



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"OBTENCIÓN DE RENINA Y QUITOSANO A  
PARTIR DE UN CULTIVO MIXTO DE  
Rhizomucor miehei y Mucor rouxii"

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS**  
(QUÍMICA DE ALIMENTOS)

P R E S E N T A:

**José Navarro García**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	página
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	6
II.1 RENINA.....	6
II.1.1 Renina de ternera.....	7
II.1.2 Proteasas con característica de renina.....	8
II.1.3 Síntesis de renina de <i>Rhizomucor miehei</i> .....	15
II.2 QUITOSANO.....	16
II.2.1 Propiedades y usos potenciales de polímeros de quitina.....	19
II.2.2 Fuentes tradicionales de quitina y quitosano.....	25
II.2.3 Fuentes alternativas de polímeros de quitina.....	28
II.2.4 Síntesis de quitosano en hongos filamentosos.....	30
II.3 <u>MUCOR ROUXII</u> Y <u>RHIZOMUCOR MIEHEI</u> .....	34
III. MATERIALES Y METODOS	38
III.1 CEPAS. MANTENIMIENTO.....	38
III.2 CULTIVO.....	38
III.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL TIPO DE INOCULO.....	39
III.4 ANALISIS DE RENINA.....	41
III.5 AISLAMIENTO Y ANALISIS DE QUITOSANO.....	42

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>48</b>
<b>IV.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES</b> .....	<b>48</b>
<b>IV.1.1 Validación de la técnica de extracción             de quitosano</b> .....	<b>48</b>
<b>IV.1.2 Selección del medio de cultivo</b> .....	<b>50</b>
<b>IV.1.3 Validación de la técnica de determinación             de renina</b> .....	<b>51</b>
<b>IV.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO Y         LA PRODUCCION DE RENINA Y QUITOSANO</b> .....	<b>52</b>
<b>IV.2.1 Efectos sobre el crecimiento</b> .....	<b>53</b>
<b>IV.2.2 Producción de renina</b> .....	<b>58</b>
<b>IV.2.3 Producción de quitosano</b> .....	<b>61</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>73</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>74</b>

## I. INTRODUCCION

Durante la elaboración de quesos la coagulación de la leche por la acción del cuajo representa una etapa fundamental. El cuajo se obtiene del abomaso de terneros antes del destete y su actividad coagulante se debe especialmente a una enzima llamada quimosina o renina, la cual cataliza la hidrólisis del enlace peptídico Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína; como resultado de esta actividad enzimática se desestabilizan las micelas de caseína, las cuales precipitan con la ayuda de iones Ca<sup>\*\*</sup>

La disponibilidad de la quimosina se ha visto seriamente limitada por el creciente consumo de quesos y el aumento en la demanda de carne de res (consecuentemente, reducción de los terneros sacrificados para la obtención de cuajo), por lo que desde hace varias décadas se vienen buscando fuentes de proteasas que tengan la especificidad de la quimosina y puedan sustituirla en la elaboración de quesos.

Se han encontrado numerosas proteasas extraídas de plantas, animales y microorganismos que producen la coagulación de la leche, pero la mayoría de ellas son muy poco específicas para el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> y poseen una actividad proteolítica excesiva, produciendo quesos con pobre textura, sabores amargos, y/o bajos rendimientos. Las proteasas que más se acercan a la especificidad de la quimosina son algunas de origen microbiano y sólo las obtenidas de tres especies de hongos (*Endothia parasitica*,

*Rhizomucor pusillus* y *Rhizomucor miehei*) han resultado exitosas, abarcando ya más de la mitad del mercado mundial de renina. De estas tres reninas fúngicas, la que más se asemeja en su acción sobre la leche a la quimosina es la que se obtiene de *R. miehei*.

Este año se incorporan al mercado tres productos comerciales de quimosina obtenida vía ingeniería genética, a partir de *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* y *Escherichia coli*. Estos productos, junto con nuevas preparaciones de renina bovina purificada mediante técnicas cromatográficas, amplían la oferta de la quimosina y entran a competir con las reninas obtenidas de hongos filamentosos. En México las reninas fúngicas poseen la ventaja de que ya son preferidas por los productores de quesos frescos (estos quesos constituyen aproximadamente un 70% del mercado de quesos en México), debido a que poseen menor sensibilidad que la renina de ternera a la variabilidad en el pH de la leche (Gutierrez, 1990). De todos modos se espera que el precio de los productos recombinantes vaya disminuyendo en los próximos años y resulta importante para los productores de reninas fúngicas el disminuir costos en su producción.

El empleo de los microorganismos para la obtención de productos industriales tiene numerosas ventajas sobre las fuentes tradicionales en relación a la disponibilidad, al control de los procesos y estandarización de la calidad de los productos, y sobre los procesos químicos en cuanto a la inocuidad, por lo que es de gran interés el desarrollo de nuevas tecnologías que hagan viable la producción comercial de diversos materiales a partir de esta

fuelle. El caso de la renina ilustra algunas de estas ventajas en la industria alimentaria.

Un producto con gran potencial para aumentar su demanda dentro de la industria de alimentos es el quitosano. Este es un polímero de glucosamina que por su carácter peculiar de polielectrolito catiónico natural tiene una gran variedad de aplicaciones en la industria de alimentos como: agente floculante, agente funcional, acarreador de aditivos, soporte de células y enzimas, ingrediente en alimentos y otras (Knorr, 1984).

El quitosano se obtiene actualmente a partir de la quitina que se extrae del caparazón de crustáceos, por desacetilación de ésta mediante procesos químicos. Como materia prima se emplean los desperdicios de la industria de mariscos, existiendo la problemática de la limitación en su disponibilidad y las variaciones en las propiedades de la quitina extraída según la estación del año y la degradación que va ocurriendo en ésta durante el almacenamiento de los desperdicios. Estos factores dificultan la uniformidad de calidad en los productos.

Se han sugerido otras posibles fuentes para la producción de la quitina y el quitosano, como algunas diatomeas y la biomasa que se descarta de algunos procesos industriales que emplean hongos, pero el poco crecimiento en la primera y la dificultad de la separación de la quitina en la segunda, hacen poco viable su aplicación. La opción más viable para la obtención del quitosano es el uso de algún hongo de la subdivisión Zygomycotina, ya que en especies de

este grupo, y en especial de la familia Mucoraceae, el esqueleto de la pared celular se encuentra constituido principalmente por quitosano como tal y en menor proporción por quitina. La especie que ha sido más estudiada con este propósito es *Mucor rouxii*, debido a su alto contenido de quitosano en la pared. (Berkeley y col., 1979; White y col., 1979)

*Rhizomucor miehei* tiene muchas características en común con las especies del género *Mucor*; de hecho, anteriormente se les clasificaba dentro del mismo género. Considerando algunas diferencias como la presencia de rizoides y su carácter termofílico, se creó el género *Rhizomucor* para reclasificar algunas especies (Domsch y col., 1980).

Partiendo de la experiencia que se tiene en nuestro laboratorio en el manejo de especies de la familia Mucoraceae y viendo, por un lado, la necesidad existente de hacer viable técnica y económicamente la obtención de quitosano a partir de hongos, y por otro lado, la importancia de reducir costos en la producción de reninas fúngicas, nos planteamos que sería interesante probar si en una fermentación mixta entre una especie productora de renina y una con alto contenido de quitosano en su pared, se pudieran desarrollar ambas cepas de modo que se obtenga, con el filtrado una actividad de renina y con la biomasa una producción de quitosano que resulten comparables a los obtenidos en los cultivos puros de las especies correspondientes. De este modo, con la producción simultánea de renina y quitosano se estaría ahorrando costos en equipos, energía y mano de obra, que beneficiarían a la

industria de reninas fúngicas y se estaría abriendo un camino para hacer viable la producción de quitosano a partir de hongos.

Se escogieron las especies *Rhizomucor miehei* y *Mucor rouxii*, por producir la primera una proteasa con especificidad cercana a la de la renina de ternera, y por ser la segunda la más estudiada para la producción de quitosano debido a su alto contenido en la pared. *R. miehei* es de carácter termofílico, reportándose temperaturas de fermentación para la producción de renina principalmente entre 30 y 40°C, mientras que *M. rouxii* es un hongo mesófilo, para el que se emplea comúnmente la temperatura de 28°C. Consecuentemente, la temperatura es un factor que tiene gran influencia en el comportamiento del crecimiento y producción de metabolitos en un cultivo mixto entre ambas especies. Esto hace también que se puedan presentar importantes cambios en el la producción de ciertos metabolitos que beneficien o perjudiquen la producción de renina y de quitosano en el cultivo mixto, según la temperatura empleada. Se decidió estudiar el efecto del cultivo mixto y de la temperatura en el crecimiento y la producción de renina y de quitosano.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 RENINA

Uno de los alimentos que se destacan por sus cualidades organolépticas y su valor nutritivo y cuya demanda va continuamente en aumento es el queso. Este derivado lácteo probablemente empezó a consumirse por fermentación natural de la leche, con la producción de ácidos orgánicos, como el láctico, que provocaban la caída del pH hasta el punto isoeléctrico de la caseína, produciéndose un coágulo del que fácilmente se separa el suero. Luego, con el uso del cuajo obtenido del abomaso del becerro, se comenzó a producir el queso, de una forma más controlada, por acción enzimática y sin modificación del pH de la leche.

El origen del uso de la renina en la preparación de quesos no está esclarecido. Existe un relato que sugiere que su empleo fue primeramente descubierto por un mercader árabe, el cual en el inicio de un viaje colocó su provisión de leche en una bolsa hecha con estómago de oveja; durante el viaje por el desierto, el calor del sol promovió la acción enzimática de la renina contenida en el revestimiento del estómago, lo que ocasionó la formación de coágulos y suero; en la noche, el viajero notó que el suero le agradaba para calmar su sed y que el coágulo servía muy bien como alimento. (Sardinas, 1976).

Hoy en día, la tecnología para la producción de quesos es muy rica y emplea diversos recursos para la obtención de muy variados sabores, aromas, colores y texturas. En estos procesos, el papel de la renina en la coagulación de la leche se ha estudiado con mucho detalle. La leche coagula en dos etapas consecutivas: primero, una etapa enzimática, en la cual la renina rompe un enlace peptídico en la  $\kappa$ -caseína, ocasionando la desestabilización de las micelas de caseína. En una segunda etapa, las micelas desestabilizadas comienzan a agregarse, con la contribución de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y precipitan formando el coágulo.

#### II.1.1. Renina de ternera.

En el abomaso de rumiantes jóvenes se encuentra un zimógeno (pro-renina o pro-quimosina), el cual tiene la capacidad de coagular la leche. En condiciones ácidas se desprende un péptido de la pro-renina, quedando la renina o quimosina, la cual tiene mayor actividad que el zimógeno. Esta enzima rompe el enlace  $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$  de la  $\kappa$ -caseína, liberándose un glucomacropéptido y  $\text{p-}\kappa$ -caseína. La activación de la pro-renina se realiza por ruptura cerca de la parte N-terminal, con reducción del peso molecular de 36,000 a 31,000.

La renina está compuesta por tres fracciones activas, con actividad relativa de 125, 100 y 55-60 con respecto a la segunda. El punto isoeléctrico es de 4.5. Al aumentar el pH de 6.3 a la neutralidad, la actividad de la enzima se destruye con mayor rapidez; en cambio, la pro-renina es estable a pHs alcalinos

(generalmente es estable en un rango de pH de 5.3 a 9.0).

En los extractos de renina de ternera se encuentra presente además la pepsina, en concentración de 3-15%, con variaciones en las que influyen la edad y la alimentación del animal. Por otro lado, las preparaciones comerciales de renina de ternera contienen un 10-30% de pepsina bovina. En forma líquida, se conservan en alto contenido de sal (14-20%) y por aplicación de aditivos como el benzoato de sodio y propilenglicol. La renina en polvo se obtiene por acidificación de extractos activados o saturación con NaCl, o ambos (Webb y col., 1974).

En 1983 se aprobó el status GRAS como ingrediente directo en alimentos para la renina de ternero, cabrito y cordero, y para la renina bovina, considerada como el producto obtenido de los adultos de las especies anteriores (FDA, 1983).

#### II.1.2. Proteasas con características de renina.

Con el continuo aumento en el consumo de quesos y la disminución de la disponibilidad de terneros debido a una mayor dedicación a la producción de carne, el uso de renina animal se va haciendo más limitado y crece la necesidad de emplear sustitutos de esta renina para la elaboración de quesos.

Sardinas (1976) enumera los requerimientos que deben ser satisfechos por un sustituto de renina:

- a) coagulación efectiva de la leche sin hidrólisis indebida del coágulo
- b) desarrollo de sabor, cuerpo y textura adecuados
- c) vida de almacenamiento razonable
- d) color y olor aceptables
- e) ausencia de toxinas y patógenos
- f) precio competitivo

Se tienen reportes de la obtención de renina de otros animales diferentes del becerro como: oveja, conejo, búfalo, pollo y cabra. Estas preparaciones no son ampliamente usadas, pero en algunos países llegan a emplearse, como en el caso de la renina extraída del proventrículo del pollo, que se usa en Israel para la producción de sus quesos (Sardinas, 1976). Estos extractos enzimáticos contienen varias proteasas además de la quimosina, como son pepsina, quimotripsina y tripsina. La pepsina no tiene una actividad proteolítica muy alta con respecto a su capacidad de coagulación de la leche, mientras que las dos últimas son muy proteolíticas, por lo que resultan muy pobres como sustitutos de la quimosina.

La pepsina no es recomendable para ser usada sola en la preparación de quesos, pero en combinación con la quimosina o algunas reninas microbianas puede producir quesos de calidad razonable. De hecho, como esto representa una disminución en costos, su uso es común por muchos productores.

Se ha probado el uso de proteasas provenientes de plantas en la elaboración de quesos. Algunos reportan la aplicación exitosa de estas proteasas, pero en general han resultado ser inadecuadas para tal uso, puesto que poseen muy alta actividad proteolítica resultante en quesos con sabores amargos y pobre textura. Se ha intentado su empleo adaptando el procedimiento de elaboración del queso o modificando la actividad de la enzima, pero hasta ahora no hay ninguna aplicación exitosa que se haya introducido al mercado. Entre este grupo de proteasas están: bromelina (de la piña), papaína (de la papaya), ficina (del higo), y una variedad de enzimas extraídas de soya, calabaza, hierba lechera, etc.

Como alternativa a las fuentes animales y vegetales, se ha investigado mucho sobre la obtención de sustitutos de renina de origen microbiano.

Las proteasas producidas por bacterias, en su mayoría, tienen muy alta actividad proteolítica como para ser empleadas en la coagulación de la leche; sin embargo, algunas han sido empleadas con éxito bajo determinadas condiciones, como las obtenidas de *B. cereus*, *B. mesentericus*, *B. polymyxa* y *B. subtilis* (Sardinas, 1976).

Las proteasas microbianas que poseen las mejores propiedades para la coagulación de la leche son de origen fúngico. En numerosas especies se han encontrado enzimas capaces de coagular la leche, como: *Physarium polycephalum*, *Penicillium citrinum*, *Aspidium ramosa*, *Mucor lamprosporus*, *Mucor mucedo* y *Mucor renninus*, pero

solamente tres especies han logrado tener éxito comercial en la producción de renina: *Endothia parasitica*, *Rhizomucor pusillus* y *Rhizomucor miehei*.

La renina obtenida de *Endothia parasitica* tiene un peso molecular entre 34000 y 39000, da con un punto isoeléctrico de 5.5 y se destruye a 60°C en 5 min. Tiene preferencia por grupos aromáticos o hidrofóbicos a ambos lados del enlace peptídico objetivo, y llega a romper el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína. La actividad proteolítica es mayor que la de la renina de ternero o de *Rhizomucor* y tiende a estar asociada con la producción de coágulos amargos cuando el contenido de humedad es alto. Sin embargo, se han preparado con éxito diferentes tipos de quesos, como: Brie, Camembert, Cheddar fresco, Colby, Mozzarella, Suizo, etc. La renina de *E. parasitica* es vendida por Pfizer Ltd. bajo los nombres de Sure curd y Suparen.

El extracto enzimático de *Rhizomucor pusillus* tiene actividad principalmente sobre aminoácidos aromáticos y su actividad proteolítica es menor, con respecto a su capacidad de coagulación de la leche, que la del extracto de *E. parasitica*. La enzima tiene un peso molecular entre 29000 y 30600 y da con un punto isoeléctrico entre 3.5 y 3.8. La actividad de coagulación de la leche es elevada por los iones Ca<sup>++</sup> en mayor proporción que en el caso de la quimosina. Su uso en combinación con la renina animal disminuye la liberación de grasa hacia el suero que ocurre cuando es empleada sola, y además se observa un efecto sinérgico en la coagulación de la leche, lo que sugiere que actúan por

mecanismos diferentes. Entre los quesos que se han preparado con éxito usando esta enzima se encuentran: Brick, Camembert, Cheddar, Cottage, Edam, Gouda, variedades italianas, etc. La renina de *R. pusillus* es producida por las compañías Vitex Melto Sangyo, Dairyland Food y Miles Lab., con los nombres comerciales de Noury, Melto, Emporasa y Novadel respectivamente (Sardinas, 1976).

La proteasa de *Rhizomucor miehei* es la que tiene menor actividad proteolítica y especificidad más cercana a la de la quimosina, entre la reninas fúngicas mencionadas. Esta es una glicoproteína encontrada en numerosas cepas de *R. miehei*, con un peso molecular entre 38000 y 41800. Se han separado por lo menos tres fracciones activas. Su punto isoeléctrico es de 4.2 y se destruye rápidamente a 70°C.

Como es común en las proteasas ácidas, ésta posee una preferencia por romper enlaces peptídicos en aminoácidos hidrofóbicos. La hidrólisis de esta enzima sobre la cadena B de la insulina oxidada presenta un patrón de ruptura de enlaces parecido al producido por la quimosina. Sternberg (1972) encontró que el glicopeptido liberado en la ruptura de la  $\kappa$ -caseína por la renina de *R. miehei* es muy semejante al liberado por la quimosina, lo que sugiere que el punto de ruptura es el mismo.

La renina de *R. miehei* se ha empleado con muy buenos resultados para diferentes tipos de quesos como: Camembert, Gouda, Cheddar, Domiatl, Butter, Edam, Tollenser, etc. Las compañías que producen esta renina y los nombres comerciales usados son los siguientes:

Chr. Hansens Lab.(Hannilasa), Novo Industries Ltd. (Renilasa),  
 Wallerstein Co. (Fromasa, Miki) y Miles Laboratories (Marzyme).

Se han empleado muy diferentes unidades de actividad de coagulación de la leche y de actividad proteolítica, según los métodos de análisis. El cociente actividad de coagulación de la leche / actividad proteolítica se emplea como indicador de la calidad de una proteasa para su uso en la elaboración de quesos. A continuación se reportan estos cocientes para diversas proteasas, pudiéndose notar la cercanía a la quimosina de las reninas de *R. pusillus* (Tablas 1 y 2) y *R. miehei* (Tabla 2).

Tabla 1. Cociente de actividad de coagulación de la leche sobre actividad proteolítica de varias proteasas \*

Proteasa	Act. coag. (unid/ml)	Act. prot. (abs.660nm)	Cociente (unid/abs660nm)
Quimosina	293	0.04	7350
Renina de <i>M. pusillus</i>	511	0.11	4650
Renina de <i>E. parasitica</i>	750	0.29	2590
Papaína	216	0.59	367
Tripsina	1.6	0.44	4
Molsina	1.3	0.18	7
Ficina	267	0.68	393
Blodiastasa	115	0.83	138

\* tomado de Arima y col., 1970

Tabla 2. Comparación del cociente de actividad de coagulación de la leche sobre actividad proteolítica de la renina de *M. miehei* con el de otras enzimas comerciales \*

Producto Comercial	Origen	Forma	Act. Coag. (Unid. Soxhlet)	Cociente Act. Coag./ Act. Prot.
Renilasa	<i>R. miehei</i>	líquida	112800/ml	3.9
Renilasa	<i>R. miehei</i>	granular	660000/g	5.2
Renina Noury	<i>R. pusillus</i>	polvo	800000/g	4.5
Sure curd	<i>E. parasitica</i>	polvo	169000/g	1.6
Renina Melto	<i>R. pusillus</i>	polvo	662000/g	3.4
Renina de Hansen	<i>R. miehei</i>	polvo	363500/g	13.2
Renina de ternera	ternera	líquida	9600/ml	12.8

\* tomado de: Thakur y col., 1990

Recientemente se ha comenzado a producir quimosina por la técnica de DNA recombinante, tratando de combinar las ventajas de la producción microbiana de enzimas (reproducibilidad, altos rendimientos, condiciones controlables, etc.), con la especificidad y el uso tradicional de la proteasa de origen animal. Löffler (1986), hace mención de tres trabajos en los que se logra expresar la quimosina en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, manteniendo las ventajas de dicha enzima. Más recientemente, Genencor Inc., de San Francisco, E.E.U.U., solicitó en 1989 la designación de la enzima obtenida por DNA recombinante en

*Aspergillus niger* var. *awamori* con el status GRAS, por parte de la FDA (Zelko, 1989). En 1991 hay ya en el mercado tres quimosinas recombinantes: una producida por Pfizer en *E. coli*, otra producida por Gist-Brocades en *Kluyveromyces lactis* y la producida por Genecor en *A. niger* var. *awamori*; no obstante, sus precios son aún muy elevados.

### II.1.3. Síntesis de renina de *Rhizomucor miehei*.

Se han empleado diversas cepas de *R. miehei* para la síntesis de renina, siendo la más común la NRRL 3420. Feldman (1981) comparó la actividad de renina producida por las cepas NRRL 3169, NRRL A7772, NRRL A13042, NRRL A13131 Y NRRL A6588, empleando un medio de cultivo compuesto por suero de leche, almidón de maíz degradado, levadura de cerveza y glucosa, resultando como más productoras las cepas 3169 y A7772, seguidas por las A13131 y A13042.

Lasure (1980) estudió las condiciones que favorecen y que reprimen la producción de la enzima por *R. miehei* en un medio definido. Se encontró que para la producción de la renina es necesaria la presencia de una proteína, y no fue suficiente la presencia de aminoácidos libres. No se tiene claro si se trata de un proceso de inducción de síntesis protéica o si se trata de la liberación de la enzima desde la pared celular o la membrana, pero la inhibición de la actividad enzimática por cicloheximida sugiere que se requiere de la síntesis de la enzima. La actividad aumentó al limitar el nitrógeno y el azufre inorgánicos en presencia de

caseína. En cambio, parece haber represión de la actividad por altos niveles de glucosa (16%), tartrato de amonio y sulfato de magnesio.

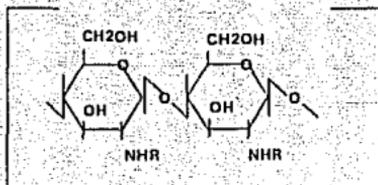
Mashaly y col. (1983) encontraron que al usar peptona como fuente de nitrógeno se produjo mayor actividad de renina que cuando emplearon fuentes no protéicas como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , urea y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; la adición de caseína, albúmina bovina sérica o hemoglobina, aumentó la actividad, con el mayor efecto obtenido con la caseína al 2%.

Charles y col. (1970) realizaron fermentaciones a varias temperaturas entre 30 y 50°C por 2-7 días y obtuvieron mayor producción de renina entre 35 y 40 °C. Por su parte, Mashaly y col. (1983), al emplear el medio con peptona, en fermentaciones de 7 días a 30°C, encontraron un rango de pH adecuado de 5.3-6.8, con un óptimo de 5.8.

## 11.2 QUITOSANO

El quitosano es un polímero de D-glucosamina que, junto con la quitina, constituyen los únicos polímeros catiónicos naturales, lo que los hace de gran interés para diversas áreas industriales. Actualmente, el quitosano que se produce comercialmente es obtenido a partir de la quitina extraída de invertebrados marinos, pero existen otras fuentes que es conveniente estudiar.

La estructura de estos polisacáridos es semejante a la de la celulosa, con enlaces  $\beta(1-4)$ . La unidad que constituye al quitosano es la D-glucosamina, mientras que la de la quitina es el derivado N-acetilado de la glucosamina.



$R = \text{COCH}_3 \rightarrow$  QUITINA

$R = \text{H} \rightarrow$  QUITOSANO

En forma natural, el quitosano siempre se presenta con un bajo porcentaje de grupos acetilados, mientras que la quitina presenta altos grados de acetilación. El polímero se considera como quitosano cuando es soluble en ácidos orgánicos.

La quitina ocupa el segundo lugar, después de la celulosa, como el compuesto orgánico de mayor abundancia en la naturaleza. Se encuentra como componente de la pared celular en plantas, reemplazando a la celulosa o junto con ésta, y en las estructuras animales generalmente forma parte de una cutícula en una superficie del epitelio. En la mayor parte de los casos, la quitina se encuentra unida a proteínas, formando un armazón fibroso que es reforzado y modificado por una matriz de proteínas (Knorr, 1984). En contraste, para algas se reporta la presencia de quitina pura, homogéneamente cristalina, en dos diatomeas marinas:

*Thalassiosira fluviatilis* y *Cyclotella cryptica* (Berkeley y col., 1979).

La quitina se encuentra formando parte del exoesqueleto de los artrópodos, llegando en ocasiones a constituir un 80% de la cutícula. En ciertos protozoarios se encuentra en pequeñas cantidades, por ejemplo en los rizópodos *Allogromia oviformis* y *Plagiopsis sp.*, en los que constituye, respectivamente, el 0.3 y 1.6 % del peso seco. Como ya se mencionó, se encuentra en algunas diatomeas, siendo su proporción en éstas de un 10 a 15 % del peso seco. La gran mayoría de los hongos, incluyendo los miembros de Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina y Mastigomycotina contienen en su pared celular quitina y glucanos o mananos, mientras que los de Zygomycotina contienen quitina y quitosano; la Tabla 3 muestra algunos ejemplos (Berkeley y col., 1979). Como se puede apreciar en esta tabla, el contenido de quitosano de *M. rouxii*, puede variar con el ciclo de vida. La variación es muy notable entre diferentes cepas de una misma especie. Berkely y col., (1979) citan los siguientes valores en la pared celular de cepas de *Aspergillus niger*:

CMI 17454 .....11%

IAM 2020.....24%

QM 8601.....42%

Tabla 3 - Estimados del contenido de quitina y quitosano en las paredes celulares de algunos hongos •

		quitina	quitosano
		( % pared celular)	
Ascomycotina	<i>Aspergillus niger</i>	22	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	35	0
Basidiomycotina	<i>Agaricus bisporus</i>	43	0
	<i>Schizophyllum commune</i>	4	0
Deuteromycotina	<i>Rhodotorula glutensis</i>	10	0
	<i>Sporobolomyces roseus</i>	10	0
Mastigomycotina	<i>Allomyces macrogynus</i>	60	0
Zigomycotina	<i>Mucor rouxii</i>		
	forma unicelular	8	28
	forma filamentosa	9	33

• tomado de Berkeley y col., 1979

### II.2.1 Propiedades y usos potenciales de polímeros de quitina.

El quitosano y la quitina tienen pesos moleculares aproximados de  $1.2 \times 10^5$  y  $1.04 \times 10^6$  daltons respectivamente.

El quitosano es soluble en HCl dil. o en ácidos orgánicos, como el acético o el fórmico. Además, es soluble en HNO<sub>3</sub> dil., parcialmente soluble en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0.5 % e insoluble en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a cualquier concentración a temperatura ambiente.

Knorr (1982) estudió las propiedades de retención de agua y de lípidos de quitosano, quitina, quitina microcristalina y celulosa microcristalina, encontrando que el quitosano tuvo la mayor retención de agua (440%), mientras que la celulosa microcristalina tuvo la menor (230%). La capacidad de retención de grasa fue menor para el quitosano (170%) y mayor para la quitina (215%).

El mismo grupo investigó la capacidad del quitosano y de la quitina para enlazar al colorante FD&C Rojo No.40, encontrándose en ambos una correlación entre la concentración de colorante y la capacidad de su retención por parte de los polímeros (esto para un intervalo de 0.2 a 1.6 mg colorante / g polímero). La capacidad de retención fue constante para el quitosano entre valores de pI de 5.5 y 7.0, mientras que para la quitina lo fue entre 2.0 y 7.0. Con estos resultados se sugiere el uso del quitosano y la quitina como acarreadores de aditivos alimentarios, aprovechando la ventaja de que no son absorbidos en el organismo. También se ha sugerido el uso de estos polímeros para la liberación controlada de nutrientes y medicamentos, ya que son degradados por la lisozima en productos no tóxicos (Knorr, 1983).

Se han estudiado las propiedades del quitosano relacionadas con la formación de películas para fabricación de empaques, consiguiéndose una mejor calidad como barrera para el oxígeno, pero con menor resistencia a la tensión que películas de empaque sintéticas como el mylar y el polipropileno; este último inconveniente se soluciona al entrecruzar el quitosano con epíclorhidrina (Knorr, 1991).

El carácter de polielectrolito del quitosano sugiere su uso como un agente coagulante en el tratamiento de desperdicios, ya que puede unir a él numerosas moléculas mediante interacción iónica y precipitar junto con ellas. Bough y Landes (1978) ofrecen un listado de la composición aproximada de los sólidos recuperados por coagulación con quitosano a partir de varios desperdicios de procesos en la industria de alimentos (ver Tabla 4). Se desprende que el quitosano está entre los mejores agentes coagulantes y que su principal ventaja sobre los polímeros sintéticos es que podría ser aprobado por la FDA como ingrediente en alimentos para animales, facilitando el uso alimentario de derivados provenientes de desperdicios industriales.

Se ha probado la utilidad del quitosano en la remoción de compuestos indeseables como metales pesados, taninos y pesticidas, en algunos sistemas alimenticios. Además se han propuesto procesos de desacidificación de café y para la purificación de agua. La Agencia de Protección Ambiental de los E.E.U.U. ha aprobado el uso de quitosano para la purificación de agua potable hasta una concentración máxima recomendada de 10 mg/l (Knorr, 1984).

Tabla 4. Composición aproximada de sólidos coagulados por quitosano a partir de efluentes de procesamiento de alimentos. \*

	Composición de los sólidos (%)		
	proteína	grasa	cenizas
Lodos activados de cervecera.....	37 <sup>b</sup> , 52 <sup>a,d</sup>	2	16
Agua de escaldado de industria avícola.....	68 <sup>a</sup>	1	15
Residuos de lavado de huevo.....	44 <sup>b</sup>	38	4
Residuos de camarón.....	32 <sup>a</sup>	-	-
Residuos de pastelería.....	13 <sup>a</sup>	-	2
Suero lácteo.....	75 <sup>c</sup>	0.2	10

\* tomado de Bough y Landes, 1978

<sup>a</sup> Basado en Kjeldahl N x 6.25

<sup>b</sup> Basado en contenido total de aminoácidos

<sup>c</sup> Basado en Kjeldahl N x 6.4

<sup>d</sup> Incluye aprox. 0.06 g N en quitosano por 100g de lodo

El quitosano ha resultado ser un efectivo agente clarificante para jugo de manzana, reduciendo la turbidez a cero cuando se aplicó en una concentración de 0.8 kg / m<sup>3</sup> (Soto Peralta y col., 1989). Imeri y Knorr (1988) emplearon el quitosano para la clarificación de jugos de zanahoria y de manzana.

Popper y Knorr (1990) determinaron que el quitosano sirve no sólo para reducir la turbidez sino además la cuenta microbiana en jugo de manzana inoculado con bacterias gram-positivas y gram-negativas.

La recuperación de productos intracelulares luego del rompimiento de células bacterianas es un proceso que presenta muchos problemas en el momento de la separación por medio de centrifugación y filtración. Recientemente, se ha intentado mejorar este proceso incorporando una etapa de floculación selectiva. El quitosano ha resultado ser un buen prospecto para esta función, aprovechando su propiedad de polielectrolito (Agerkvist y col., 1990).

Se han realizado diversos estudios sobre los efectos del quitosano en la dieta. En conejos y gallinas no provocó síntomas anormales durante 239 días con ingestas menores de 0.8 g quitosano / kg peso corporal / día y 1.4 g quitosano / kg peso corporal / día respectivamente. En estos animales se observó un efecto de reducción de los niveles de colesterol al suplementar la dieta con quitosano. En ratas, un 10% de quitosano en la dieta no inhibió el crecimiento. La LD50 de quitosano en animales de laboratorio es de 16 g / kg peso corporal (Knorr, 1991).

El quitosano también ha sido evaluado como material de soporte en la elaboración de biocatalizadores, por ejemplo, Braun y col. (1989) han desarrollado diversos sistemas en los que la penicilina G acilasa retiene buena actividad y estabilidad con el tiempo, inmovilizada en quitosano activado con glutaraldehído. El uso de membranas de quitosano pretratado con glutaraldehído ha resultado

muy eficiente para la inmovilización de ureasa, reteniéndose un 94% de la actividad original y aumentándose la estabilidad a bajos valores de pH y la termoestabilidad (Krajewska y col., 1990). Puede resultar de gran interés el empleo del quitosano en la inmovilización de enzimas empleadas en la industria alimentaria. Este es usado comercialmente para inmovilizar la enzima glucosa isomerasa (Sandford, 1989).

El quitosano ha resultado ser un agente permeabilizante para las membranas celulares de tejidos vegetales, siendo útil en la encapsulación de estos tejidos de modo que ayude a la liberación de metabolitos secundarios. Existe el inconveniente de que afecta la viabilidad de las células, pero este problema se resuelve con el uso de sales de quitosano solubles en agua. Además, se ha observado que el quitosano puede estimular la secreción misma de algunos metabolitos secundarios, como agentes antimicrobianos, lo que puede ayudar a la prevención de contaminación microbiana en cultivos de células vegetales (Knorr y cols., 1990).

Además de sus usos en la industria de alimentos el quitosano encuentra diversas aplicaciones en medicamentos, cosméticos y agricultura. Algunos de los usos potenciales del quitosano y la quitina son los siguientes: en la industria de medicamentos como agente hemostático, en ungüentos para heridas, materiales oftálmicos y ortopédicos, tratamientos para la piel, incluso como agentes antitumores; en cosméticos en productos para el pelo, para la piel y para el cuidado oral; en el ramo agropecuario como fertilizante, ingrediente alimenticio para ganado y peces,

nematocida e insecticida, acarreador de aditivos microbianos para el suelo, etc.(Kovaly, 1989).

#### 11.2.2. Fuentes tradicionales de quitina y quitosano.

El quitosano se obtiene actualmente a partir de la quitina obtenida del caparazón de crustáceos. La materia prima empleada es el desperdicio del procesamiento industrial de estos mariscos. En los E.E.U.U. se obtiene la quitina principalmente de cangrejo y de camarón, mientras que en el Japón se emplean en especial el camarón y el langostino (Knorr, 1991; Shimara, 1989). El contenido de quitina en los desperdicios de cangrejo y camarón es de 13-15% y 14-27% respectivamente (Knorr, 1991).

Además de los mencionados, existen otros mariscos cuyos desperdicios de procesamiento pueden ser aprovechados para la obtención de quitina y consiguientemente de quitosano, como son el krill, las almejas y ostras y el calamar. Se estima que los desperdicios de todos estos mariscos en el mundo son de aproximadamente  $1.4 \times 10^6$  toneladas métricas, de los que podrían extraerse potencialmente de  $1.2 \times 10^5$  toneladas métricas de quitina (ver Tabla 5), pero existe el problema de su recolección..

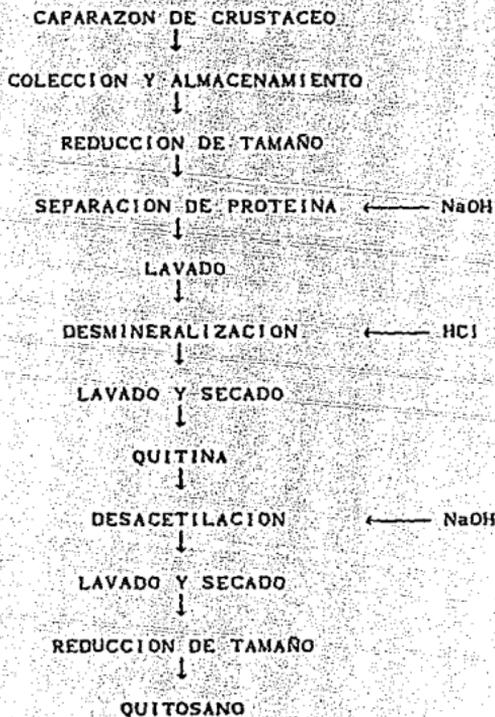
Tabla 5. Estimados globales de fuentes potenciales de quitina a partir de alimentos marinos \*

	Residuo seco (10 <sup>3</sup> ton)	Quitina (10 <sup>3</sup> ton)
Crustáceos	154	39
Krill	801	56
Almejas y ostras	482	22
Calamar	21	1
Total	1458	118

\* tomado de Knorr, 1991

El proceso de extracción de la quitina de los desperdicios de crustáceos consta de dos etapas principales. En la primera, el material molido es tratado con una solución diluida de NaOH para remover la proteína. Si se desea recuperar la proteína se lleva el pH de la solución de proteína a aproximadamente 4 y el precipitado se seca. La segunda etapa comprende la separación de minerales como el carbonato de calcio y el fosfato de calcio, por adición de una solución diluida de HCL (hasta 10%); después de lavar la quitina, se seca para obtener el material en forma de hojuelas (Knorr, 1984; Sandford, 1989).

FIG. 1 DIAGRAMA DE FLUJO SIMPLIFICADO DE LA OBTENCION DE QUITINA Y QUITOSANO A PARTIR DE CRUSTACEOS



• tomado de Knorr, 1984

Para producir el quitosano a partir de la quitina, ésta se trata en caliente con una solución concentrada (40-50%) de NaOH, para hidrolizar el enlace N-acétilo. Luego de un lavado, el pH se

ajusta y se seca para obtener el producto en forma de hojuelas, el que puede ser molido para tener finalmente un polvo fino. El material desacetilado puede ser disuelto en una solución ácida antes de ser secado, para obtener una sal soluble de quitosano (Sandford, 1989; Knorr, 1984).

### II.2.3. Fuentes alternativas de polímeros de quitina.

Hasta ahora la quitina y el quitosano disponibles en el mercado se obtienen como ya se especificó previamente, sin embargo la demanda está limitada por los altos precios que resultan de los costos de producción. La reproducibilidad en la calidad de los productos obtenidos se ve también limitada por las variaciones en las materias primas debidas a las diferentes especies usadas, la estación del año y al deterioro que va ocurriendo en los materiales durante el almacenamiento por la acción de enzimas que degradan a la quitina y al quitosano (quitinasa y quitosanas). Esto ha motivado el que se exploren otras fuentes en las que se puedan aplicar procesos de producción más controlados y económicos.

Se ha investigado la posibilidad de emplear las diatomeas *Cyclotella cryptica* y *Talassiostra fluviatilis* como materia prima, aprovechando que en ellas la quitina se encuentra en un 10-15% de su peso seco y en forma no asociada a otros polímeros. Esto facilitaría su extracción, pero ha resultado que sus cultivos en procesos por lotes y continuos han sido de muy lento crecimiento, con rendimientos de quitina que no superan los 20

mg/l. Otra opción posible sería la extracción de la quitina a partir de la biomasa que resulta como desperdicio en fermentaciones industriales de algunos hongos como *Aspergillus niger*, que se emplea en la producción de ácido cítrico; sin embargo en estas fuentes la quitina está fuertemente asociada con glucanos y no es fácil su separación (Berkeley, 1979).

Para la obtención del quitosano, una alternativa que resulta muy atractiva es el evitar su producción por modificación química de la quitina y extraerlo directamente de fuentes naturales que lo contengan como tal. La fuente obvia sería algún hongo de la subdivisión Zygomycotina.

White y col., (1979) desarrollaron un proceso de obtención de quitosano a partir de *M. rouxii*, obteniendo rendimientos desde 0.4 hasta 1.1 g quitosano/litro en fermentador de 11 litros. Hang (1990) obtuvo 0.7 g quitosano / litro empleando *Rhizopus oryzae*. Más recientemente Shimara y col. (1989) examinaron 125 cepas correspondientes a 101 especies dentro de la familia Mucoraceae y encontraron que en cepas del género *Absidia* se obtuvieron los mayores rendimientos de quitosano, en especial *A. butleri* HUT 1001, con 0.8-0.9 g quitosano / litro a los dos días y 0.9-1.0 g/l a los cuatro días, empleando matraces agitados con 200 ml de medio.

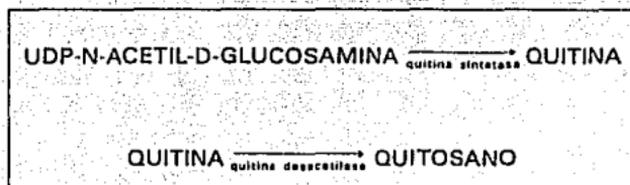
#### II.2.4. Síntesis de quitosano en hongos filamentosos.

Bartnicki-García (1989) ofrece una explicación detallada acerca de la síntesis de quitina y quitosano en las paredes celulares de los hongos.

En la construcción de la pared celular en los hongos intervienen dos tipos de vesículas que transportan las sustancias involucradas hacia el sitio de formación. Las macrovesículas (con diámetro mayor a los 100 nm) transportan los polímeros que comprenden la fase amorfa de la pared (polisacáridos no fibrilares, glucoproteínas), los cuales son sintetizados en el trayecto, mientras que las microvesículas o quitosomas (con diámetro menor a los 100 nm) contienen la enzima quitina sintetasa y la conducen hacia la superficie celular (periplasma). Allí cataliza la formación de la quitina *in situ*, creándose el esqueleto microfibrilar.

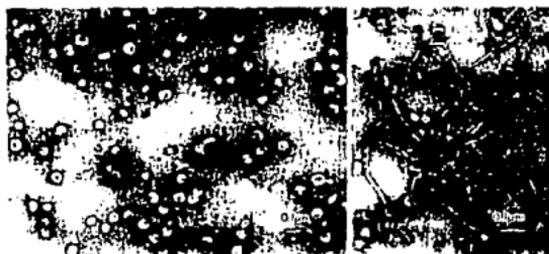
El sustrato para la síntesis de la quitina es la UDP-GlcNAc (uridina difosfato N-acetil-D-glucosamina).

FIGURA 2. BIOSÍNTESIS DE QUITOSANO



La quitina sintetasa se encuentra en los quitosomas en forma inactiva (zimógeno), lo que explica que no catalice la formación de quitina en el trayecto de los quitosomas hacia la superficie celular, a pesar de que la UDP-GlcNAc se encuentra libre en el citosol. Es ya en el periplasma, en el sitio específico en donde se construye la pared, donde la enzima es activada por una proteasa y se inicia la polimerización. Con esta forma selectiva de síntesis de las microfibrillas de quitina se puede generar el crecimiento apical típico de las hifas y además los arreglos necesarios para producir la diversidad morfológica entre los hongos. En la Figura 3 se muestran imágenes microscópicas de una muestra de quitosomas aislados y de las microfibrillas de quitina sintetizadas por éstos *in vitro*.

FIGURA 3. MUESTRAS DE QUITOSOMAS AISLADOS Y DE MICROFIBRILLAS DE QUITINA PRODUCIDAS *IN VITRO* •



Izquierda: una muestra limpia de quitosomas de células de levadura de *Mucor rouxii* después de sedimentación de una muestra cruda de quitosomas en un rotor Beckman VTI 65 (373,000 g R<sub>v</sub> por 3 h)

Derecha: un racimo de microfibrillas de quitina producidas *in vitro* por incubación de quitosomas aislados de *M. rouxii* con UDP-GlcNAc y activadores.

• tomado de Bartnicki-García, 1979

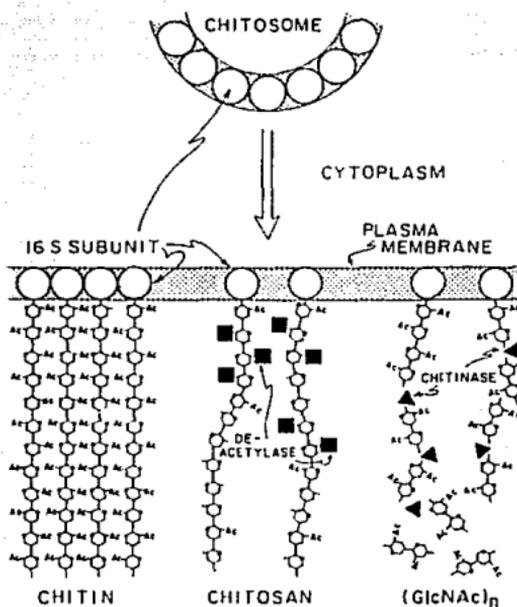
Flores-Carreón y col. (1980) proponen que en *M. rouxii* existen dos almacenes del zimógeno de la quitina sintetasa, uno pequeño situado en la membrana plasmática, que es rápidamente activado por la proteasa, y otro mayor asociado a estructuras internas (quitosomas), en el que se requiere mayor tiempo de proteólisis del zimógeno para su activación.

Existe evidencia de que el quitosano que forma parte de la pared celular de algunos hongos se produce a partir de la quitina que genera la quitina sintetasa mediante la desacetilación catalizada por la enzima quitina desacetilasa. Las cadenas de quitina que forman parte de las microfibrillas están altamente asociadas por puentes de hidrógeno y la quitina desacetilasa no tiene acceso para efectuar su acción más que en algunos enlaces superficiales. De esta manera sólo puede atacar a la quitina en el momento en que ésta es sintetizada por la quitina sintetasa. Por lo tanto, para la síntesis del quitosano es necesario que ambas enzimas actúen en forma coordinada.

El mecanismo por el cual se regula la proporción de quitina y de quitosano en la pared no ha sido dilucidado, pero con el conocimiento que se tiene hasta ahora se propone que depende de la organización espacial de las moléculas de quitina sintetasa en la superficie celular. Si las moléculas de quitina sintetasa permanecen en la superficie de la pared con la organización apretada que poseen en los quitosomas, las cadenas de quitina se asociarán en microfibrillas a medida que se sintetizan, impidiéndose el acceso de la quitina desacetilasa. Por lo

contrario, si la quitina se llega a dispersar al llegar a la superficie celular, se producirán cadenas aisladas susceptibles a desacetilación, formándose el quitosano (Davis y Bartnicki-García, 1984). En la Figura 4 se esquematiza el modelo propuesto.

FIGURA 4. MODELO DE REGULACION DE BIOSINTESIS DE QUITINA  
Y QUITOSANO EN *MUCOR ROUXII* •



• tomado de Bartnicki-García, 1979

### II.3 MUCOR ROUXII Y RHIZOMUCOR MIEHEI

*M. rouxii* y *R. miehei* son especies que comparten la siguiente clasificación:

División..... Eumycota  
Subdivisión..... Zygomycotina  
Clase..... Zygomycetos  
Orden..... Mucorales  
Familia..... Mucoraceae

La familia Mucoraceae se caracteriza por la presencia de esporangios muy esporulados que contienen en su interior el extremo del esporangióforo en forma de columela. De los 18 géneros aceptados en la familia, *Mucor* es generalmente reconocido como el más primitivo y es uno de los más grandes en el orden Mucorales, incluyendo un número de especies ampliamente distribuidas y de considerable importancia.

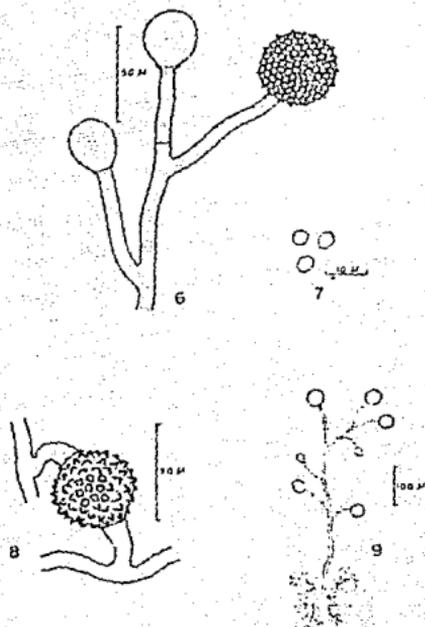
Las colonias son de crecimiento rápido, iniciando con una coloración de blanco a amarillo que luego se hace gris oscuro con el desarrollo de los esporangios. Los esporangióforos se desarrollan en forma densa, erecta, sin rizoides basales, ramificados más o menos simpodialmente o algunas veces en forma de racimo (no dicotómicamente), que poseen esporangios terminales muy esporulados sin apófisis y con una columela grande. La pared del esporangio está a menudo cubierta con espigas de oxalato de calcio y se rompe al madurar. Las esporangiosporas son translúcidas, de color grisáceo a café, de pared lisa o finamente ornamentada y de

forma esférica a elipsoidal. En algunas especies se encuentran clamidosporas translúcidas. Las hifas sumergidas pueden formar células en forma de levadura llamadas a menudo oídios. En el micelio aéreo se pueden formar zigosporas entre tipos de apareamiento compatibles, de color café oscuro con la característica de ser espinosas o verrugosas. En su mayoría son heterotálicos. (Domsch y col., 1980; Onions y col., 1981.)

Durante mucho tiempo se clasificó a *M. miehei* dentro del género *Mucor*, sin embargo, en 1976 Schipper separó esta especie (junto con *M. pusillus*), creando el nuevo género *Rhizomucor*, por diferenciarse de las especies de *Mucor* en que poseen rizoides y estolones (aunque poco desarrollados) y en ser termófilos. En la Figura 5 se presentan las características microscópicas de *R. miehei*.

El crecimiento de *M. rouxii* en medio sólido puede ser de 4 mm de alto, de color blanco, amarillo ligero o gris, en forma holgada. Los esporangióforos se ramifican simpodialmente. El esporangio es amarillo brillante o café dorado, de 20 a 100  $\mu$  de diámetro (usualmente 50  $\mu$ ); la columela es hasta 40  $\mu$  de alto, esférica o aplanada, a menudo con una membrana coloreada; las esporas son de 4-5  $\mu$  de largo. Posee numerosas clamidosporas, hasta de 100  $\mu$  de diámetro, con paredes de 7  $\mu$  de grosor. No se le conocen zigotos (Gilman, 1957). Crece bien en condiciones de temperatura mesófilas, empleándose normalmente los 28°C. Es un hongo dimórfico, pudiendo crecer en forma filamentosa o unicelular; para desarrollarse en la primera forma necesita de un ambiente aeróbico

FIGURA 5. MORFOLOGIA MICROSCOPICA DE RHIZONIUCOR MIEHEI •



- 6 Porción terminal de un esporangio mostrando un esporangio y dos columnas.  
 7 Esporangiosporas  
 8 Zigospora madura  
 9 Esporangio desarrollado a partir de una espora

• tomado de Cooney y Emerson, 1964.

y bajas concentraciones de las fuentes de carbono, mientras que para que se dé la forma unicelular requiere de altas concentraciones de fuentes de carbono o bien de un ambiente anaeróbico (Cano-Canchola y col., 1988).

El dimorfismo también se presenta en otras especies de los Mucorales. En nuestro laboratorio, una cepa de *Rhizomucor pusillus* aislada del suelo creció en un medio a base de plátano (bajo condiciones aeróbicas) en forma filamentosa cuando la concentración inicial de carbohidratos fue de 35 g/l y en forma de levadura cuando la concentración fue de 45 g/l (Wacher, 1981).

*Rhizomucor miehei* posee un micelio delgado y corto, de hasta 2 mm de altura, al principio blanco y posteriormente gris humo. El esporangióforo se ramifica simpodialmente, en forma holgada y es incoloro, de unas 8  $\mu$  de diámetro. El esporangio es de 30-52  $\mu$  de diámetro; la columela es esférica u oval, de hasta 48  $\mu$  de altura. Las esporas son de 3-5  $\mu$  por 4-6  $\mu$ . En medio YpSs (con extracto de levadura, almidón, etc.) a temperaturas de 30-40 °C, se desarrollan zigosporas redondas, de 30-50  $\mu$  de diámetro, primero de color amarillento a rojizo y posteriormente negras; esto puede ocurrir en medio líquido además del sólido (Lasure, 1976). Es homotático. En algunas cepas pueden crecer azigosporas. Puede crecer entre 25 y 57 °C, pero de 25 a 30 °C lo hace extremadamente lento y a 55°C crece sólo micelio estéril; el rango de mayor crecimiento es de 35 a 45 °C. (Beschreibung y col., 1969; Cooney y Emerson, 1964).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.1. CEPAS. MANTENIMIENTO.

Se obtuvieron las cepas de *Mucor rouxii* y *Rhizomucor miehei* del cepario de la Colección de Microorganismos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional (México, D.F.).

Para el mantenimiento de *M. rouxii* se usó el medio YPD (0.3% de extracto de levadura, 0.3% de extracto de malta, 0.5% de peptona y 1.0% de glucosa). Para *R. miehei* se empleó agar papa dextrosa. Ambas cepas se conservaron a 4°C en cajas Petri y tubos inclinados y fueron sembradas mensualmente, incubándose por 3-4 días a 28°C (*M. rouxii*) y 37°C (*R. miehei*).

#### III.2. CULTIVO

Se probaron varios medios de cultivo para el crecimiento de *Rhizomucor miehei*. Se seleccionaron dos, uno definido y otro complejo, en los que hubo producción de actividad de renina. Ambos se emplearon en el cultivo de *M. rouxii* + *R. miehei* (cultivo mixto), escogiéndose el más adecuado para la producción de actividad de renina y quitosano. Dicho medio tiene la siguiente composición:

suero de leche en polvo.....63.0 g/l  
glucosa.....30.0 g/l

Se emplearon matraces de 500 ml con tres baffles teniendo 100 ml de medio de cultivo, los que se inocularon con  $5 \times 10^6$  esporas de una suspensión preparada el mismo día.

La suspensión de esporas se obtuvo añadiendo 5 ml de agua destilada esterilizada con 0.1% de TWEEN 80 y tres perlas de ebullición a cada uno de tres tubos inclinados en los que se había dejado crecer y esporular el hongo durante 3-4 días y se agitaron para recoger las esporas. Las suspensiones de los tres tubos se juntaron y se determinó la concentración de esporas empleando una cámara de Neubauer.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en una cámara de agitación orbital con temperatura controlada EDISA-CDMIT, de diseño y fabricación de la UNAM.

### III.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL TIPO DE INOCULO.

Se realizaron cultivos sumergidos en 100 ml de medio, en matraces de 500 ml, con los siguientes inóculos:

- *Mucor rouxii*
- *Rhizomucor miehei*
- *M. rouxii* + *R. miehei* (MIXTO).

En cada caso, el inóculo fue de  $5 \times 10^6$  esporas, manteniéndose la misma cantidad para cada especie en el cultivo mixto. Se emplearon tres matraces para cada tipo de inóculo, a temperaturas definidas: 30, 32, 35, 37 y 40 °C.

Las fermentaciones se realizaron con agitación orbital a una velocidad de 110 rpm. Todos los matraces se sacrificaron a los siete días de fermentación. Se escogió este tiempo de fermentación por ser el recomendado para este medio de cultivo por Feldman (1981). El contenido de cada matraz se filtró y se almacenó el filtrado a 4°C para determinarle actividad de renina al día siguiente, mientras que el micelio retenido se lavó y se secó al vacío para determinar el rendimiento de biomasa y continuar con el análisis de quitosano.

Se evaluaron los efectos de la temperatura y del tipo de Inóculo sobre los rendimientos de biomasa, actividad de renina y quitosano.

En resumen, las condiciones de fermentación fueron las siguientes:

Medio de cultivo ..... suero de leche (97%) + glucosa (3%)  
Matraces ..... 500 ml / 3 baffles  
Volumen ..... 100 ml  
Inóculo .....  $5 \times 10^6$  esporas  
pH Inicial ..... 6.0  
Agitación ..... 110 rpm  
Tiempo ..... 7 días

### III.4. ANALISIS DE RENINA

El método más común para la determinación de actividad de renina se basa en establecer el tiempo que tarda la solución que contiene la enzima en coagular la leche. Este método (actividad de coagulación de la leche) se ensayó para cada muestra, como evaluación de la actividad de renina.

#### Actividad de coagulación de la leche.

En un tubo de ensayo se colocaron 3 ml de una solución al 10% de leche descremada en polvo en en  $\text{CaCl}_2$  0.01M. Este tubo se colocó en un baño de temperatura controlada a  $37.5^\circ\text{C}$ , durante 10 minutos, en el que también se colocó un tubo con muestra del filtrado de la fermentación para equilibrar su temperatura. Se añadieron 3 ml del filtrado de fermentación al tubo con la solución de leche, se agitó y se mantuvo en el baño. Se observó el tiempo que tardan en aparecer los primeros coágulos de leche. La operación se realizó por triplicado para cada matraz, con un error no mayor al 3%.

La actividad de coagulación de la leche se expresó como unidades Soxhlet por mililitro (su/ml), tal como es definido por Lemoine y col. (1970): "Una unidad Soxhlet es la cantidad de actividad enzimática que coagula 1 ml de la solución de leche arriba definida en 40 min".

La ecuación que se usó para el cálculo de las unidades Soxhlet (su) es la siguiente:

$$\text{su/ml} = \frac{M \text{ (ml)} \times 2400 \text{ (seg)}}{E \text{ (ml)} \times t \text{ (seg)}}$$

donde:

M = volumen de leche

E = volumen de solución de enzima

t = tiempo de aparición de los primeros coágulos

Este ensayo es válido en un intervalo de 2 a 20 su/ml. Por tal razón, el filtrado de la fermentación se diluyó cuando fue necesario para tener una actividad de aproximadamente 10 su/ml, lo que implica un tiempo de coagulación de alrededor de 4 min.

Como se emplearon 3 ml de leche y 3 ml de solución de enzima, la ecuación queda así:

$$\text{su/ml} = \frac{2400 \text{ (seg)}}{t \text{ (seg)}}$$

### III.5. AISLAMIENTO Y ANALISIS DE QUITOSANO

Este análisis se realizó en cuatro etapas:

- Obtención de las células secas.
- Aislamiento de la pared celular.
- Extracción del quitosano.
- Análisis del porcentaje de glucosamina en el quitosano.

Se emplearon los procedimientos definidos por White y col.(1979) y las modificaciones asumidas por Arcidiacono y col. (1989). En la Figura 6 se presenta un esquema de las etapas de este análisis.

#### Obtención de las células secas.

El contenido de cada matraz se filtró al vacío con embudo Büchner usando papel Whatman No. 1. El filtrado se guardó para el análisis de renina. Se lavó el micelio con agua destilada (aprox. 200 ml) hasta obtener un filtrado claro.

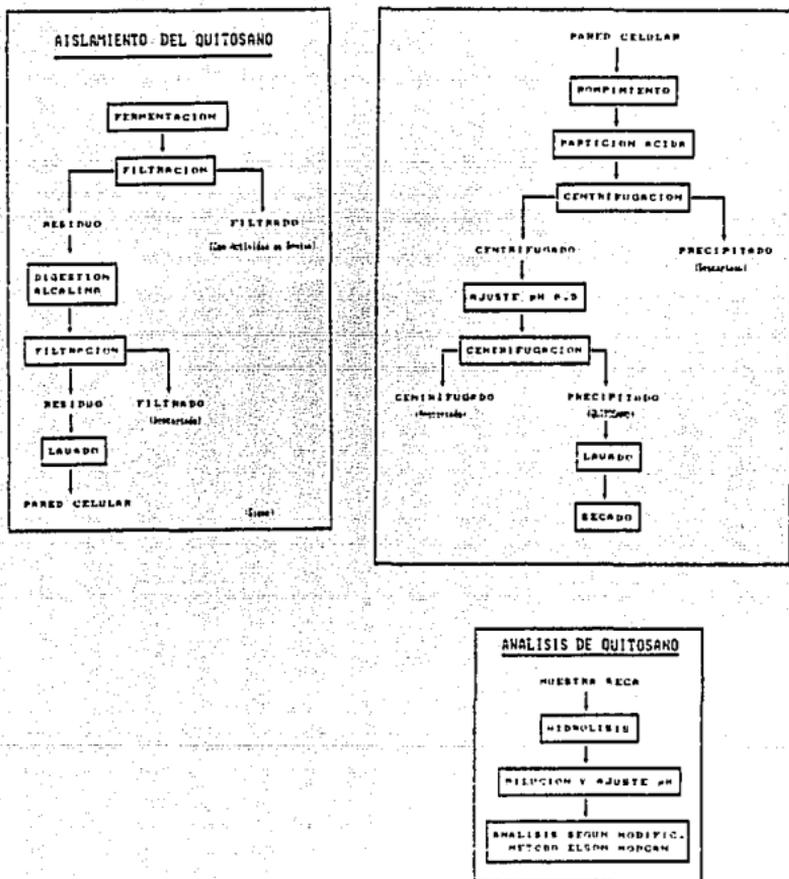
El micelio lavado se secó al vacío a 20 psi y 80°C por 15 horas y se determinó el peso seco por diferencia con el papel de filtro tarado en las mismas condiciones.

#### Aislamiento de la pared celular.

El micelio seco se humedeció con agua destilada y se pasó a un vaso de licuadora, añadiéndosele 40 ml de agua destilada. Se homogenizó en una licuadora a velocidad alta durante 2 min.

El homogenizado se pasó a un matraz de 500 ml, se añadieron 50 ml de una solución de NaOH 4 N y se adiciona agua destilada hasta un volumen de 200 ml. Se calentó en autoclave a 121°C y 15 psi, por 15 min. De este modo, el micelio húmedo es sometido a digestión con NaOH 1 N en una relación 1:20. En esta operación se solubilizan los componentes citoplasmáticos, quedando insoluble la pared celular.

FIGURA 6. AISLAMIENTO Y ANALISIS DE QUITOSANO



Después de enflar, la suspensión se filtró en embudo Büchner usando papel Whatman No. 1 y se lavó dos veces con 50 ml de alcohol al 95% y dos veces con 50 ml de agua destilada.

El material retenido en el papel se sometió a secado en estufa de vacío a 20 psi y 80°C durante 15 horas. Se determinó el peso de pared celular seca por diferencia con el peso del papel filtro tratado en las mismas condiciones.

#### **Extracción del Quitosano.**

Se transfirió la pared celular del papel filtro a un mortero, humedeciéndola con agua destilada, y se homogenizó con la ayuda de arena de mar purificada (Merck Co.). Se pasó el homogenizado a un matraz de tres bocas de 50 ml, empleando agua destilada (aproximadamente 12 ml) para remover lo que quedaba en la pared del mortero y se adicionaron 2 ml de HCl 1 N. La muestra preparada de esta forma se puso en reflujo durante 5 h a 93-95°C, para disolver el quitosano contenido en la pared celular.

Después del reflujo, el contenido del matraz se centrifugó a 14000 x g durante 10 min, se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó a pH 8.5 para insolubilizar el quitosano. Se centrifugó de nuevo con las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante, quedando el quitosano insoluble.

El quitosano extraído se lavó con 200 ml de agua destilada, usando embudo Büchner y papel filtro Whatman No. 1; se pasó a una cápsula

de aluminio previamente tarada, se secó al vacío y se pesó.

#### Análisis del porcentaje de glucosamina en el quitosano.

Se pesaron 15-20 mg del quitosano extraído y se colocaron en una ampolleta de 10 ml, adicionando 3 ml de HCl 6 N. Se hizo pasar por la muestra una corriente de  $N_2$  durante 5 minutos para crear atmósfera inerte y se cerró la ampolleta a la flama. Esta misma operación se realizó con estándares de glucosamina y de quitosano, para compensar los un posible deterioro de glucosamina durante el tratamiento. Las ampolletas se dejaron 12 h a  $105^\circ C$ . Esta operación se realizó para hidrolizar el quitosano a unidades de glucosamina, tratando de minimizar la destrucción de ésta.

Después de la hidrólisis, el contenido de las ampolletas se pasó a un vaso de precipitado, se diluyó a 40 ml y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH. La muestra neutralizada se diluyó a 100 ml en un matraz aforado y se filtró en papel Whatman No. 1; el filtrado se diluyó de modo que la glucosamina quedara en una concentración de 10 a 50  $\mu g/ml$ .

Se tomó 1 ml de la muestra y se analizó la glucosamina presente por el método de Elson Morgan modificado (Johnson, 1971). Con este método se tomó 1 ml de la muestra y se acetiló calentando en un baño de agua hirviendo durante 30 min con 1 ml de una solución de acetilacetona al 4% en  $Na_2CO_3$  1.5N. Se agregaron 5 ml de etanol absoluto y 1 ml del reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído al 2.67% en una solución 1:1 de etanol

al 95% y HCl concentrado) y se dejó desarrollar el color durante 25 min. Las lecturas se hicieron a 528 nm, empleando un espectrofotómetro Shimadzu mod. UV-120-02.

Se determinó el porcentaje de glucosamina en el quitosano. Con este valor y el del peso de quitosano crudo extraído se calcularon los rendimientos de quitosano.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### IV.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Se realizaron algunos experimentos preliminares con el fin de establecer algunas condiciones de fermentación y validar los métodos de análisis.

#### IV.1.1 Validación de la técnica de extracción de quitosano

Como primer experimento, se cultivó *Mucor rouxii* en matraces de 500 ml con tres baffles, empleando el medio de YPD descrito por White y col. (1979). La temperatura fue de 28°C con una agitación de 110 rpm (la máxima velocidad a la que no se mojaban los tapones de algodón de los matraces) y el tiempo de fermentación de 4 días. Para evitar la formación de espuma se agregó al medio de cultivo antes de la esterilización dos gotas de antiespumante CRE/R100 (Mazer de México).

Para determinar la concentración de quitosano en el cultivo es necesario primero separar la pared celular de la biomasa. Esto se logra con el tratamiento alcalino en autoclave descrito en materiales y métodos. Para evaluar la remoción de componentes citoplasmáticos en el lavado de la pared celular se leyó la absorbancia a 280 nm de los solventes luego de cada lavado.

El alcohol al 95% arrastró componentes solubles con una absorbancia que fue de mayor de 1 en los primeros 50 ml y de 0.30

en la segunda porción. Para el agua destilada las absorbancias después del lavado fueron de 0.05 en la primera porción y 0.03 en la segunda. Estos últimos valores indican que ya quedaba muy poco material citoplasmático por remover, y aunque ya están en una región de alta variación en la medida de absorbancia, se puede señalar que corresponden en términos de proteína a una concentración entre 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ .

Para el análisis del quitosano extraído de la pared celular es necesario hidrolizar el polímero para obtener unidades de glucosamina. Sin embargo, parte de la glucosamina liberada se destruye en este proceso y para minimizar esta destrucción se emplea una atmósfera inerte. Se determinó el porcentaje de glucosamina lábil durante la hidrólisis ácida en atmósfera de Helio empleando un estándar de glucosamina y como control para verificar que la hidrólisis haya sido completa se utilizó una muestra comercial de quitosano de pureza conocida.

Por razones de disponibilidad del gas inerte, al analizar las muestras de los experimentos posteriores se empleó Nitrógeno en lugar de Helio y fue necesario repetir las pruebas anteriores. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la pérdida de glucosamina en el estándar fue de 3%, y el quitosano determinado en la muestra comercial fue un 95% del valor reportado. Adicionalmente, se determinó la humedad promedio en las muestras de quitosano crudo extraído en el momento de ser pesadas para proceder a la hidrólisis ácida, resultando ser de únicamente 2%. Tomando en cuenta los dos últimos valores, se corrigieron los

resultados del análisis espectrofotométrico de glucosamina. Estos valores corresponden al promedio de los análisis de estándares que se realizaron en cada grupo de ampollitas que fueron llenadas y sometidas a calentamiento.

Estos métodos analíticos se corroboraron en la fermentación de *M. rouxii* arriba mencionada en medio YPD a 28°C. El crecimiento al final de la fermentación (4 días) fue de 4.2 g/l (promedio de tres matraces, con una desviación estándar de 0.3) y el contenido de quitosano en el micelio fue de 6.6 ± 0.3 % . Este valor de quitosano coincide con los resultados de White y col. (1979), quienes reportan para *M. rouxii* un 4-8% del peso seco de las células.

#### IV.1.2 Selección del medio de cultivo

Una vez montada la fermentación, se hicieron pruebas para seleccionar un medio de cultivo adecuado para la producción de renina de *Rhizomucor miehei* y validar el método de análisis de renina en términos de la precisión. Un medio de composición semejante al empleado para *M. rouxii*, basado en glucosa, peptona de caseína y extracto de levadura no presentó actividad de coagulación de la leche. En consecuencia, se probaron dos medios de cultivo en los que se reportaba la producción de renina: uno definido que incluye citrato férrico amoniacal y caseína como fuentes de nitrógeno (Lasure, 1980) y uno complejo compuesto por suero de leche y glucosa (Feldman, 1981). Se ha propuesto que es necesaria la presencia de una proteína en el medio para obtener la

actividad de renina (Lasure, 1980). Parece que se necesita de la inducción de la enzima. Los sobrenadantes de ambas fermentaciones presentaron actividad de coagulación de la leche y se emplearon para validar el método. La actividad producida fue menor a las reportadas para otras cepas. No se intentó mejorar los rendimientos de renina, prefiriendo evaluar los efectos de variables ambientales sobre el cultivo mixto.

#### IV.1.3 Validación de la técnica de determinación de renina

Se asumió la definición de actividad dada por Lemoyne y col. (1970), con el análisis efectuado a 37.5°C. Los volúmenes de filtrado y de leche se escogieron de modo que el tiempo de coagulación de la leche resultara cercano a los 4 min; de este modo se decidió emplear 3 ml de filtrado de fermentación (con la dilución apropiada cuando fue necesario) y 3 ml de la solución de leche. Los análisis se efectuaron por triplicado y la dispersión de los resultados para una misma muestra fue menor al 3% de error relativo.

La actividad de renina obtenida con el medio de suero de leche fue notablemente mayor que la obtenida empleando el medio definido (14 su/ml vs. 3 su/ml). En consecuencia, el primero fue seleccionado para los estudios subsecuentes de los efectos de la temperatura y el tipo de inóculo. La composición de este medio es la siguiente:

suero de leche en polvo ..... 63.0 g/l  
glucosa ..... 30 g/l

#### IV.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE RENINA Y QUITOSANO.

El interés principal de este estudio se centra en establecer la posibilidad de lograr el cultivo mixto de *Rhizomucor miehei* y *Mucor rouxii*. Para esto, se determinaron los niveles de producción de renina y de quitosano con respecto a los obtenidos en cultivos por separado, evaluando el efecto de la temperatura. Se estudió también el efecto sobre el crecimiento de las células, ya que el quitosano es un componente de la pared celular y está directamente relacionado con el crecimiento.

La literatura señala que las temperaturas óptimas de crecimiento para las dos especies son diferentes, siendo *Mucor rouxii* mesofílico y *Rhizomucor miehei* termofílico. Esto implica que la temperatura es un factor muy importante a considerar, ya que las actividades enzimáticas involucradas en el desarrollo de las células y la producción de metabolitos se ven favorecidas por la temperatura en diferente manera para las dos especies. La temperatura más adecuada para el crecimiento de *Mucor rouxii* en la producción de quitosano es de 28°C, mientras que se reporta un intervalo de temperaturas entre 35 y 40 °C como el más adecuado para la obtención de renina a partir de *Rhizomucor miehei* (Charles y col., 1970). Esto, sin embargo, varía considerablemente con el medio de cultivo y otros parámetros ambientales. Cooney y Emerson (1964) ofrecen el intervalo de temperaturas en el que crecen diversos hongos clasificados como termofílicos, siendo éste de aproximadamente 20 a 60° C, mientras que un ejemplo de hongo

mesofílico es *Rhizopus nigricans*, el cual crece entre 8 y 30 °C .

Para estudiar el efecto de la temperatura, se consideraron varios niveles comprendidos entre 28 y 40°C; de este modo se incluyeron niveles de temperatura que favorecían a cada especie en particular, así como valores intermedios. Debido a que no se pudo lograr una menor temperatura en la cámara de agitación orbital (a 30°C estos experimentos se realizaron en época de verano), las temperaturas empleadas fueron: 30, 32, 35, 37 y 40 °C.

En las Figuras 7 a 11 se presentan los resultados del crecimiento alcanzado y la producción de renina y quitosano para los tres tipos de Inóculo (mixto y puros) a las diferentes temperaturas. Para todos los casos, las fermentaciones se realizaron durante 7 días. Los valores presentados son los promedios correspondientes a tres matraces sacrificados al final de la fermentación y la dispersión expresada como  $\pm$  una desviación estándar.

#### IV.2.1 Efectos sobre el crecimiento.

El peso seco de las células a los 7 días de fermentación se muestra en la Figura 7. El crecimiento de *R. miehei* fue mayor que el de *M. rouxii* en todo el intervalo de temperaturas, con rendimientos de 15-22 g/l para el primero y 8-12 g/l para el segundo entre los 30 a 37 °C. Esto indica que el medio de cultivo empleado es mejor aprovechado para el crecimiento por *R. miehei* que por *M. rouxii*, lo que podría significar que se parte de un medio que favorece el predominio del primero en el cultivo mixto.

No se intentó en esta etapa conocer el medio de cultivo más adecuado, sino uno de partida para observar los efectos de los factores ya explicados.

A 40°C, el crecimiento de *M. rouxii* fue muy pobre, con rendimientos entre 2 y 6 g/l. Este resultado corresponde con lo esperado, ya que esta temperatura no es adecuada para el crecimiento de un microorganismo mesófilo como *Mucor rouxii*.

Por otra parte, no se observaron variaciones importantes en el crecimiento de *Rhizomucor miehei* para el intervalo de temperaturas evaluado. Para poder hacer un juicio sobre la ausencia de diferencias en estos resultados, es necesario contar con las curvas de crecimiento a varias temperaturas y saber a qué tiempo se alcanzan los máximos rendimientos para cada una. No es de extrañar el abundante crecimiento de *R. miehei* a 30°C, tratándose de un medio sumergido; varios investigadores reportan el uso de esta temperatura para la producción de renina a partir de *R. miehei* (Aunstrup, 1976; Feldman, 1981; Mashaly y col., 1983).

En contraparte a la respuesta observada para *R. miehei*, el cultivo mixto presentó un efecto marcado de la temperatura. A 30 y 32 °C el crecimiento del cultivo mixto fue equivalente al de *M. rouxii*; a 35 y 37 °C tuvo valores intermedios entre los de los cultivos por separado (14-16 g/l), mientras que a 40°C alcanzó los niveles de *R. miehei*. Estos resultados sugieren que el crecimiento mixto entre las dos especies es de tipo competitivo o bien pudiera tratarse de una relación de amensalismo (relación en la que uno se

perjudica y el otro no es afectado). Existe la posibilidad de que ambas especies hayan disminuído su crecimiento con respecto a los cultivos puros, o que una de las dos crezca mientras la otra lo haya hecho sin verse afectada por la primera (excepto a 37°C, en donde el crecimiento de ambas especies se observa con claridad disminuído).

Es de esperar que en una relación competitiva el efecto de la temperatura se haga más importante en el crecimiento de un microorganismo que cuando éste se encuentra solo en el medio, y esto se observa en los resultados graficados. En el caso presente, lo esperado sería que, a medida que aumenta la temperatura, en el cultivo mixto se favorezca el predominio de *R. miehei* sobre *M. rouxii*; la diferencia en los niveles de crecimiento alcanzados por los cultivos puros de ambas especies permiten que se pueda relacionar el predominio de *R. miehei* sobre *M. rouxii* con un aumento del peso seco en el cultivo mixto.

Con la intención de confirmar las consideraciones anteriores, se efectuó la observación microscópica de preparaciones de muestras de los cultivos puros y mixtos correspondientes a las diferentes temperaturas (ver Figura 12a-e). Estas preparaciones se realizaron empleando agua destilada y se observaron en microscopio óptico mediante la técnica de contraste de fases. *R. miehei* creció siempre en forma filamentososa, con hifas delgadas de 2-6  $\mu$ , mientras que *M. rouxii* presentó dimorfismo, quedando al final de la fermentación con hifas delgadas (2-6  $\mu$ ) y gruesas (8-12  $\mu$ ) y numerosas células en forma de levadura. Estas diferencias en la

morfología de ambas cepas permitieron detectar la presencia (aunque no cuantificable) de las dos especies en el cultivo mixto. La concentración de carbohidratos (glucosa + lactosa) en el medio de cultivo es de 63 g/l; el que *M. rouxii* haya adoptado la forma de levadura con estos niveles de carbohidratos es consistente con los resultados de Wachter (1981) para *R. pusillus* en un medio basado en pulpa de plátano.

A 30 y 32 °C, se observaron hifas delgadas y gruesas y numerosas células levaduriformes, lo que indica que *M. rouxii* abunda en el cultivo mixto. En estas preparaciones no fue posible distinguir visualmente la presencia de *R. miehei*, mas se infiere su desarrollo en el cultivo mixto, por detectarse actividad de renina en el sobrenadante. A 35 y 37°C, predominaron las hifas delgadas y apenas se observaron algunas gruesas y muy pocas células en forma de levadura, mientras que a 40°C sólo se observó la forma filamentososa.

Las observaciones anteriores coinciden con los resultados de la Figura 7 en el sentido de que a las dos temperaturas inferiores predominan células de *M. rouxii*, que a 35 y 37 °C se hace más importante la presencia de *R. miehei* y que a 40°C la presencia de *M. rouxii* es muy escasa.

Un aspecto interesante en la evaluación del crecimiento en estos cultivos es la forma macroscópica que presentan. *Rhizomucor miehei* siempre creció en forma de pellets redondos, con superficie lisa o arrugada y tamaños variados. También se observaron algunos pellets

de aspecto erizado. No se observó relación entre el aspecto de la superficie o el tamaño de los pellets y el crecimiento o la producción de actividad de renina. *Mucor rouxii* creció en pellets erizados redondos, cilíndricos y de otras formas menos definidas.

El cultivo mixto presentó diversas formas y éstas se trataron de relacionar con las observaciones al microscopio. A 30°C creció en pellets redondos de superficie erizada y otros de forma erizada no esférica; en ambos tipos se observó la forma microscópica típica de *M. rouxii* (como en la Fig. 12a). A 32°C se presentaron los dos tipos de pellets anteriores, pero sí se observó diferencia en la forma microscópica de ambos: en los pellets redondos se encontraron formas de levadura (como en la Fig. 12d), mientras que en los erizados no redondos sólo se observaron hifas delgadas de 2-6  $\mu$  de diámetro (como en la Fig. 12e). Esto sugiere que en los primeros predominó *M. rouxii* mientras que en los segundos fue *R. miehei*.

A 35°C se presentaron las mismas formas que a 32°C, con igual relación con las observaciones microscópicas, pero además crecieron algunos pellets cilíndricos muy pequeños, que coincidieron en ser más abundantes en los matraces en los que se obtuvo mayor actividad de renina. A 37°C casi todos los pellets fueron de este último tipo y hubo muy pocos redondos. Las características presentadas a 35 y 37°C sugieren que hay relación entre la forma de los pellets y la productividad de renina, con mayor actividad en pellets cilíndricos de tamaño muy pequeño, sin embargo, a 40°C los pellets fueron de mayor tamaño y redondos;

esto confirma que la temperatura es el factor determinante y si la forma y el tamaño de los pellets tienen influencia sobre la actividad de renina del cultivo mixto, es en menor grado. No se puede atribuir una mayor producción de renina en los pellets más pequeños (observados a 37°C) a un mayor acceso a los nutrientes, puesto que en éstos el rendimiento de biomasa fue menor que en los pellets de mayor tamaño obtenidos a 40°C.

#### IV.2.2 Producción de renina.

Los niveles de actividad de renina alcanzados por la cepa empleada en este estudio fueron muy pequeños comparados con los reportados para cepas como la NRRL 3420, pero de suficiente magnitud para ser medidos con precisión y poder observar claras diferencias entre las fermentaciones.

La actividad de renina se determinó como actividad de coagulación de la leche; en la Figura 8 se presentan los resultados para los tres tipos de inóculo a las cinco temperaturas estudiadas. De acuerdo con lo esperado, el filtrado de la fermentación de *M. rouxii* no coaguló la leche en ninguno de los casos (todavía después de una hora y media no hubo formación de coágulos). En los cultivos puros de *R. miehei* la actividad de coagulación de la leche se ubicó entre 8 y 16 unidades Soxhlet; los cambios de temperatura provocaron pequeñas variaciones en la actividad, con valores mayores a 35 y 30 °C (12-16 su) que a 32 y 37 °C (8-12 su).

En el cultivo mixto no se detectó actividad de renina a los 30 y 32 °C, mientras que a 35°C se obtuvo actividad en niveles de aproximadamente la mitad que en el cultivo puro de *R. miehei*. Sin embargo, a 37°C la actividad se elevó a valores mayores de cuatro veces los alcanzados por el cultivo puro; este efecto se presentó con menor proporción a 40°C, siendo el incremento de alrededor del 100%.

El aumento de la actividad experimentado a los 37°C para el cultivo mixto resulta muy importante, pues no sólo confirma la hipótesis de que en la fermentación mixta de *Rhizomucor miehei* y *Mucor rouxii* se puede obtener renina con los niveles de productividad que se alcanzan en cultivos puros de *R. miehei*, sino que presenta el crecimiento mixto como una opción para elevar la productividad de la enzima. Al repetir el experimento a 37°C, se volvió a obtener un aumento de 400%. Es importante verificar si este fenómeno se repite para las cepas empleadas comercialmente, ya que así como el crecimiento y la producción de la enzima presentan variación de una cepa a otra bajo las mismas condiciones ambientales, la respuesta de adaptación al crecimiento mixto con otras especies puede variar considerablemente.

La ausencia de actividad de renina en el cultivo mixto a 30 y 32°C no parece ser causada por una ausencia de crecimiento de *R. miehei*, puesto que a 32°C se observó en el microscopio la presencia de esta cepa en varias preparaciones. No es el objetivo de este estudio el dilucidar los procesos bioquímicos que expliquen los cambios en la capacidad de producción de la renina

por parte de *R. miehei*; con los elementos planteados sólo se pueden hacer algunos comentarios sobre fenómenos que podrían estar ocurriendo.

Esta ausencia de actividad a 30 y 32 °C podría deberse a que en estas condiciones *R. miehei* crece sin acceso a algún nutriente o compuesto que sirva de inductor para la síntesis de renina, ya sea porque *M. rouxii* lo esté asimilando con preferencia (o modificándolo), o bien que esta cepa esté produciendo alguna sustancia que sirva de represor para la síntesis de la enzima por parte de *R. miehei*.

Cuando un microorganismo crece en condiciones adversas, como es el caso de *M. rouxii* en el cultivo mixto a 37 y 40°C, puede presentar cambios en algunas reacciones metabólicas que resulten en alguna sustancia que normalmente no produce, o que deje de producir alguna obtenible en condiciones favorables; esto puede ser causado, por ejemplo, al aumentar la temperatura, por alcanzarse la temperatura óptima para la actividad de una enzima o por ocurrir la desactivación de alguna por desnaturalización. De este modo podría estar ocurriendo que a 30 y 32 °C algún metabolito implicado en el crecimiento de *M. rouxii* reprima la producción de renina por parte de *R. miehei*, mientras que a 37 y 40 °C se promueva un aumento en la producción de renina. Claramente se requeriría de una investigación específica para contar con mayor información que distinga las posibilidades señaladas.

En la Figura 9 se presenta la actividad específica de coagulación de la leche (su / g micelio seco) en función de la temperatura. Para *R. miehei* el comportamiento fue equivalente al de la actividad expresada por volumen de medio. Esto era de esperar, ya que no se observaron variaciones en el rendimiento de biomasa en función de la temperatura. En el cultivo mixto, a 40°C la actividad específica fue el doble de la obtenida con *R. miehei*, igual que como ocurrió con la actividad por volumen de medio, mientras que a 37°C fue más de 5 veces mayor. En términos de la actividad específica, el aumento de actividad de renina en el cultivo mixto a 37°C con respecto al cultivo puro es mayor que cuando se expresa en función del volumen de medio, ya que el rendimiento de biomasa fue menor en el cultivo mixto que en el cultivo puro de *R. miehei*.

#### IV.2.3 Producción de quitosano.

Se determinó el rendimiento de quitosano como mg de quitosano por 100 ml de medio. Como este rendimiento tiene una dependencia directa con el crecimiento, resulta interesante saber si los cambios detectados son debidos exclusivamente a variaciones en el crecimiento o si hay cambios en el contenido de quitosano en las células. Por tanto, se reportan además los valores de mg de quitosano por g de peso seco de las células. Estos resultados se muestran en las Figuras 10 y 11.

El rendimiento de quitosano para *Mucor rouxii* fue menor que para el cultivo puro de *Rhizomucor miehei*, con valores de 17-25

mg/100ml para el primero, entre 30 y 37 °C, y de 23-37 mg/100ml para el segundo en todo el intervalo de temperaturas. Esto es debido a que el crecimiento de *R. miehel* fue casi el doble del obtenido para *M. rouxii*, sin embargo, el contenido de quitosano en el micelio de éste fue siempre mayor que en *R. miehel* (ver Figuras 7 y 11); esto indica que en aquellas condiciones en que *M. rouxii* alcanza el mismo crecimiento que *R. miehel*, la producción de quitosano es mayor.

El contenido de quitosano en las células de *Mucor rouxii* varió entre 19 y 25 mg quitosano por g peso seco. Estos resultados son bajos en relación con los reportados por White y col. (1979) de 40-80 mg por g peso seco. Tal diferencia no está asociada a la cepa, pues en experimentos preliminares empleando el mismo medio de cultivo usado por White y col., se obtuvieron rendimientos de 63-69 mg quitosano por g peso seco (fermentación a 28°C por 4 días). Una posibilidad es que exista algún efecto del medio de cultivo, sin embargo, es probable que el tiempo de fermentación haya influido en esta disminución, puesto que se ha encontrado en *Absidia coerulea* que la extracción del quitosano de la pared celular se hace más difícil a partir de cierto tiempo de fermentación (McGahren y col., 1983). En principio, el quitosano puede unirse a otros componentes de la pared de modo que sea más difícil su solubilización durante el tratamiento de reflujo en solución ácida. Esto necesita ser verificado en las cepas que se usen para la continuación del proyecto.

A 40°C, el rendimiento en el cultivo de *M. rouxii* bajó a 3-10 mg/100ml, como era de esperarse por el bajo crecimiento de las células (ver Figura 10); además, el contenido de quitosano en el micelio también se vio disminuído. Estos resultados indican que el aumento de la temperatura de fermentación a 40°C no sólo provocó una disminución en el crecimiento de *M. rouxii*, sino que además produjo cambios en su composición; puede ser que haya disminuído la síntesis de quitosano en las células, al verse afectada la actividad de la quitina sintetasa y/o la quitina desacetilasa, o bien que se haya promovido la actividad de la quitosanasa.

La menor producción de quitosano por parte de *Mucor rouxii* a 40°C fue el único efecto notable de la temperatura en los cultivos puros. Para *R. miehei*, el contenido de quitosano en las células no varió con la temperatura. Como el crecimiento tampoco se vio afectado, se infiere que el rendimiento de quitosano en la fermentación se mantuvo prácticamente constante.

En el cultivo mixto el rendimiento de quitosano fue similar al de *M. rouxii* por sí solo a 30 y 32 °C. Sin embargo, a 35°C resultó mayor que en los cultivos puros y a 37 y 40 °C no se detectaron diferencias con respecto a *R. miehei* (Figura 10). Estos resultados no sólo están determinados por las variaciones en el crecimiento del cultivo mixto con la temperatura, sino que además ocurrieron cambios en el contenido de quitosano en las células. En la Figura 11 se observa que a los 30, 32 y 37 °C el contenido de quitosano en el cultivo mixto fue similar al de *M. rouxii*; éste se mantuvo mayor a 40°C debido a la disminución en *M. rouxii* ya comentada.

Sin embargo, a 35°C el contenido de quitosano fue considerablemente mayor en el cultivo mixto que en el puro de *M. rouxii*.

El contenido de quitosano en las células de *R. michei* fue alrededor de un 70% el obtenido en las células de *M. rouxii*, entre 32 y 37°C. Por lo tanto, se esperaba que los valores para los cultivos mixtos fueran menores que los de *M. rouxii* y que se tendieran a los de *R. michei* a medida que aumentara la temperatura (al aumentar la temperatura se observó un aumento en la proporción de *R. michei* en el cultivo mixto). Sin embargo, los resultados no siguieron este comportamiento y superaron lo esperado en cuanto a la producción de quitosano en el cultivo mixto. Esto puede ser debido a que en el cultivo mixto se incremente la síntesis de quitina + quitosano o que se aumente la proporción de quitosano sobre quitina mediante la promoción de la actividad de las enzimas quitina sintetasa y quitina desacetilasa. Otra posibilidad es que no haya ocurrido un aumento en la síntesis de estos compuestos, sino que el entrecruzamiento del quitosano con componentes de la pared planteado anteriormente se presente en los cultivos puros y en menor medida en el cultivo mixto, especialmente a 35°C, facilitándose así su extracción durante el proceso de análisis.

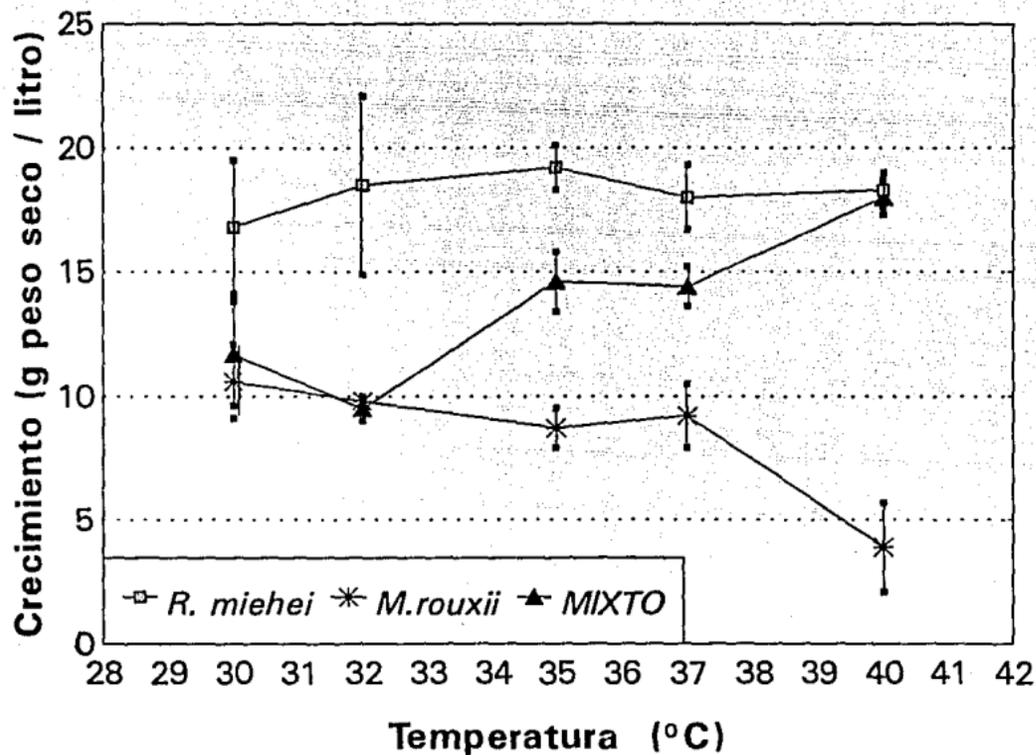


FIGURA 7. CRECIMIENTO

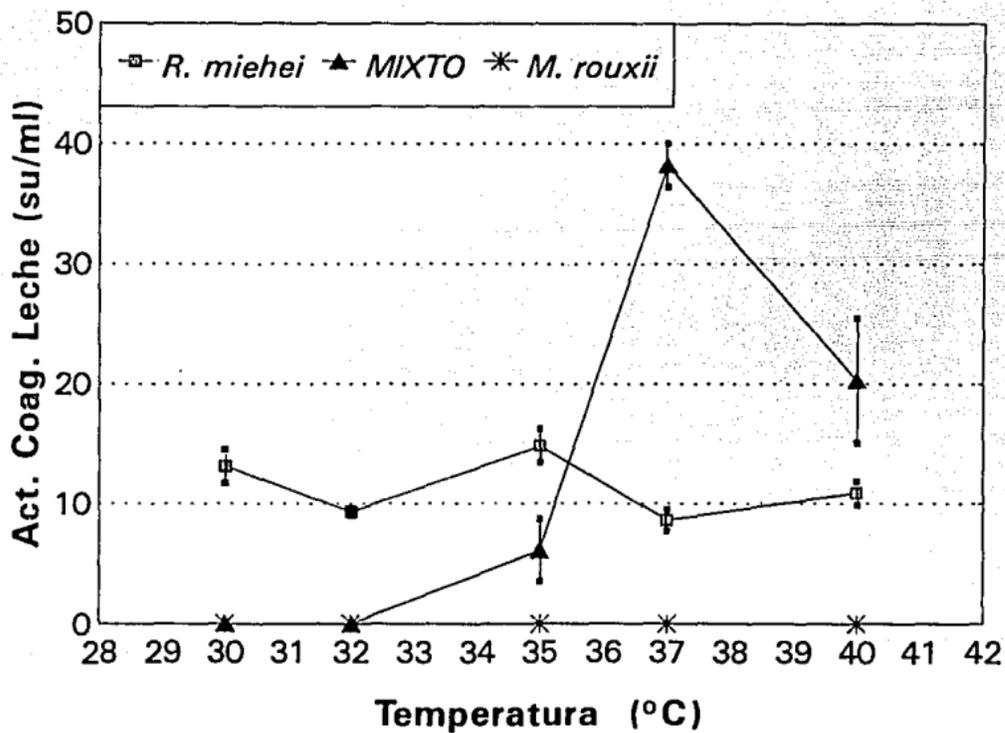


FIGURA 8. ACTIVIDAD DE COAGULACION DE LA LECHE

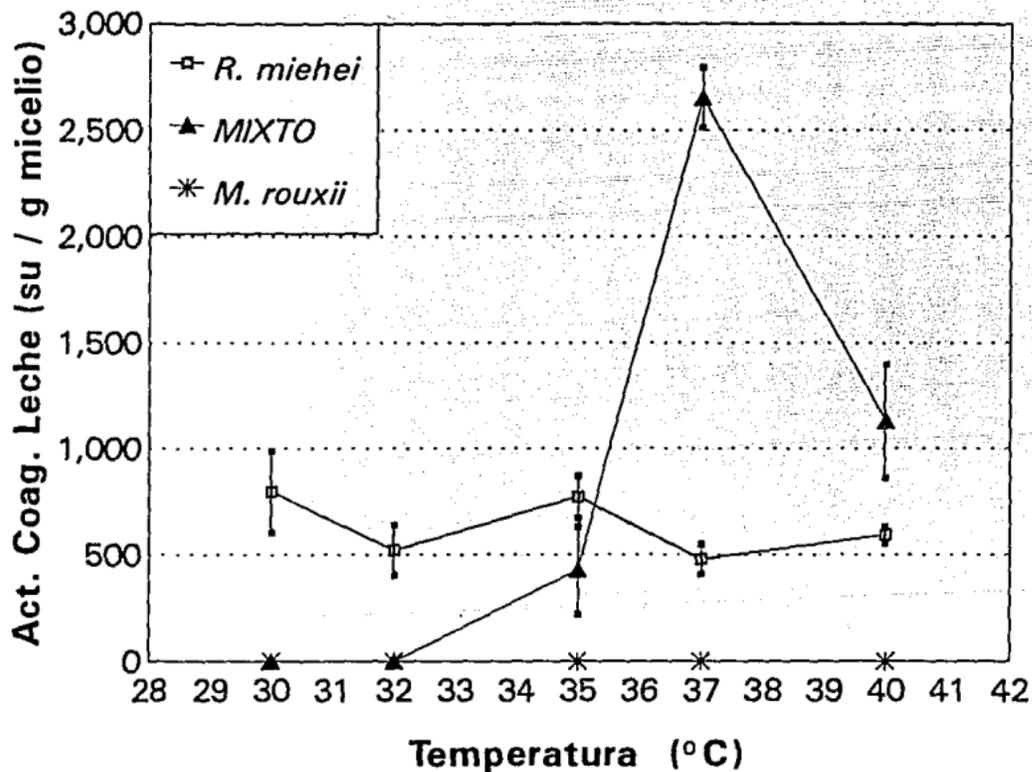


FIGURA 9. ACTIVIDAD ESPECIFICA DE COAG. LECHE

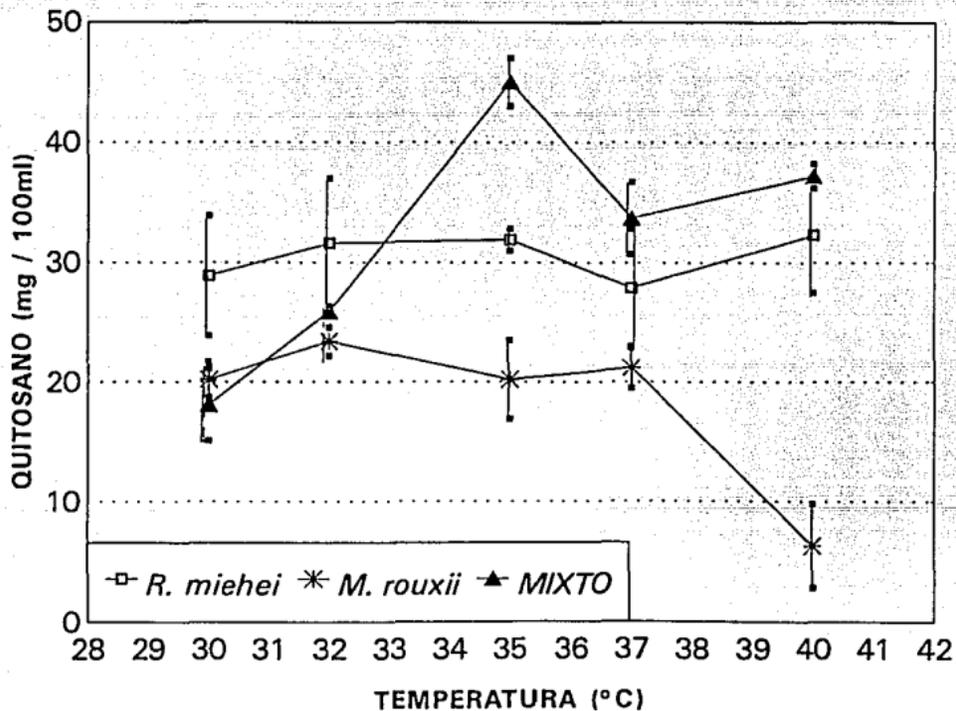


FIGURA 10. PRODUCCION DE QUITOSANO

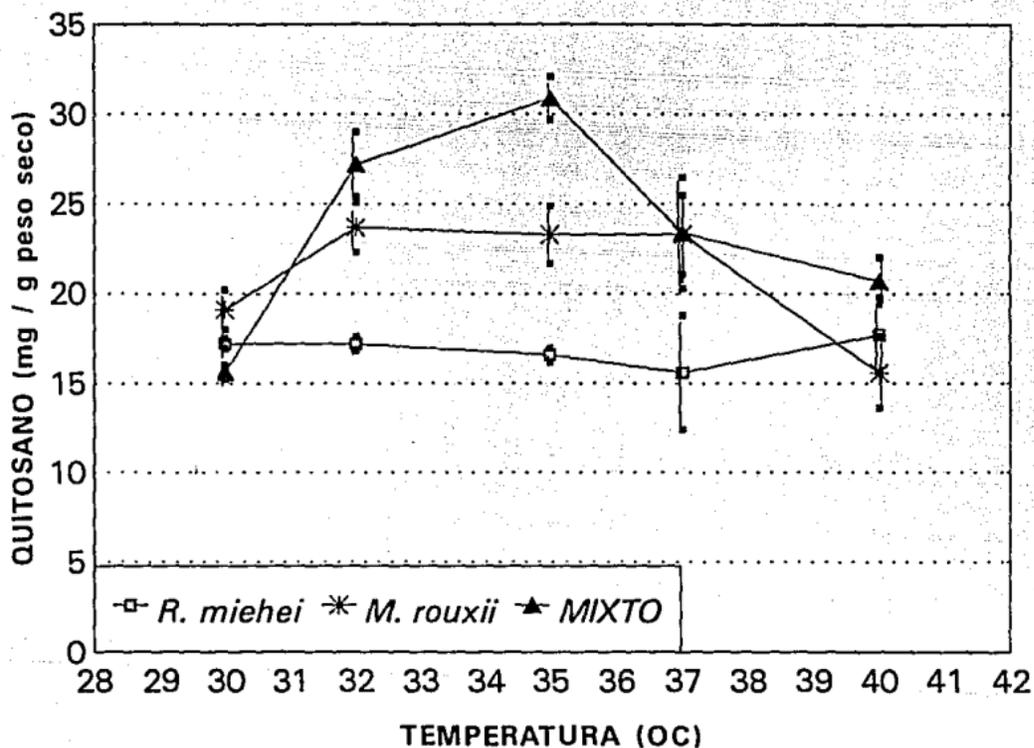


FIGURA 11. CONTENIDO DE QUITOSANO EN LAS CELULAS



FIGURA 12. OBSERVACIONES MICROSCOPICAS

- a) Cultivo puro de *M. rouxii* a 30°C
- b) Cultivo puro de *R. miehei* a 40°C
- c) Cultivo mixto a 30°C
- d) Cultivo mixto a 32°C
- e) Cultivo mixto a 37°C

Fotos: Dr. Miguel Ulloa

## V. CONCLUSIONES

- El crecimiento del cultivo mixto de *Rhizomucor miehei* y *Mucor rouxii* se ve afectado por la temperatura, de modo que entre 30 y 32 °C se obtienen rendimientos equivalentes a los de un cultivo puro de *M. rouxii*, y a medida que aumenta la temperatura se acerca más a los rendimientos que se logran con *R. miehei*, hasta hacerse iguales a los 40°C. Esto parece estar asociado a la proporción relativa con que crecen las dos especies.
- La presencia de *Mucor rouxii* en el inóculo afecta la producción de renina por parte de *R. miehei*. A 30 y 32 °C no hay producción de renina en el cultivo mixto; a 35°C hay una producción de alrededor del 50% de la obtenida en el cultivo puro de *R. miehei*, y a 37°C se alcanza una productividad más de cuatro veces superior a la del cultivo puro. A 40°C el aumento es del 100%. Por tanto, en el cultivo mixto no sólo se puede obtener renina en los mismos niveles que en el cultivo puro de *R. miehei*, sino que además se puede elevar considerablemente su productividad.
- El rendimiento de quitosano en el cultivo mixto no se ve disminuído con respecto al cultivo puro de *M. rouxii*, sea en términos de productividad o de contenido en las células. Esto significa que se puede obtener quitosano al menos con los mismos rendimientos que con *M. rouxii* solo, a la vez que se aumenta el rendimiento de la renina producida por *R. miehei*.

- De las dos conclusiones anteriores, se infiere que el desarrollo de una fermentación mixta de las especies *Rhizomucor miehei* y *Mucor rouxii* podría llegar a ser una opción rentable en la producción conjunta de renina y quitosano. Por tanto, se deben seguir estudiando los factores que afectan este proceso con la finalidad de llegar a hacerlo técnica y económicamente aplicable.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estos experimentos con cepas registradas de alta productividad en renina y quitosano, como *Rhizomucor miehei* NRRL 3420 o NRRL 3159 y *Mucor rouxii* IM-80 (ATCC 24905). Incorporar al estudio algunas especies del género *Absidia* que pudieran tener mayor contenido de quitosano que *M. rouxii*.
- Estudiar cinética de crecimiento y de producción de renina y quitosano para escoger el tiempo de fermentación que presenta máximos rendimientos.
- Continuar el estudio de los efectos de factores ambientales como medio de cultivo (a nivel de matraces agitados), pH y aereación (a nivel de fermentador).
- Realizar estudios bioquímicos con el objetivo de explicar los aumentos en la producción de renina y de quitosano en los cultivos mixtos descritos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Agerkvist, I., Eriksson, L., y Enfors, S. 1990. Selective flocculation with chitosan in *Escherichia coli* disintegrates: effects of pH and nuclease treatment. *Enzyme Microb. Technol.* 12:584.
- Arcidiacono, S., Lombardi, S. y Kaplan, D. 1989. Fermentation, processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *M. rouxii*. En Skjåk-Bræk et al. ( 1989 ). p.p. 319-332.
- Arima, K., Yu, J. y Iwasaki, S. 1970. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lind*. En "Methods in Enzymology", vol. XIX, Ed. Perlmann, G. y Lorand, L.. Academic Press, N.Y. p.p. 446-460
- Aunstrup, K. 1976. Preparation of a milk-coagulating enzyme. U.S. Patent 3,988,207. E.E.U.U.
- Bartnicki-García, S. 1989. The biochemical cytology of chitin and chitosan synthesis in fungi. En Skjåk-Bræk et al. ( 1989 ). p.p. 23-35
- Berkeley, R. 1979. Chitin, chitosan and their degradative enzymes. En "Microbial Polysaccharides and Polysaccharases", Ed. R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday y D. C. Ellwood. Academic Press, Londres. p.p. 205-236
- Beschreibung, E., Gattungen, A. y Dieser, A. 1969. Mucorales. Verlag Von J. Cramer, Lehre, Alemania. p.6.
- Bough, W.A. 1975. Reduction of suspended solids in vegetable canning waste effluents by coagulation of chitosan. *J. Food Sci.* 40:297.

- Bough y Landes (1978). Citado en "Use of chitinous polymers in food. D. Knorr. Food Technol. 38(1):85
- Braun, J., Le Chanu, P., y Le Goffic, F. 1989. The Immobilization of penicillin G acylase on chitosan. Biotechnol. Bioeng., 33:242.
- Cano-Canchola, C., Escamilla, E. y Ruiz-Herrera, J. 1988. Environmental control of the respiratory system in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 134:2993.
- Cooney, D. y Emerson, R. 1964. Thermophilic fungi. Freeman and Co., San Francisco, E.E.U.U. p.p. 17-27.
- Charles, R., Gertzmann, D. y Melachouris, N. 1970. Milk coagulating enzyme and itfahren zu seiner Herstellung. Resumen en Food Sci. Technol. Abs. 71(7):1182.
- Davis, L. y Bartnicks-García, S. 1984. The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 130:2095.
- Domsch, K., Gams, W. y Anderson, T. 1980. Compendium of soil fungi, vol. 1. Academic Press, N. Y. p.p. 461-462; 700-702.
- FDA 1983. Resumen en Chemical Abstracts 99:211272x.
- Feldman, L. 1981. Microbial rennin. U.S. Patent 30,669. E.E.U.U.
- Flores-Carreón, A., Larriba, C. y Sentandreu, R. Stabilization of chitin synthase of *M. rouxii* and detection of two zlmogenic pools. Microbiol. Lett. 8:151.
- Gilman, J. 1957. A manual of soil fungi. The Iowa State University Press, Iowa, E.E.U.U. p.33.
- Gutiérrez, C. 1990. Tesis. En Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.
- Hang, Y. D. 1990. Chitosan production from *Rhizopus oryzae*.

- micelia. *Biotechnol. Lett.* 12(12):911.
- Imeri, A. G., y Knorr, D. 1988. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J. Food Sci.* 53:1707.
- Johnson, A. 1971. Improved method of hexosamine determination. *Analytical Biochem.* 44:628.
- Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47:593.
- Knorr, D. 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 48:36.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* 38(1):85.
- Knorr, D., Beaumont, M., Caster, C., Dörnenburg, H., Gross, B., Pandya, Y. y Romagnoli, L. 1990. Plant tissue culture for the production of naturally derived food ingredients. *Food Technol.* 44(6):71.
- Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.* 45(1):114.
- Krajewska, B., Leszko, M., y Zaborska, W. 1990. Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 48:337.
- Lasure, L. 1976. Some effects of temperature on zigosporangium formation in *Mucor miehei*. *Mycologia* 68(6):1145.
- Lasure, L. 1980. Regulation of extracellular acid protease in *Mucor miehei*. *Mycologia* 72:483.
- Lemoyne, R., Gertzman, D. y Melachouris, N. 1970. Milk-clotting enzyme product and process therefor. U.S. Patent 3,549,390. E.E.U.

- Löffler, A. 1986. Proteolytic enzymes: sources and applications. Food Technol. 40(1):63.
- Mashaly, R., Ramadan, B., Tahoun, M., El-Soda, M. e Ismail, A. 1983. Factors affecting the production of a milk clotting protease from *Mucor miehei*. Resumen en Food Sci. Technol. Abs. 84(11):2326.
- McGahren, W., Perkinson, G., Growich, J., Leese, R. y Ellestad, G. 1983. Chitosan by fermentation. Process Biochem. 18:88.
- Onions, A., Allsopp, D. y Eggins, H. 1981. Smith's introduction to industrial mycology, 7ma. ed. Arnold, Londres. p.p. 28-36.
- Popper, L. y Knorr, D. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. Food Technol. 44(7):84.
- Sandford, P. 1989. Chitosan: commercial uses and potencial applications. En Skjåk-Bræk et al. ( 1989 ). p.p. 51-69.
- Sardinas, J. 1976. Calf rennet substitutes. Process Biochem. 11:10
- Shimara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K. y Sannan, Y. 1989. Screening of Mucoraceae strains suitable for chitosan production. En Skjåk-Bræk et al. ( 1989 ). p.p. 171-179.
- Skjåk-Bræk, G., Anthonsen, T. y Sandford, P. 1989. "Chitin and Chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications". Elsevier, Londres.
- Soto Peralta, N. V., Müller, H., y Knorr, D. 1989. Effects of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. J. Food Sci. 54:495.
- Sternberg, M. 1972. Bond specificity, active site and milk clotting mechanism or the *Mucor miehei* protease. Biochem. Biophys. Acta 285:383.

- Thakur, M., Karanth, N. y Nand, K. 1990. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:409.
- Wacher, M. 1981. Estudio de la utilización de hongos termofílicos en el enriquecimiento proteico de desperdicios de pulpa de plátano. Tesis, Fac. Química, UNAM.
- Webb, B., Johnson, A. y Alford, J. 1974. Fundamentals of dairy chemistry. 2da.ed. AVI, Connecticut, E.E.U.U.
- White, S., Farina, P. y Fulton, I. 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. Appl. Environ. Microbiol. 38(2):323.
- Zelko, J. 1989. Genecor files on rDNA cheese enzyme. Resumen en Biotechnology News 9(28):1.