 6, and 0.5 mL of p-nitrophenyl-phosphate 25 mM (9.28 mg/mL). This mixture was incubated at 37°C for 30-60 min. Afterward, the samples were cooled in an ice bath to stop the reaction. Then, 2 mL of 0.5M NaOH was added to the sample and the

solution absorbance at 400 nm was measured. The EA was expressed in  $\mu\text{mol/g}$  of sample-min and was calculated by the following formula:

$$EA = C \times V / T \times G$$

where, C is the concentration of liberated p-nitrophenyl (mM); V is the sample volume (mL); T is the incubation time (min); and G is the sample weight (g). One phosphatase unit of activity was defined as to the amount of acid phosphatase needed to release 1 nmol p-nitrophenol from p-nitrophenyl-phosphate in 1 min under the specified conditions. Spectrophotometric detection of the artificial molecule p-nitrophenol manifesting yellow as a product of acid phosphatase activity was used to quantify the enzyme activity in these samples.

#### Protein assay

Protein concentration was quantified by the method described by Bradford, using bovine serum albumin as the protein standard [14].

#### SDS-PAGE protein profiling

The extracellular protein profile was investigated by SDS-PAGE analysis. After acid-acetone

precipitation of the supernatant obtained after fermentation broth centrifugation at 12,000 × g, the pellet was solubilized in sample preparation buffer (1 mM Tris-HCl, pH 6.8) containing 5% (w/v) SDS and 7% (v/v) β-mercaptoethanol. The samples were kept at room temperature for 2 h and then centrifuged at 12,000 × g for 15 min. The supernatant was collected and run on 12% SDS-PAGE gel in triplicate, with each run containing 20 μL of supernatant (approximately 50 μg of protein) and 5 μL of loading buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 10% (w/v) SDS, and 5% (v/v) bromophenol blue). The samples were boiled for 5 min, centrifuged at 10,000 × g for 10 min, and cooled before being loaded on the gel. Electrophoresis was carried out at constant intensity (25 mA) using a Tris-glycine buffer system containing 0.1% SDS until the bromophenol front ran off of the gel. After completion of electrophoresis, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and/or silver staining solution (GE Healthcare, Barcelona, Spain) and digitized on a Gel Doc™ XR + Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### Zymogram analysis

Proteolytic activity was detected via electrophoresis on 12% polyacrylamide gels prepared with 1% SDS and 0.1% (w/v) gelatin. After completion of electrophoresis, the gels were incubated in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 2% (v/v) Triton X-100 at 35°C for 1 h, and then again in the same buffer without detergent at 35°C for 3 h. After CBB staining and subsequent destaining, proteolytic activity was determined from the presence of non-stained zones and bands on the stained background composed of nondigested gelatin [20].

#### Proteomics

A proteomics study was carried out according to the procedure described in Parrado et al. [21]. Briefly, to remove contaminants such as cells and debris in suspension, the samples were centrifuged at 12,000 × g for 20 min and the supernatants were recovered. Then, 10 μL of the supernatant was treated with 40 μL of methanol

and vortex mixed for approximately 1 min. 10 μL of chloroform was added and the mixture was shaken again for 1 min before 30 μL of Milli-Q water was added and mixed well. The mixture was centrifuged at 14,000 × g for 5 min and the supernatant was removed. 30 μL of methanol was added to the pellet and the mixture was vortexed again for 1 min. Samples were centrifuged at 16,000 × g for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellets were dried by lyophilization. The pellet proteins were resuspended in Milli-Q water. A total of 30 μg of resuspended protein was added into 30 μL of 6 M urea, 200 mM ammonium bicarbonate, 10 mM DTT and allowed to remain at room temperature for 30 min for protein reduction. 10 μL of 100 mM iodoacetamide was added to promote protein alkylation, and the samples were kept at room temperature in the dark for 30 min. Samples were then dialyzed against Milli-Q water until the urea concentration was below 0.1 M and subsequently treated with trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in a protein-to-enzyme ratio of 50:1. Digestion was carried out at 37°C overnight. The mixture was then acidified with TFA and concentrated using a Speed C18/18 column (Applied Separations, Allentown, PA, USA). Peptides were eluted in 400 μL of 70% acetonitrile containing 0.1% TFA. After the samples were completely dried, they were resuspended in 15 μL of 5% acetonitrile containing 0.1% formic acid for use in tandem liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis. LC-MS analysis was performed in a Surveyor HPLC system in tandem with a Finnigan LTQ mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A total of 5 μL of sample was injected into a C18 PepMap100-Precolumn Cartridge (Dionex, Netherlands) for pre-concentration and washing, then resolved in a Biobasic C18 75 μm × 10 cm column (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were eluted at a nominal post-split flow rate of 250 L/min using a 120-min gradient of 5% acetonitrile with 0.1% formic acid to 40% acetonitrile with 0.1% formic acid. The LTQ mass spectrometer was run in positive-ion mode using the nanospray source. The spray voltage was set

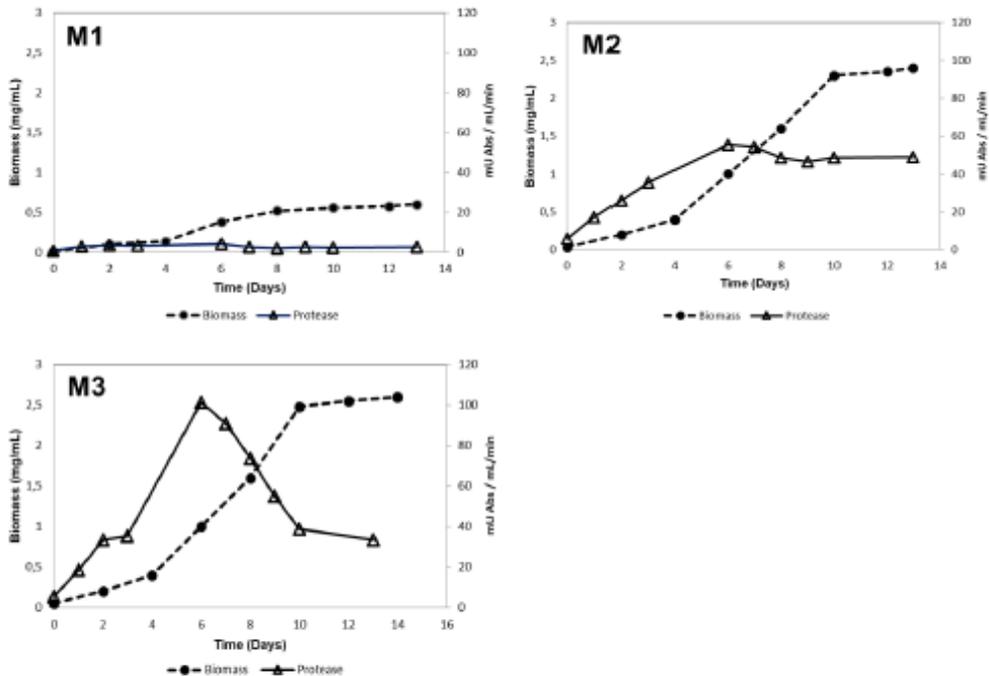


Figure 2. Biomass and protease production by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3.

at 2 kV, and the capillary temperature was set to 170°C. The samples were scanned in the range of 400–1500 m/z using the full scan mode, and data-dependent MS/MS analysis with collision-induced dissociation (CID) was performed on the top five ions with dynamic exclusion. The data was converted to SEQUEST format (DTA) and compared against the NCBI database (version 11/10/2007) using an in-house MASCOT (Matrixscience, London, UK) search engine with taxonomy restrictions set to Firmicutes and with carboxymethylated cysteine as a fixed modification.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 13.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All experiments were completed in triplicate, and the mean of the three data sets is presented for each experiment. A level of significance of  $\alpha < 0.05$  was used to calculate significant

differences. One-way ANOVA analysis revealed that the results of the triplicate analyses for each experiment did not differ significantly.

#### Results and discussion

In an attempt to find an abundant and cheap cultivation medium for the production of hydrolytic enzymes using *Bacillus licheniformis*, we present in this work the results obtained from the use of sewage sludge as the main fermentation source in the culture of *B. licheniformis*. As observed in figures 2 to 4, measurement of the protein production indicated that the microorganism grew well, although the biomass production was not high (2.76  $\mu\text{g/mL}$ ). Biomass estimation was carried out by protein determination using the Bradford method. As figure 1 shows, a linear relationship ( $R^2 = 0.995$ ) between protein concentration and

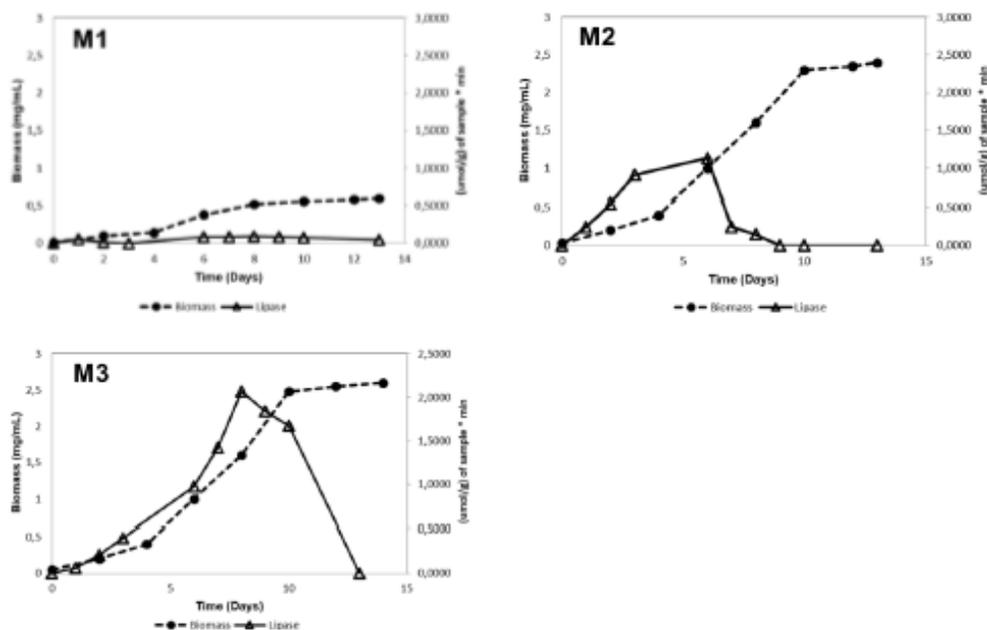


Figure 3. Biomass and lipase production by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3.

dry biomass was observed, from which biomass concentration can be estimated by interpolation. Figures 2 to 4 also show hydrolase production by *B. licheniformis* grown in media M1, M2, and M3, specifically, proteases, lipases, and cellulases. Among these hydrolases, proteases are of the highest industrial interest. Proteases (EC 3.4.21-24 and 99) are industrially useful hydrolytic enzymes that cleave peptide bonds between amino acid residues and are the dominant enzyme in the worldwide market. Two-thirds of the proteases produced annually are used in the detergent industry. Microbial proteases, especially from *Bacillus* species, have traditionally comprised the predominant portion of industrial enzymes on the market. The major application of microbial proteases is in the formulation of various detergents, which constitutes a significant share of worldwide enzyme sales [22]. Many bacteria in the genus *Bacillus* excrete large amounts of enzymes into culture medium. Alkaline serine protease, one of

the most important enzymes industrially, is excreted into culture medium by strains of *B. licheniformis* or *B. pumilus* [23]. These alkaline proteases (i.e., subtilisin) operate in a high alkaline pH range of 8.5-10 and are thus optimal for use in the formulation of detergents. In addition to their use in the detergents industry [24], these alkaline proteases have several other industrial applications, including in the production of foods, pharmaceuticals, leathers, and diagnostic reagents [25]. Proteases are also used for the bioconversion of chitinous materials as a waste-treatment alternative for the disposal of shellfish wastes [26, 27]. As shown in figure 2, *B. licheniformis* produces extracellular proteases during exponential growth and at the start of the stationary growth phase [28], after which point the production decreased. The analysis of the results obtained in medium M2 (without the addition of feather meal) and M3 (with added feather meal) show that the production of proteases by *B. licheniformis* is induced by the

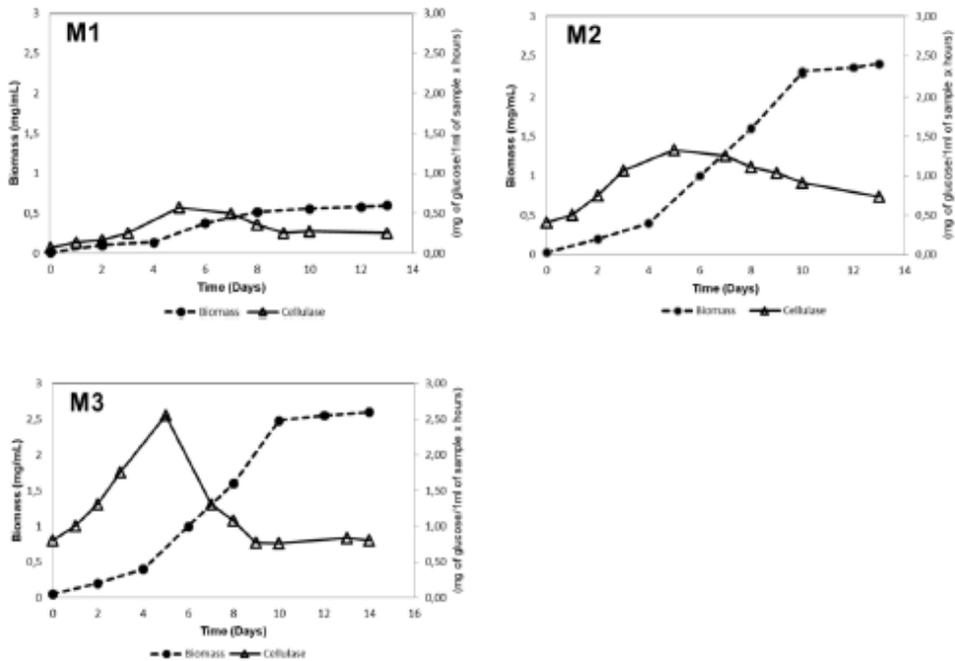


Figure 4. Biomass and cellulase production by *S. ilycheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3.

presence of feather meal. In both cases, it was also observed that the protease production activity became decreased if the stationary growth phase was prolonged. Therefore, we harvested the fermentation after 6 days of growth. The productivity at the point of harvesting was 16.89 mU/mL·day in medium M3 and 9.22 mU/mL·day in medium M2. Our results are in accordance with those previously reported by other authors [21, 28, 29, 30]. Extracellular protease production in microorganisms is highly influenced by media components, including variations in the carbon/nitrogen ratio, presence of some easily metabolizable sugars such as glucose [28, 29], and presence of metal ions [30]. In addition to these factors, several other properties such as aeration, inoculum density, pH, temperature, and incubation time were also found to affect the amount of extracellular protease produced [31, 32]. Glucose and peptone were found to be important factors in

enhancing the formation of alkaline protease, specifically (figure 2). Protease production is only of industrial interest if the microorganisms that produce substantial amounts of extracellular enzymes can be grown well in an easily prepared and low-cost medium. The use of sewage sludge amended with the soluble sugar fraction of agroindustrial by-products (beer bagasse, sugar bagasse, rice bran, etc.) as fermentation media, such as media sample M2 and M3 in this study, to achieve these requirements could substantially improve the industrial production of proteases (Bautista et al., unpublished results). The recovery of proteases from fermentation broth was carried out by continuous centrifugation of the fermentation broth on a non-foaming disc centrifuge and subsequent recovery of the filtrate and discarding of the cake. The clear filtrate was then concentrated by ultrafiltration using a 50 kDa ultrafiltration membrane, and the resulting

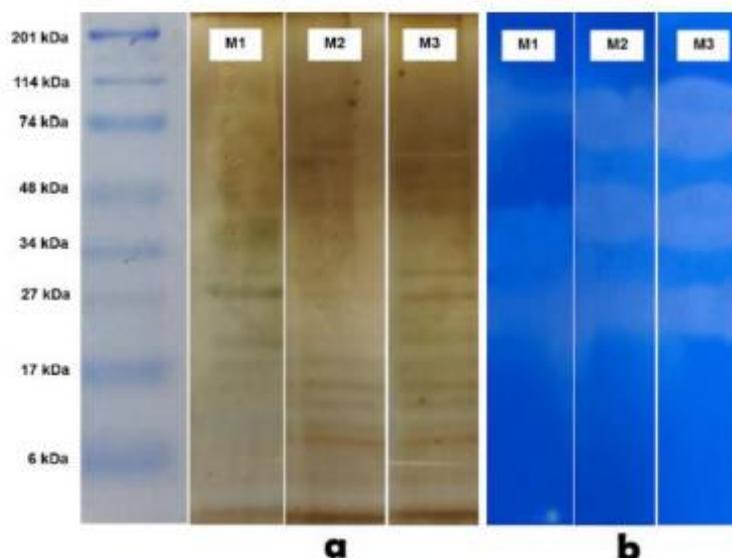


Figure 5. Electrophoretic separation by SDS-PAGE analysis of protein secreted by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3. (a: silver staining; b: activity staining (zymogram)). (Molecular weight standards: Myosin 201 kDa,  $\beta$ -Galactosidase 114 kDa, BSA 74 kDa, Ovalbumin 48 kDa, Carbonic anhydrase 34 kDa, Soybean trypsin inhibitor 27 kDa, Lysozyme 17 kDa, Aprotinin 6 kDa).

ultraconcentrate was precipitated with the addition of 80% ethanol. The precipitate was then lyophilized or dried with air at 30-40°C. Lipases are a group of enzymes of which the main function is the hydrolysis of triacylglycerol in a lipid-water interphase. This group of enzymes is of special interest in many industrial sectors, such as the detergent industry, food-industry and chemical and pharmaceutical industry [33]. *B. licheniformis* has been described as a major producer of lipases; therefore, we also studied the production of lipases by this microorganism in the media formulated with sewage sludge used in this work. Figure 3 shows the production of lipases in the three tested media formulations. These results show that the addition of feather meal also induced the production of lipases. This induction could be attributed to the relatively high fat content of the feather meal (8.4%). However, in this case an important difference was observed in lipase production by *B. licheniformis* in the two media

formulations. In medium M2, the production of lipase was observed from the beginning of bacteria growth, while in medium M3, the production increased drastically after 4 days of growth. In both formulations, the lipase production level was maintained between days 5-9, after which point the lipase concentration in the medium decreased sharply, probably due to the actions of proteases. Therefore, the lipase productivity at day 8 was used to evaluate lipase production and was estimated as 0.25 mU/mL-day (figure 3). The production of enzymes that degrade cellulosic material, such as cellulases, is of great importance in the development of new biorefinery approaches to produce biofuels and high value-added products through fermentation. Therefore, the development of abundant and cheap sources of cellulose-degrading enzymes is necessary. For this reason, we also tested the production of cellulases by *B. licheniformis* in media formulated with sewage sludge. Figure 4 shows the production of

cellulases by *B. licheniformis* grown in media formulations M1, M2, and M3. The production of cellulase in medium M2 started at the beginning of bacteria growth, likely due to the presence of cellulosic materials in the sewage sludge. Cellulase production reached a maximum after 5 days of bacteria growth, with a productivity of 0.51 mU/mL·day. Surprisingly, the addition of feather meal also induced the production of cellulolytic enzymes, although this induction was less pronounced than that seen for proteases and lipases. The cause of this induction remains obscure. In addition to protease, lipase and cellulase activities, other enzyme activities, such as those of  $\beta$ -glucosidase and acid phosphatase, were also tested in the supernatant from the growth of *B. licheniformis* in media formulations M1, M2, and M3. No enzymatic activities beyond those of proteases, lipases, and cellulases were detected (figure 4).

Proteases, lipases and cellulase are inherently produced by *B. licheniformis*, but in the presence of feather meal, the production of these enzymes was clearly enhanced, particularly in the case of proteases and lipases [21]. Induction of the production of these enzymes with hydrolytic activities suggests that these enzymes are involved in the utilization of insoluble C- and N-sources for *B. licheniformis* survival when soluble C- and N-sources are low. Other enzymes are likely also involved in this adaptation process; therefore, we analyzed the set of proteins excreted (secretome) by *B. licheniformis* using electrophoretic and proteomic techniques.

The proteins produced by *B. licheniformis* grown in the media formulations M1, M2, and M3 were separated by SDS-PAGE analysis and are shown in figure 5. As these results show, the excretion of proteins/enzymes into the growth medium was greater in mediums M3 and M2 than in M1 as a result of the enhanced growth of *B. licheniformis*. Zymographic analysis showed that in both M2 and M3, three main protease zones can be detected—one approximately 75 kDa and other two approximately 34 and 27 kDa. In order

to study the set of proteins secreted by *B. licheniformis* grown in media formulated with sewage sludge (M2 and M3), we used a proteomic approach based on the shotgun procedure. In the presence of a culture medium that includes feather meal as an inductor, *B. licheniformis* is capable of excreting various kinds of enzymes in order to degrade the components of the medium and, thus obtain nutrients required for survival [34-37] (figure 5). Most *Bacillus sp.* initiate a series of transitional responses that are designed to maintain or restore growth under different environmental conditions, including the induction of macromolecular hydrolases, such as proteases, lipases, and polysaccharidases. Enzymatic induction through addition of materials to the substrate has been described for *Bacillus*. For example, xylene addition induces the excretion of xylanases and other glycoside hydrolases [38], and substrates formulated with olive oil, an important inductor and source of lipids, induces the synthesis and excretion of lipases [34]. The results obtained in this study show that feather meal can be used as a N-source for the growth of *B. licheniformis* and can also act as a strong inducer of the secretion of hydrolytic enzymes, specifically, proteases, lipases, and to a lesser extent, cellulases, and other proteins and enzymes. The proteins and enzymes secreted by *B. licheniformis* grown in medium M3 was characterized by a proteomic approach using the shotgun procedure, and the results are shown in table 2. The analysis of exocellular proteins excreted by *B. licheniformis* in medium M3 showed a relatively low diversity of proteins compared to that found in other fermentation media, such as dextrose broth [21] (table 2). The main proteins and/or enzymes secreted were hydrolases (> 80%), and of these, the protease keratinase (KerA) is of special relevance. This enzyme is typically produced when *B. licheniformis* is grown in a media with primarily insoluble N-sources, such as keratins. In addition to promoting the hydrolysis of keratins, keratinase is capable of hydrolyzing a broad range of protein substrates and, therefore, has many potential agricultural and industrial

Table 2. Identified extracellular proteins/enzymes secreted by *Bacillus licheniformis* grown in medium M3.

Protein name	Mass (Da)	Score	Queries	
			Matched	emPAI*
KerA, Subtilisin precursor	31,266	640	18	1.02
Chain A, Chitosanase	435	468	10	0.44
Glycoside hydrolase family 14 protein	79,565	419	9	0.22
Glycoside hydrolase family 18 protein	66,111	273	5	0.10
Gamma-glutamyltranspeptidase (Ggt)	54,048	221	3	0.10
Flagellin	3,201	218	5	0.21
Extracellular serine protease	85,573	184	5	0.08
Hypothetical protein BL00275	14,050	173	9	0.24
Putative acylaminoacyl-peptidase YuxL	73,549	109	2	0.04
Chitosanase	50,616	348	11	0.37
Intracellular serine protease	33,888	232	7	0.45
Superoxide dismutase	22,530	187	11	0.51
Metalloreulation DNA-binding stress protein	17,909	157	4	0.19
Metal-dependent hydrolase	24,831	122	2	0.10
Chitosanase	19,722	116	3	0.17

applications. Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT, E.C. 2.3.2.2) was another minor protein found in the fermentation solutions examined. This protein catalyzes the transfer of the  $\gamma$ -glutamyl moiety from  $\gamma$ -glutamyl compounds to a variety of amino acids and dipeptide acceptors [39, 40]. The hydrolytic and glutaminase activities involved in this process are used in the food industry for debittering amino acids. GGT has also been suggested to assist subtilisin during its action on keratin [41]. *B. licheniformis* was found to secrete extracellular GGT and keratinase during keratin degradation processes. Keratinase in the presence of GGT exhibits an extended substrate spectrum, cleaving all types of keratins. The complex thus exhibits better catalytic properties when GGT is present, a characteristic which can be exploited in various biotechnological applications [42].

### Conclusion

These results demonstrate the successful culture of *B. licheniformis* in a medium formulated with sewage sludge as the main source of carbon and nitrogen with added feather meal (keratin) as an inductor. This formulation is a cheap and abundant fermentation medium that can be used for the regular production of hydrolases, particularly proteases and lipases, on a large scale in relatively short culture periods of 5 and 8 days. The subsequent recovery of these enzymes through continuous centrifugation and concentration by ultrafiltration, followed by fractionation with ethanol (actually underway), could be a promising process for the preparation of products with high proteolytic and/or lipolytic activity for inclusion in enzymatic formulations for food production and agro-industrial uses.

### Acknowledgments

We are grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support of this work (project RTC-2015-4039-2), which

has partial financial support from the FEDER funds of the European Union.

### Reference

1. Polains J, McCabe A. 2007. Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. *Industrial Enzymes*. 461-476.
2. Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39:233-251.
3. Aehle, Wolfgang. 2007. *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Ed. 3rd. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
4. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50:1-17.
5. Gessesse A. 1997. The use of Nug meal as a low cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresour. Technol.* 63:59-61.
6. Mukhtar H, Haq I. 2013. Comparative Evaluation of Agroindustrial By-products for the Production of Alkaline Protease by Wild and Mutant Strains of *Bacillus subtilis* in Submerged and Solid State Fermentation. *Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/538067>.
7. Romero EJ, Bautista JD, García-Martínez A.M, Cremades O, Parrado J. 2007. Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. *Process Biochem* 42:1492-1497.
8. Zhang XZ, Sathitsuksanoh N, Zhu Z, Zhang YHP. 2011. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metab. Eng.* 13:364-372.
9. Castells X. 2012. *Reciclaje de residuos industriales*. Ed. 2da. Spain. 1-28.
10. Fjällborg B, Dave G. 2003. Toxicity of copper in sewage sludge. *Environ Int.* 28:761-769.
11. Colomer Mendoza FJ, Gallardo Izquierdo A, Robles Martínez F, Bovea Ma D, Prats L. 2011. Waste water treatment plants: Possibilities of recovery for different digested sewage sludges. *Eng.* 14-3:177-190.
12. Buwei. 1990. Swiss Federal Department of the Interior, Environmental Protection Agency, personal communication.
13. García C, Gil F, Hernández T, Trasar C. 2003. *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos. Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana*. Editorial Mundi-Prems. España.
14. Bradford MM. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 73:248-250.
15. Beynon RJ, Bond JS. 1989. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press. 55
16. Galindo J. 2001. Fermentación microbiana ruminal y pasaje hacia las partes bajas del tracto gastrointestinal de árboles, arbustos y leguminosas. Memorias del curso "Sistemas

- silvopastoriles, una opción sustentable". *Tantakín*, Mérida. 132.
17. Kilcawley KN, Wilkinson MG, Fox PF. 2002. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme Microb. Technol.* 31:310-320.
  18. F Eivazi, Tabatabai M. 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* 22:891-897.
  19. Tabatabai MA, Bremner JM. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1:301-307.
  20. Jellouli K, Ghorbel-Bellaj O, Ayed HB, Manni L, Agrebi R, Nasri M. 2011. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochem* 46:1248-1256.
  21. Parrado J, Rodríguez-Morgado B, Tejada M, Hernández T, García C. 2014. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme Microb. Technol.* 57:1-7
  22. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:381-395.
  23. Ward OP, *Proteinases*, in: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (W. M. Fogarty, ed.), Applied Science, London, pp. 231-317.
  24. Maurer KH. 2004. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:330-334.
  25. Gupta R, Beg QK, P Lorenz. 2002a. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:13-32.
  26. Yang JK, Shih IL, Tzeng Y M, Wang SL. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 26:406-413.
  27. Manni L, Jellouli K, Ghorbel-Bellaj O, Agrebi R, Haddar A, Sellami Kamoun A, Nasri M. 2010. An oxidant- and solvent-stable protease produced by *Bacillus cereus* SV1: application in the deproteinization of shrimp wastes and as a laundry detergent additive. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 160:2308-2321.
  28. Kole MM, Draper I, Gerson DF. 1988. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J Chem Technol Biotechnol.* 41:197-206.
  29. Ferrero MA, Cartro GR, Abate CM, Baigori MD, Sineriz F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:327-332.
  30. Varela H, Ferrari MD, Belobrajdic L, Weyrauch R, Loperena ML. 1996. Short communication: effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:643-645.
  31. Hameed A, Keshavarz T, Evans C S. 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J Chem Technol Biotechnol.* 74:5-8.
  32. Nehete PN, Shah VD, Kothari RM. 1985. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. *Biotechnol. Lett.* 7:413-418.
  33. Patel AK, Singhania RR, Pandey A. 2016. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Edited by: Brahmachari G, Demain AL, Adrio JL. Chapter 2, pp. 13-41, Academic Press.
  34. Sinchaikul S, Sookkheo B, Topanuruk S, Juan HF, Phutrakul S, Chen ST. 2002. Bioinformatics, functional genomics and proteomics study of *Bacillus* sp. *J. Chromatogr. B* 771:261-87.
  35. Voigt B, Scheweder T, Becher D, Ehrenreich A, Gottschalk G, Feesche J, Maurer KH, Hecker M. 2004. A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics.* 4:1463-1480.
  36. Harwood C, Cranenburgh R. 2007. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 16:73-79.
  37. Van Dyk JS, Sakka M, Sakka K, Pietschke BI. 2010. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme Microb. Technol.* 47:112-118.
  38. Chu PW, Yap MN, Wu CY, Huang CM, Pan FM, Tseng MJ, Chen ST. 2000. A proteomic analysis of secreted proteins from xylan-induced *Bacillus* sp. strain K-1. *Electrophoresis.* 21:1740-1745.
  39. Suzuki H, Izuka S, Minami H, Miyakawa N, Ishihara S, Kumagai H. 2003. Use of bacterial glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of glutamyl compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6399-6404.
  40. Wu Q, Xu H, Zhang L, Yao J, Ouyang P. 2006. Production, purification and properties of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from a newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 43:113-117.
  41. Tiwary E, Gupta R. 2010a. Subtilisin-gamma-glutamyl transpeptidase: a novel combination as ungual enhancer for prospective topical application. *J Pharm Sci.* 99:4866-4873.
  42. Tiwary E, Gupta R. 2010b. Improved catalytic efficiency of a monomeric  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis* in presence of subtilisin. *Biotechnol. Lett.* 32:1137-1141.

