

# DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE GLUCOSAMINA EN BIOMASA FÚNGICA

M.A. Silicaro<sup>(1)</sup>, C.M. Marras<sup>(1)</sup>, A. Bezazian<sup>(1,2)</sup>, M.P. Núñez<sup>(1)</sup>, M.E. Martínez<sup>(3)</sup>, M.B. Ríos<sup>(1)</sup>, R.F. Itria<sup>(1,2,4)</sup>

rfitria@inti.gov.ar

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Micología Experimental - InMiBo (UBA-CONICET),

<sup>(2)</sup>Cátedra de Biología de Hongos - FCEN-UB,

<sup>(3)</sup>Dto. Ingredientes Activos y Biorrefinería-SOLyS-GODTeI-INTI

<sup>(4)</sup>GODTeI-INTI

**Palabras Clave:** Glucosamina, quitina, hongos, determinación de biomasa.

## INTRODUCCIÓN

Un importante componente de las paredes celulares de la mayoría de los hongos es la quitina, un polímero lineal constituido por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -D (1,4), como se observa en la figura 1.

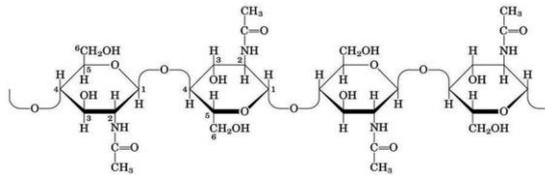


Figura 1: estructura de una quitina fúngica [1].

Este polisacárido está también presente en los exoesqueletos de insectos y otros artrópodos [2] y resulta de suma importancia ya que puede ser utilizada como insumo para la producción industrial de quitosano.

La determinación de glucosamina por hidrólisis de quitina constituye una herramienta necesaria para la estimación directa de la masa del polímero, como también una indirecta de biomasa fúngica tanto en el ambiente como en procedimientos de laboratorio o industrial [3, 4].

Poca de la bibliografía encontrada utiliza la quitina como parámetro para medir la biomasa de hongos de pudrición blanca. Dentro de los trabajos hallados, los protocolos que se llevan a cabo para la determinación de quitina son engorrosos [5].

Es necesaria la búsqueda de protocolos más sencillos que permitan la detección de la quitina. Este trabajo plantea una modificación al protocolo que presenta Plassard [5] en la cual

se utilizó la técnica analítica de espectroscopía UV-vis.

## OBJETIVOS

Realizar comparaciones del contenido de quitina en las diferentes especies de hongos.

Llevar a cabo un método sencillo y reproducible para determinar el contenido de glucosamina presente en las distintas especies.

## DESARROLLO

**Obtención de biomasa fúngica:** se partió de cultivos en medio líquido (extracto de malta glucosada y medio Czapek) tanto en condiciones estáticas como en agitación. El micelio fue separado del medio de cultivo por filtración con vacío y lavando con etanol, para deshidratar y disgregar el micelio. Se completó el secado en estufa a 80 °C, hasta peso constante.

Con el micelio seco de diferentes especies fúngicas se realizaron los siguientes pasos:

**Hidrólisis:** las muestras secas se sometieron a una digestión, en tubos de borosilicato con tapas y contratapa de teflón, con 5 mL HCl 6N a 100 °C en termobloque (HACH modelo DRB 200) durante 4 horas. A continuación, se tomaron alícuotas de 1,5 mL en tubos tipo Eppendorf y se centrifugaron por 10 minutos a 14.000 rpm. Luego, 0,5 mL del sobrenadante se colocaron en tubo de hemólisis para el siguiente paso.

**Alcalinización:** al tubo del paso anterior se le adicionaron 1,5 mL de NaOH 3N junto a 1,5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2N, verificando que el pH final sea aproximadamente 8, vortexeando cada muestra.

Reacción: de la solución obtenida en el paso anterior se la trasvasaron alícuotas de 0,5 mL a tubos de borosilicato descriptos anteriormente junto a 0,5 mL del reactivo A (1 mL de acetilacetona y 50 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25M). Se calentaron las muestras durante 20 minutos a 100 °C. Luego de enfriarlos, se agregaron 3 mL de etanol 96°, vortexeando. Luego se agregaron 0,5 mL del reactivo B (2,67 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 100 mL de una solución 1:1 de HCl y etanol 96°). A continuación, se calentaron las muestras durante 10 minutos a 70 °C. Una vez enfriados a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a λ= 530 nm (Shimadzu modelo UV mini-1240). Con las absorbancias obtenidas se interpolaron los datos de la curva de calibración correspondiente del patrón de glucosamina (R<sup>2</sup>= 0,9851).

Este mismo protocolo se puede aplicar a hongos cultivados en medios sólidos, como por ejemplo aserrín o viruta, usando 3 mL de ácido clorhídrico 6N, en lugar de 5 mL en el paso 1.

**RESULTADOS**

Las diferencias en el contenido de glucosamina (derivada de la quitina de la pared fúngica) es más evidente entre distintas cepas que entre diferentes grupos taxonómicos (ej: basidiomicetes y ascomicetes), como se observa en la figura 2:

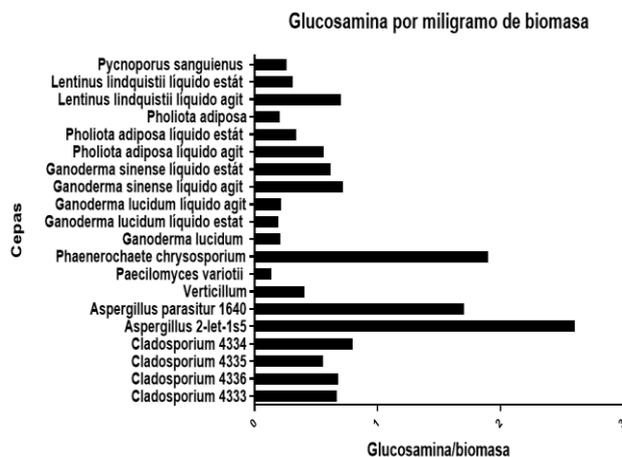


Figura 2: histograma por especie hongo del contenido de glucosamina por miligramo de biomasa fúngica.

No se ven diferencias entre Ascomycetes (géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Paecilomyces*) y Basidiomycetes (*Phaenerochaete*, *Pholiota*, *Pycnoporus*, *Ganoderma*, *Lentinus*). Se puede observar que los hongos con mayor concentración de glucosamina/mg de biomasa son los del género

*Aspergillus* (Ascomycota) y *Phaenerochaete chrysosporium* (Basidiomycota). Por otra parte, para las distintas cepas del género *Cladosporium* se observan concentraciones similares de glucosamina.

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Se logró determinar de manera satisfactoria el contenido de glucosamina de las especies analizadas, de una forma eficiente y rápida. La metodología optimizada tiene potencial para diversas aplicaciones. En lo particular, con este método se pretende estimar el contenido de biomasa fúngica en diversos soportes y sustratos sólidos para tres aplicaciones tecnológicas desarrolladas en nuestro grupo: por un lado, la caracterización de micofiltros para la adsorción de metales pesados y metaloides, como el As presente en aguas contaminadas. Por otro, la caracterización de soportes colonizados con hongos para procesos de micorremediación de efluentes y por otra parte, el desarrollo y caracterización de biomateriales fúngicos.

El protocolo se pudo aplicar a una gran cantidad de muestras, pudiendo analizarlas en poco tiempo.

Índice TRL: 4.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Miguel Galvagno (InMiBo UBA-CONICET) por sus aportes tecnológicos que permitieron desarrollar esta metodología. Este trabajo es parte de los trabajos de investigación de Marras, Silicaro y Bezazian.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

[1] Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Revista Tecnocientífica URU, 1, 53-58.  
 [2] Michael J. C, Sarah C. W., Graham W. G., The Fungi segunda edición, Editorial: Academic Press (2001) p: 99, 100.  
 [3] Wallander, H., Ekblad, A., Godbold, D. L., Johnson, D., Bahr, A., Baldrian, P., ... & Rudawska, M. (2013). Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils—A review. Soil Biology and Biochemistry, 57, 1034-1047.  
 [4] Ekblad, A. L. F., Wallander, H., & Näsholm, T. (1998). Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. The New Phytologist, 138(1), 143-149.  
 [5] Plassard, C. S., Mousain, D. G., & Salsac, L. E. (1982). Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. Phytochemistry, 21(2), 345-348.