



*Preparación de quitina fúngica a partir de subproductos de hongos comestibles
(Agaricus bisporus)*

*Preparation of fungal chitin from by-products of edible mushrooms (Agaricus
bisporus)*

*Preparação de chitin fúngico a partir de subprodutos fungos comestíveis
(Agaricus bisporus)*

Anabell Del Rocío Urbina-Salazar ^I

gata-any@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-5219-2698>

Alberto Renato Inca-Torres ^{II}

creny_11@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-0890-2896>

María del Pilar Carbonero-Aguilar ^{III}

pcarboneroag@us.es

<https://orcid.org/0000-0002-2757-4616>

Juan Bautista-Palomas ^{IV}

jdbaut@us.es

<https://orcid.org/0000-0001-9567-5390>

Correspondencia: gata-any@hotmail.com

Ciencias técnicas y aplicadas

Artículo de investigación

***Recibido:** 25 de enero de 2020 ***Aceptado:** 31 de marzo de 2020 * **Publicado:** 26 de abril de 2020

- I. Magíster en Gerencia de Servicios de Salud, Máster Universitario en Genética Molecular y Biotecnología, Bioquímica Farmacéutica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012-Sevilla, España, Docente de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Magíster en Gerencia de Servicios de Salud, Máster Universitario en Genética Molecular y Biotecnología, Bioquímico Farmacéutico, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012-Sevilla, España, Docente de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Ph. D, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012-Sevilla, España.
- IV. Ph.D, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 2, 41012-Sevilla, España.

Resumen

El extracto de quitina-oligosacáridos para su uso como posible inductor requiere abundantes materiales ricos en quitina, fácilmente disponibles y baratos. Para este propósito, la producción de fracciones enriquecidas de quitina, a partir de subproductos de la industria de procesamiento de hongos comestibles es de gran interés si se desarrollaran procedimientos apropiados. Los métodos tradicionales para la preparación comercial de quitina implican un tratamiento alternativo con ácido clorhídrico y álcali, seguido de una etapa de blanqueo con reactivos químicos para obtener un producto incoloro. Estos procesos son altamente contaminantes. Por lo tanto, los métodos con procesos amigables con el medio ambiente son de gran interés. En este trabajo informamos los resultados preliminares obtenidos con un procedimiento enzimático, amigable con el medio ambiente, basado en el uso de proteasas y glucanasas que conducen a la fracción de quitina fúngica con una concentración de quitina $> 80 \pm 2\%$, tras un proceso de desacetilación se obtiene quitosano, los cuales son compuestos de interés industrial utilizados para la liberación de fármacos, apósitos para heridas o biopelículas, entre otros y debido a que la quitina es un polímero natural es biocompatible y biodegradable en el cuerpo, y puede ser utilizada para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

Palabras clave: Subproducto de champiñón; fracción de Quitina; *Agaricus bisporus*; Quitina; hidrólisis enzimática.

Abstract

The use of chitin-oligosaccharides for use as potential elicitors requires abundant chitin rich materials, readily available and cheap. For this purpose, the production of enriched chitin fractions from by-products of the edible mushroom processing industry are of great interest if appropriated procedures were developed. Traditional methods for the commercial preparation of chitin involve alternate hydrochloric acid and alkali treatment, followed by a bleaching stage with chemical reagents to obtain a colorless product. These processes are highly contaminant. Therefore, methods with environmentally friendly processes are of high interest. In this work we report on preliminary results obtained with an enzymatic procedure, environmental friendly, based on the use on proteases and glucanases that lead to fungal chitin fraction with a chitin concentration $> 80 \pm 2\%$. After a deacetylation process, chitosan is obtained, which are

compounds of industrial interest used for the release of drugs, deposits for wounds or biofilms, among others and because chitin is a natural polymer is biocompatible and biodegradable in the body, and can be used for biomedical and pharmaceutical applications.

Keywords: Mushroom byproduct, Chitin fraction; *Agaricus bisporus*; Chitin; Enzymatic hydrolysis.

Resumo

O extrato de chitin-oligosacáridos para uso como um possível indutor requer materiais abundantes, facilmente disponíveis e baratos. Para o efeito, a produção de frações enriquecidas de chitin, provenientes de subprodutos da indústria de transformação de fungos comestíveis, é de grande interesse se forem desenvolvidos procedimentos adequados. Os métodos tradicionais de preparação comercial da chitin envolvem um tratamento alternativo com ácido clorídrico e alcalino, seguido de uma fase de branqueamento com reagentes químicos para obter um produto incolor. Estes processos são altamente poluentes. Por conseguinte, os métodos com processos respeitadores do ambiente são de grande interesse. Neste trabalho reportamos os resultados preliminares obtidos com um procedimento enzimático, amigo do ambiente, com base na utilização de proteases e glucanases que conduzem à fração de chitin fúngico com uma concentração de chitin > 80 x 2%, após um processo de deacetilação é obtido chitosan, que são compostos de interesse industrial usados para a libertação de drogas, pensos ou biofilmes, entre outros e porque a chitina é um polímero natural é biocompatível e biodegradável no corpo, e pode ser usado para aplicações biomédicas e farmacêuticas.

Palavras-chave: Subproduto de cogumelos; fração de Quitin; *Bisporus de Agaricus*; Chitin; hidrólise enzimática.

Introducción

La quitina es un componente estructural de la pared de los hongos del exoesqueleto e intestino de los insectos y el caparazón de los crustáceos (Langner, Göhre, 2016); (Merzendorfer, 2003), (Fortuna-González, M. (2010), es un polímero lineal de β - (1 \rightarrow 4) -N-acetil-D-glucosamina, identificado por primera vez en 1884, es uno de los polímeros orgánicos más abundantes en la naturaleza. La quitina puede aparecer de tres formas distintas, que difieren en la orientación de

las cadenas polisacáridicas en las microfibrillas, distinguiéndose los siguientes tipos: α -, β - y γ -quitina (Atkinson, Siegel, Pakhomov, Jessopp, Loeb, 2009).

La quitina juega un papel muy importante en el esqueleto de ciertos organismos como crustáceos, moluscos, insectos, y hongos, pudiendo llegar a constituir hasta el 75% del peso de estos organismos en el caso de los crustáceos y del 30% en el caso de los hongos. A pesar de que la mayor fuente de quitina a nivel mundial son las cutículas de zooplancton (379 millones de toneladas) (Atkinson, Siegel, Pakhomov, Jessopp, Loeb, 2009- Jeuniaux C, Voss-Foucart M.F. 1991), la pesca de estos pequeños organismos no es comercialmente viable.

Los desechos de la industria de mariscos (camarones, cangrejos y las cáscaras de langosta) con un contenido de quitina de 8 a 40%, son la principal fuente de quitina industrial (Kurita, 2006.) (Gopalan Nair, & Dufresne, (2003), sin embargo se está experimentando con una fuente alternativa de quitina como son los hongos, que a pesar de tener un contenido de quitina más bajo que los crustáceos (10–26% complejo de quitina- β -glucano), presenta un interés académico y comercial cada vez mayor (Jones, Weiland, Kujundzic, Theiner, Kahlig, Kontturi, et al., 2019); (Di Mario, Rapana, Tomati, Galli, (2008), esto debido a que la quitina fúngica no está limitada por la variación estacional y regional y no requiere el tratamiento ácido agresivo que la quitina de los crustáceos requiere para la purificación y la desmineralización. (Di Mario, Rapana, Tomati, Galli, (2008); (Hassainia, Satha, Boufi, (2018). Además, presenta una estructura rígida de quitina con β -glucano ramificado más flexible, produciendo una arquitectura nativa de nano-compuestos que puede proporcionar redes de fibra fuertes y resistentes cuando se extrae (Di Mario, Rapana, Tomati, Galli, (2008); (Nawawi, Lee, Kontturi, Murphy, Bismarck, (2019).

La producción anual de quitina fúngica en todo el mundo se ha estimado en 106 toneladas (peso seco) y la recuperación de quitina de los subproductos de la industria conservera de hongos es una fuente interesante para la preparación de quitina fúngica, además de ser una fuente adicional de ingresos (Abdul Manan, & Webb, (2017). La demanda de hongos comestibles ha incrementado drásticamente en los últimos años debido al desarrollo de nuevos métodos de cultivo mecanizados y al incremento en la aceptación de este tipo de productos por parte de los consumidores, ya que cada vez se conocen más las propiedades nutricionales y saludables de éste alimento (Atila, Owaid, Shariati, (2017); (Muszyńska, Kała, Rojowski, Grzywacz, Opoka, (2017).

Según los datos obtenidos de la FAO la producción en el año 2016 fue de aproximadamente 10.790.859 Tm. (FAO, 2018). Esta gran producción de hongos comestibles genera 3 tipos diferentes de subproductos o material de desecho: 1) compost agotado, 2) residuos de hongos (tallos y champiñones no comercializables) y 3) el líquido de escaldado, representando un desafío medioambiental para las Industrias del ramo, ya que su eliminación no adecuada puede generar graves problemas medioambientales. (Buruleanu, Radulescu, Georgescu, Danet, 2018). Estos tallos y champiñones no comercializables representan entre el 25 y 30% de la cosecha de champiñones. Por lo que representa un subproducto de gran importancia tanto por su volumen como por su composición: 50 - 60% peso seco de hidratos de carbono, 20 -30% peso seco de proteínas.

La mayor parte de estos residuos o subproductos actualmente no se utilizan y en algunos casos son infrutilizados, utilizándolos como alimento animal o como abono, fundamentalmente los tallos y champiñones no comercializables. Sin embargo, teniendo en cuenta su composición podrían constituir fuentes de partida para la obtención de ciertos productos de alto valor añadido y de aplicación industrial. En relación con los subproductos ricos en quitina procedentes de la industria agroalimentaria, a pesar de la gran cantidad de residuo/desecho que se generan anualmente, hasta hoy en día no se están desarrollando métodos o procedimientos adecuados encaminados a su utilización y valorización como fuente de compuestos de interés industrial y de alto valor añadido. Estos residuos, debido a su composición, al ser procesados podrían generar compuestos de gran interés, tales como: quitosano, quitoooligosacáridos y glucosamina, que pueden tener diversas aplicaciones industriales. (Buruleanu, Radulescu, Georgescu, Danet, 2018). Para este fin, la producción de fracciones de quitina enriquecida a partir de subproductos de la industria de transformación de champiñones es de gran interés si se desarrollan procedimientos apropiados. En este trabajo se describen dos procesos, ambientalmente amigables, basados en un procedimiento enzimático para la preparación de quitina fúngica, utilizando como material de partida los subproductos de la industria del Champiñón (tallos y champiñones no comercializables) que pueden ser utilizados para: i) como fuente de carbono para procesos biotecnológicos de producción de quitinasas (Urbina-Salazar, Inca-Torres, Falcón-García, Carbonero-Aguilar, Rodríguez-Morgado, del Campo, et al. (2019), y ii) como sustrato para la producción enzimática de quitinasas-oligosacáridos (elicitores), con aplicaciones prometedoras

en la industria farmacéutica (obtención de compuestos de interés), industria agronómica (para el control biológico de plagas y otras enfermedades de las plantas).

La quitina y su derivado quitosano tienen propiedades únicas que permiten su uso en una amplia gama de aplicaciones en diferentes áreas (biotecnología, medicina, farmacia, agricultura, etc.) (Urbina-Salazar, Inca-Torres, Falcón-García, Carbonero-Aguilar, Rodríguez-Morgado, del Campo, et al. (2019); (Ozuna, C., Álvarez-Arenas, T., Riera, E., Cárcel, J., García-Pérez, J. (2014^a). Entre ellos, la quitina de hongos es de especial interés debido a su abundancia, dependencia no estacional y características estructurales. (Brunner, Ehrlich, Schupp, Hedrich, Hunoldt, Kammer, et al. (2009).

Materiales y Métodos

Materia Prima

Se utilizaron subproductos de la industria de Hongos comestibles (tallos y champiñones no comercializables) de (*Agaricus bisporus*) suministrados por el Grupo Riberebro (Haro, La Rioja). Se consideran como residuos a los tallos y champiñones defectuosos que no pueden ser comercializados, generados durante la preparación del champiñón para el consumo en fresco y el destinado a conservas.

Estabilización de la Materia Prima

Teniendo en cuenta el alto contenido de agua y la abundancia de nutrientes, de este subproducto (residuo), fue necesario un tratamiento previo, con el fin de estabilizarlos y evitar su deterioro.

Secado y molienda

Una vez obtenido los residuos del champiñón (tallos y champiñones defectuosos o no comercializables), se lavaron con abundante agua fría, para eliminar restos de compost y tierra. A continuación, se secaron en una estufa con ventilación forzada a 50°C y se molieron en un molino de fresado equipado con una malla de 0,5 mm (Fresado: Retsch SM 100), y luego tamizado en un tamiz de 355 µm para obtener un polvo más fino. Al producto resultante se le denominó harina de tallos de champiñón (HTCH).

Preparación de la Quitina

El procesamiento de la HTCH se llevó a cabo mediante dos vías. La vía A es un proceso basado en un tratamiento térmico previo seguido de un tratamiento enzimático, y la vía B es un proceso

basado en un tratamiento enzimático como primer paso o etapa seguido de un tratamiento térmico. Ambos procesos se han estudiado en la valorización de la HTCH.

Tratamiento Térmico

El tratamiento térmico se llevó a cabo tras la resuspensión en agua de la HTCH al 10% p/v, y autoclavado a 121°C durante 30 min con el fin de conseguir extraer los compuestos presentes en el sustrato.

Tratamiento Enzimático

La desproteínización se realizó mediante un tratamiento enzimático utilizando una proteasa. La HTCH fue resuspendida en agua al 10% (p/v), se ajustó el pH a 8,5 y se procedió a su hidrólisis con la proteasa Alcalasa® utilizando una relación E/S de 0,3 (p/v), siguiendo el procedimiento del pH-stat (Inca-Torres, Urbina-Salazar, Falcón-García, Carbonero-Aguilar, Rodríguez-Morgado, Parrado, et al. (2018). El hidrolizado obtenido se centrifugó a 10.000×g, a 4°C durante 15 min, obteniéndose por una parte un sobrenadante (material soluble o hidrolizado) y un precipitado (material insoluble, o fracción bruta enriquecida en quitina y glucanos). Seguidamente, el precipitado se lavó tres veces con 10 L de agua corriente, se resuspendió en 1 L de agua, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min, una vez enfriado a temperatura ambiente se centrifugó durante 15 min a 10.000×g, desechándose el sobrenadante y nos quedamos con el precipitado, que una vez secado en la estufa de aire y tamizado, se utilizó como Fracción enriquecida en quitina y glucanos (F-Q/G).

Las proteasas fueron obtenidas de manera biotecnológica utilizando como materia prima lodos de depuradora crecidos con B.licheniformes. (Inca-Torres, Urbina-Salazar, Falcón-García, Carbonero-Aguilar, Rodríguez-Morgado, Parrado, et al. (2018). Los glucanos fueron eliminados por digestión enzimática con una mezcla de α -, β -glucanasas a pH 8,5 y 55 °C con baja agitación (100 rpm) usando una relación E / S de 0,02 durante 10 horas.

Desacetilación

La quitina obtenida se sometió al proceso de desacetilación, se mezcló en una relación 1:4 con NaOH 50% p/v a temperaturas de 60°C y 100°C por 2 h. El residuo obtenido se lavó hasta neutralidad con agua destilada. El producto se secó en una estufa a 32°C. (Suryanarayana, Yashodha, Mattendrakar, Puttarajappa, P. (1987).

Caracterización

La quitina y el quitosano fueron caracterizados en términos de:

Determinación de Quitina

El porcentaje de quitina en base seca se determinó gravimétricamente después de la desproteínización de la HTCH. (Carroad, Tom, (1978).

Humedad

La humedad se determinó gravimétricamente de acuerdo con el procedimiento estándar de la AOAC (AOAC., 1995).

Cenizas

El contenido en cenizas se determinó gravimétricamente de acuerdo con el procedimiento estándar de la AOAC (AOAC., 1995), luego de incinerar la muestra a 550°C para volatilizar todo el material orgánico.

Hidratos de Carbono

El contenido en hidratos de carbono totales se determinó mediante el método colorimétrico de Dubois, usando un reactivo de ácido sulfúrico-fenol. (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, Smith, 1956).

Nitrógeno Total

El nitrógeno total (N_t) se determinó mediante el método Kjeldahl de acuerdo con el procedimiento establecido por la A.O.A.C. 1995 (AOAC., 1995), en un equipo automático Kjeltec™ 840 (Foss Iberica S.A., Barcelona) equipado con digestor y destilador.

Análisis Infrarrojo

Los espectros infrarrojos de las muestras se registraron usando pellets de bromuro de potasio con un espectrómetro FT-IR (FTIR 8300, Shimadzu).

Análisis y Discusión de Resultados

Los métodos tradicionales para la preparación comercial de quitina incluyen ácido clorhídrico alternativo y tratamiento con álcali, seguido de una etapa de blanqueo con reactivos químicos para obtener un producto incoloro. Estos procedimientos tienen varios inconvenientes entre ellos (i) afecta las propiedades fisicoquímicas de la quitina, conduce a una disminución del peso molecular y del grado de desacetilación de la quitina purificada; (ii) afecta el efluente de aguas

residuales debido a que son altamente contaminantes (iii) aumenta el costo de los procesos de purificación de quitina. Por lo tanto, el desarrollo de procesos respetuosos con el medio ambiente es de gran interés. Estos tratamientos deben adaptarse a la fuente de quitina, debido a las diferencias en la estructura del material de partida.

En estudios anteriores se ha demostrado que los métodos biológicos (usando microorganismos) dieron mejores resultados con respecto al químico porque preserva la estructura de la quitina. (Bustos, R., Healy, M. 1994). También demostraron que la quitina obtenida por la desproteínización en cáscaras de camarones tiene mayores pesos moleculares en comparación con la quitina de mariscos obtenidos químicamente. La extracción biológica de quitina ofrece una alta reproducibilidad en un tiempo más corto, una manipulación más simple, un menor consumo de solvente y un menor aporte de energía. Desde de un punto de vista realista, los dos principales subproductos ricos en quitina son: el exoesqueleto de crustáceos procedente del procesamiento industrial o de los grandes depósitos existentes en la Antártida, y los subproductos procedentes de la industria de hongos comestibles. (Urbina-Salazar, Inca-Torres, Falcón-García, Carbonero-Aguilar, Rodríguez-Morgado, del Campo, et al., 2019).

La quitina al presentar una estructura resistente, rígida e insoluble es difícil de eliminar o degradar, ocasionando de esta manera la contaminación del medioambiente donde se deposita. Dependiendo del origen de la quitina, el acúmulo es de una manera u otra, así la quitina de crustáceos se almacena en regiones costeras y/o zonas industriales de procesamiento de mariscos, mientras que la quitina de hongos comestibles (quitina fúngica) procedentes de las Industrias conserveras del champiñón se almacena exclusivamente en los alrededores de las industrias de procesamiento.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos mediante un procedimiento enzimático, respetuoso con el medio ambiente, basado en el uso de proteasas y glucanasas que conducen a la obtención de una fracción de quitina fúngica con una concentración de quitina $>80 \pm 2\%$. Siendo este uno de los primeros trabajos en abordar de manera sistemática la preparación de quitina de origen fúngica, como se detalla en la Figura-1.



Fig.1. Subproductos obtenidos de la Industria conservera de Hongos utilizados para la preparación de quitina fúngica.

En primer lugar, para poder utilizar estos subproductos de una manera efectiva, ya que debido a su naturaleza y composición química son fácilmente deteriorables estos fueron estabilizados en una forma fácilmente almacenable y segura. Se estudió la composición básica del producto estabilizado HTCH de 3 orígenes distintos como se muestra en la Tabla-1.

Tabla1. Composición básica de las HTCH procedentes de tres orígenes distintos: Autol (La Rioja), Hellin (La Manchuela) y Los Palacios (Sevilla).

Material de Partida	HTCH		
	AUTOL	HELLIN	LOS PALACIOS
Humedad	7,3±1,2	7,4±0,9	7,5±1,4
Peso Seco	92,7±1,2	92,6±0,9	92,5±1,4
Cenizas	8,8±2,3	8,9±1,9	9,1±2,1
MO	91,2±2,3	91,1±1,9	90,9±2,1
Grasa	3,2±0,4	3,0±0,5	3,4±0,3
Nt	5,2±0,3	5,1±0,4	5,3±0,2
Proteína	28,6±1,7	28,1±1,4	29,2±1,5
HC+Otros	59,4±5,1	60,0±4,8	58,3±5,3
Ph	6,9±0,3	6,8±0,4	6,7±0,2

Fuente: Notas de campo. Elaboración propia

Como se muestra en la Tabla-1, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados para las tres HTCH de diferentes orígenes geográficos. Probablemente a que los compost y tierras de cobertura utilizados industrialmente sean muy parecidos, a pesar de que los dos primeros han sido suministrados por el Grupo Riberebro (Haro, La Rioja) y el tercero por una empresa local de la provincia de Sevilla.

Como se puede observar el componente mayoritario de las tres HTCH analizadas son los hidratos de carbono ($58,3 \pm 5,3$ a $60,0 \pm 4,8$), seguido del contenido en proteínas ($28,1 \pm 1,4$ a $29,2 \pm 1,5$). Ambos componentes representan del orden del 86 al 89% de la materia orgánica. En relación con los hidratos de carbono, la mayor parte de ellos son glucanos y quitina, formando un complejo quitina-glucano. En cuanto a las proteínas, estas se encuentran la mayor parte unidas a los hidratos de carbono, fundamentalmente a nivel de membranas y pared celular, con lo que su digestibilidad, y por tanto su valor nutritivo en principio es más bien bajo. Sin embargo, el desarrollo de procedimientos que faciliten su solubilidad favorecerá su bioaccesibilidad y por tanto su biodisponibilidad, incrementando así su valor nutricional y funcional.

Se ha utilizado los subproductos provenientes de la industria de setas y hongos comestibles, concretamente del champiñón (*Agaricus bisporus*), como materia prima para la obtención de productos de alto valor añadido, de interés para varias industrias y contribuir a la mejora y protección del medioambiente, a través de un sistema de economía circular. Los tallos de champiñón, debido a su composición [26-30% peso seco en proteínas, 49-65% peso seco en carbohidratos, y diversas sustancias beneficiosas para la salud como ergotioneina, ergosterol (precursor de la vitamina-D2), péptidos antioxidantes, etc.], pueden constituir unas excelentes fuentes de partida para la obtención de diferentes productos potencialmente utilizables en la industria médico-farmacéutica y alimentaria como nutracéuticos, en la industria cosmética como nutricosméticos o en agronomía como biofertilizantes, e incluso pueden constituir una excelente fuente para fines biotecnológicos, tales como fuente de fermentación para la producción de quitinasas y otras hidrolasas, además de poder utilizarse como fuente de partida para la obtención de nano-quitina, siempre y cuando se desarrollen los procesos adecuados.

Se han diseñado dos procesos, uno basado en la extracción acuosa de los componentes solubles como primer paso, seguido de un tratamiento enzimático como segundo paso (Proceso-A), y el otro a la inversa primero el tratamiento enzimático con proteasas y en segundo lugar la extracción acuosa (Proceso-B). Revelándose el Proceso-B como más eficiente y rentable que permite la

obtención de productos de alto valor añadido. En la Figura-2 se puede observar los dos procedimientos utilizados y los compuestos de interés industrial obtenidos y finalmente, la obtención de la quitina fúngica.

Cualquiera de estos dos procedimientos conduce a la obtención de una fracción de quitina. Dependiendo del producto final a obtener, el proceso se desarrollará bien por la vía A) o B). La vía A) es la más adecuada para la obtención de péptido-glucanos, mientras que, la vía B) es la más eficiente para la obtención de hidrolizados proteicos, siendo indistinta la vía a seguir para la obtención de ergotioneina o quitina/nano-quitina fúngica.

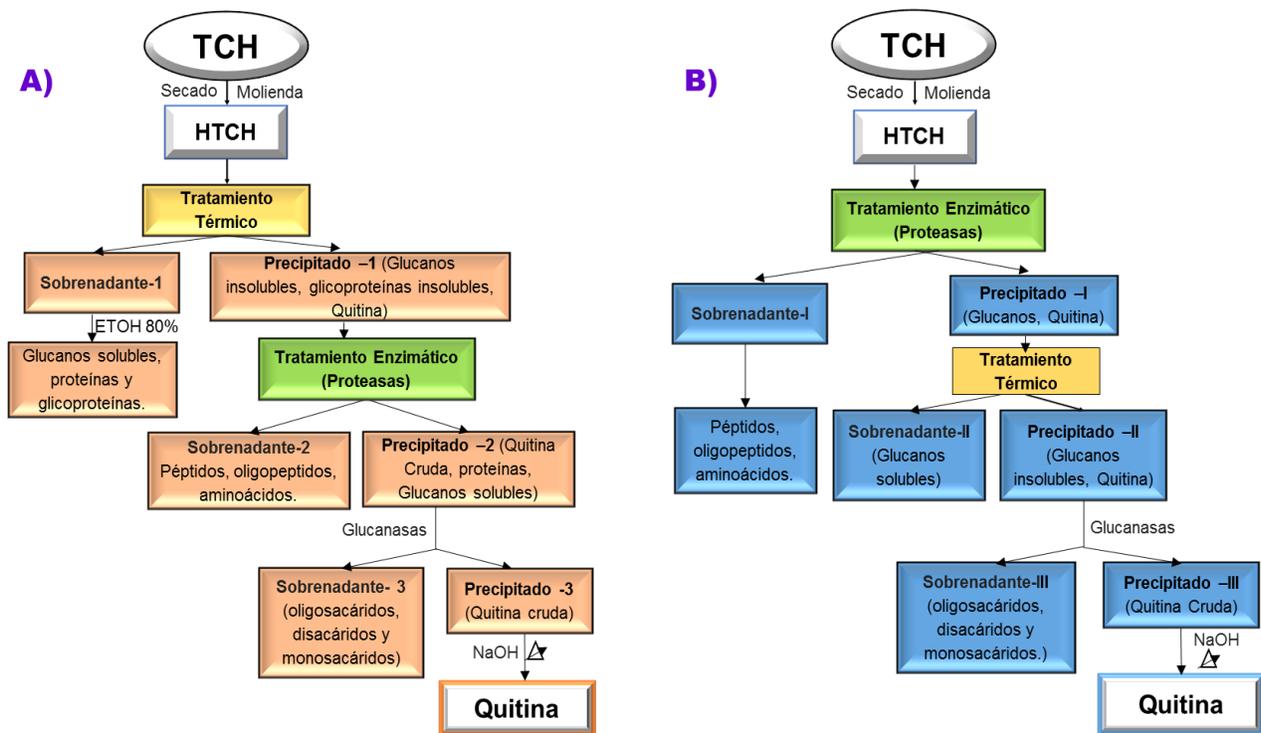


Fig.2. Diseños de procesos biotecnológicos para la obtención de quitina.

Como podemos observar el paso fundamental de este procedimiento es el tratamiento con proteasas, encaminado a la desproteización de la HTCH. Este tratamiento enzimático genera un sobrenadante o hidrolizado proteico y un precipitado o material insoluble-I. El hidrolizado proteico, que está integrado por aminoácidos, oligopéptidos, péptidos y proteínas solubles, así como también por otras moléculas solubles como azúcares, oligosacáridos y polisacáridos,

además del antioxidante ergotioneina, mientras que el material insoluble-I está integrado, fundamentalmente, por glucanos, quitina, mananos y proteínas covalentemente unidas a algunos de estos polisacáridos.

La decisión por la variante B se tomó tras el análisis de las cantidades de producto recuperadas en forma soluble e insoluble, que se muestran en la Tabla-R.2. Estos datos muestran que la cantidad de producto soluble recuperado por la variante A es del $34,3 \pm 0,4\%$ mientras que por la variante B se recupera el $41,3 \pm 1,1\%$, diferencia que podría sugerirnos que no es lo significativamente importante como para justificar el uso de una etapa enzimática, que generalmente es un proceso caro, debido al coste de las enzimas. Sin embargo, si nos fijamos en la cantidad de producto proteico recuperado, el producto recuperado por la variante A contiene un $23,6 \pm 0,2\%$ de material proteico mientras que el obtenido por la variante B contiene el $36,8 \pm 1,5\%$. Diferencia significativamente mayor, y que en base a sus posibles aplicaciones sí justificaría sobradamente el uso de enzimas, proteasas en concreto, para esta etapa o fase del proceso de valorización de la HTCH.

Tabla2. Balance de masas para la vía A) y B) del proceso biotecnológico utilizado para la recuperación de material hidrosoluble de la HTCH.

Materia l de partida	HTCH								
	HTCH (g)	Precip- I (g)	% Insolu- ble	% Solubl e	Sobre n. (g, p.s.)	Sobren (mL)	Proteín a (mg/m L)	Proteín a (g)	Proteí na (%)
VIA A									
MEDI A±DS	$36,1 \pm 0,3$	$23,7 \pm 0,2$	$65,6 \pm 0,4$	$34,3 \pm 0,4$	$12,4 \pm 0,2$	$331,7 \pm 7,6$	$8,8 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$	$23,6 \pm 0,2$

VIA B						15,2±0,	5,5±0,1	
MEDI	36,2±	21,2±0	58,7±1	41,3±	14,9±	360,7±	5	36,8±
A±DS	0,4	,4	,1	1,1	0,4	10,1		1,5

Si bien, el grado de hidrólisis es el parámetro que determina la eficiencia de un proceso de hidrólisis enzimática con proteasas, al ser un parámetro teórico, no es directamente medible. Sin embargo, el consumo de NaOH, que está directamente relacionado con el grado de hidrólisis (Adler-Nissen, J.,1986); sí es un parámetro medible, fácil de obtener y útil para el seguimiento del proceso de hidrólisis. Los grados de hidrólisis alcanzados no son tan altos como cabría esperar para un sustrato con una concentración de proteína del orden del 30% como es la HTCH. Sin embargo, teniendo en cuenta que una parte importante de las proteínas de la HTCH son proteínas de membrana, en las que estas están unidas covalentemente a algún componente membranal, fundamentalmente glucanos o quitina. (García-Mendoza, C., 2000), esto dificulta estéricamente una degradación o fraccionamiento completo de la cadena polipeptídica quedando siempre un fragmento unido al polisacárido u otra posible molécula como se muestra en la Figura-3. Este procedimiento es utilizado para separar las proteínas que se encuentran unidas a los Glucanos o quitina para de esta manera poder recuperar en lo máximo posible la quitina.

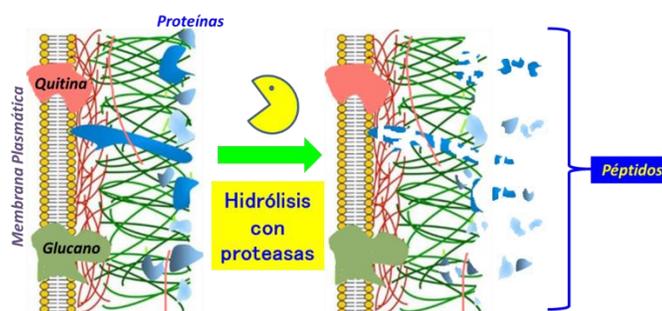


Fig.3. Esquema del proceso de hidrólisis enzimática para la recuperación de la quitina.

Teniendo en cuenta que, según la composición de la HTCH, este subproducto tiene un contenido en proteínas del 28,1±1,4 al 29,2±1,5, podría constituir una excelente materia prima para la obtención de hidrolizados proteicos. Lo que favorecerá la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de este material proteico, que mayoritariamente, en la HTCH, está unido covalentemente a hidratos

de carbono, formando proteoglucanos. Por lo que, si se utiliza sin hidrolizar, no es fácilmente utilizable por las plantas, cuando se aplica como biofertilizante, o por las células epiteliales o intestinales si se utiliza en cosmética o como nutracéutico, respectivamente. Por lo que procedimos al desarrollo de procesos hidrolíticos encaminados a la solubilización máxima del material proteico de la HTCH, con el fin de utilizarlo en algunas de las aplicaciones citadas más arriba.

La separación del complejo quitina–glucanos se realizó mediante un tratamiento con glucanasas, en la cual se logró extraer la quitina para poder ser analizado mediante métodos de espectrometría (IR).(Figura-3). La Figura-4 muestra los espectros infrarrojos (IR) realizados a las muestras de quitina estándar (Sigma Chemical) y de la quitina obtenida de los residuos de champiñón mediante los dos procesos –A y –B, como se puede observar en la figura ambos procedimientos son similares al espectro IR de la quitina estándar, identificando los principales grupos funcionales (amida y carbonilo). Las vibraciones de estiramiento del grupo N-H tienen dos frecuencias moderadamente intensas. Al realizarse el análisis en muestras sólidas, estas bandas se observan cerca de 3350 y 3180 cm^{-1} debido al enlazamiento de hidrógeno; la frecuencia del carbonilo se observa en una banda intensa en la región de 1650 cm^{-1} , lo que se confirma que el producto obtenido luego de estos procedimientos corresponde a quitina. (Cardenas, Sanzana, Innocentini, (2002); Silverstein, R., Clayton Bassler, G., Morrill, T. (1991).

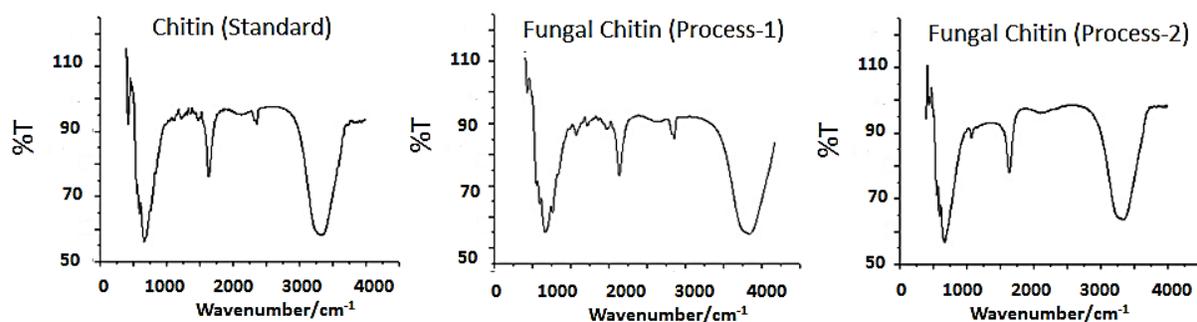


Figura 4. Espectros IR (FTIR) de quitina (estándar) y quitina fúngica obtenidos por Proceso-A y Proceso-B

La concentración de quitina de los productos obtenidos en el Proceso-A y -B, determinada como N-acetil-glucosamina, fue de $80,4 \pm 2,2$. y $81,3 \pm 1,8$. La quitina obtenida fue tratada con un tratamiento adicional de NaOH (en condiciones más suaves y durante un tiempo más corto) para

aumentar su pureza y preservar la estructura de la quitina. La quitina tras un proceso de desacetilación se obtiene el quitosano, siendo estos la quitina y quitosano compuestos de interés industrial utilizados para la liberación de fármacos, apósitos para heridas o biopelículas, entre otros. La quitina al ser un polímero natural, así como biocompatible y biodegradable en el cuerpo, puede ser utilizada para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. (Gianfranco Romanazzi, S., Marianna Sanzani, Yan Bi, Shiping Tian, P., Gutiérrez Martínez, N., 2016).

El quitosano, obtenido por desacetilación de la quitina, bien por vía química o por vía enzimática, es utilizado como material funcional en los campos de la alimentación, la salud o la agricultura debido a su biocompatibilidad, no toxicidad y disponibilidad de biomasa abundante y económica (Baranwal, A., Kumar, A., Priyadharshini, A., Oggu, G., Bhatnagar, I., Srivastava, A., Chandra, P., 2018).

Conclusiones

Los subproductos industriales ricos en quitina, procedentes de la industria de los hongos comestibles, debido a su composición, además de ser muy abundantes y baratos, y no dependen de la temporalidad, debido a que se producen a lo largo de todo el año, constituyen materias primas de partida, con un alto potencial de valorización para la obtención de diferentes materiales bioactivos de alto valor añadido aplicables en distintos sectores industriales,

Se obtuvo quitina fúngica con una concentración de quitina $> 80 \pm 2\%$, en ambos procesos desarrollados, el producto final (quitina fúngica cruda) es similar a una quitina estándar como se muestra por espectrometría IR. Esta quitina fúngica cruda podría utilizarse como una fuente de carbono para los procesos biotecnológicos, para la producción de quitinasas y elicitores, con aplicaciones prometedoras en la agricultura para el control biológico de plagas y otras enfermedades de las plantas. Y si purificamos esta quitina podría tener aplicaciones en otros campos como medicina, industria farmacéutica, cosméticos, etc.

Los procedimientos utilizados para la obtención de quitina fueron procedimientos muy respetuosos con el medio ambiente debido a que no se utilizan productos químicos que contaminan el medio ambiente, estos procedimientos se basan en el uso de proteasas que también han sido obtenidas mediante procesos biotecnológicos. Durante los procedimientos desarrollados para la

obtención de la quitina fúngica también se obtuvieron otros compuestos de interés industrial (Hidrolizados proteicos, péptidos, oligopéptidos, aminoácidos) que se estudiarán más adelante.

Referencias

1. Langner, T., Göhre, V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Curr Genet.* 62(2): 243–54.
2. Merzendorfer, H. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 206(24): 4393–412
3. Fortuna-González, M. (2010). Caracterización bioquímica y molecular de quitinasas en cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Doctoral thesis. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, México. 2010.
4. Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Jessopp M, Loeb V. (2009). A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 56: 727–740.
5. Jeuniaux C, Voss-Foucart M.F. (1991). Chitin biomass and production in the marine environment. *Biochem. Syst. Ecol.* 19: 347–356
6. Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.* 8: 203.
7. Charoenvuttitham, P., Shi, J., Mittal, G. (2006). Chitin extraction from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) waste using organic acids. *Sep. Sci. Technol.* 41: 1135–1153.
8. Gopalan Nair, K. & Dufresne, A. (2003). Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*, 4(3): 657-665.
9. Jones, M., Weiland, K., Kujundzic, M., Theiner, J., Kahlig, H., Kontturi, E., et al. (2019). Waste-Derived Low-Cost Mycelium Nanopapers with Tunable Mechanical and Surface Properties. *Biomacromolecules*. 20: 3513–3523.
10. Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., Galli, E. (2008). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *Int. J. Biol. Macromol.* 43: 8–12.
11. Hassainia, A., Satha, H., Boufi, S. (2018). Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 117: 1334–1342.
12. Nawawi, W., Lee, K-Y, Kontturi, E., Murphy, R., Bismarck, A. (2019). Chitin nanopaper from mushroom extract: Natural composite of nanofibres and glucan from a single bio-based source. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7: 6492–6496.

13. Abdul Manan, M., Webb, C. (2017). Modern Microbial Solid State Fermentation Technology for Future Biorefineries for the Production of Added-Value Products. *Biofuel Res. J.* 4: 730–740.
14. Atila, F., Owaid, M. N., Shariati, M. A. (2017). The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(3): 281–286
15. Muszyńska, B., Kała, K., Rojowski, J., Grzywacz, A., Opoka, W. (2017). Composition and biological properties of *Agaricus bisporus* fruiting bodies—a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 67(3): 173-182.
16. FAO, (2018). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO Regional Statistical Yearbooks. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
Fecha de consulta 2018.
17. Buruleanu, L. C., Radulescu, C., Georgescu, A., Danet, F. (2018). Olteanu R L, Nicolescu C M, Dulama I D. 2018. Statistical characterization of the phytochemical characteristics of edible mushroom extracts. *Analytical Letters*, 51(7): 1039–1059.
18. Urbina-Salazar, A., Inca-Torres, A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar, P., Rodríguez-Morgado, B., del Campo, J., et al. (2019). Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. *Waste and Biomass Valorization*, 10(10): 2915-2923. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>.
19. Elieh-Ali-Komi D, Hamblin M R. 2016. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4(3): 411.
20. Ozuna, C., Álvarez-Arenas, T., Riera, E., Cárcel, J., García-Pérez, J. (2014^a). Influence of material structure on air-borne ultrasonic application in drying. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21: 1235-1243.
21. Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M, et al. (2009). Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. *Journal of Structural Biology*, 168(3): 539-547.
22. Inca-Torres, A., Urbina-Salazar, A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., et al. (2018). Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge. *Journal of Biotech Research*, 9:14-26.

23. Suryanarayana, S., Yashodha, K., Mattendrakar, N., Puttarajappa, P. (1987). Deacetylation of Chitin at Low Temperature by a Novel Álcali Impregnation Technique. *Indian Journal of Technology*. 25: 194 -196.
24. Carroad, P., Tom, R. (1978). Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes: Process. Conception and Selection of Microorganisms. *Journal of Food Science*. 43:1158-1161.
25. AOAC. (1995) *Official Methods of Analysis*, 13th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC,1995.
26. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3): 350-356.
27. Bustos, R., Healy, M. (1994). Microbial deproteinization of waste prawn shell; *Proceedings of the Second International Symposium on Environmental Biotechnology*; Brighton, UK: *Biotechnology* 94: 15–25.
28. Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
29. García-Mendoza, C. (2000). Algunos aspectos estructurales y funcionales de la pared celular de *Agaricus bisporus* y sus aplicaciones más inmediatas. *Anales de la Real Academia de Farmacia*. 66:1-19.
30. Cardenas, T., Sanzana, L., Innocentini, M. (2002). Síntesis and characterization of Chitosan-PHB Blends. *Bol. Soc. Chil. Quim. Online*, 47 (4): 529-535.
31. Silverstein, R., Clayton Bassler, G., Morrill, T. (1991). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39(11): 546.
32. Gianfranco Romanazzi, S., Marianna Sanzani, Yan Bi, Shiping Tian, P., Gutiérrez Martínez, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 82-94.
33. Baranwal, A., Kumar, A., Priyadharshini, A., Oggu, G., Bhatnagar, I., Srivastava, A., Chandra, P. (2018). Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int J Biol Macromol*. 110:110-123.

References

1. Langner, T., Göhre, V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant / pathogen interactions. *Curr Genet.* 62 (2): 243–54.
2. Merzendorfer, H. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 206 (24): 4393–412
3. Fortuna-González, M. (2010). Biochemical and molecular characterization of chitinases in Mexican strains of *B. thuringiensis*. Doctoral thesis. National Polytechnic Institute. Mexico City, Mexico. 2010.
4. Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Jessopp M, Loeb V. (2009). A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 56: 727–740.
5. Jeuniaux C, Voss-Foucart M.F. (1991). Chitin biomass and production in the marine environment. *Biochem. Syst. Ecol.* 19: 347–356
6. Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.* 8: 203.
7. Charoenvuttitham, P., Shi, J., Mittal, G. (2006). Chitin extraction from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) waste using organic acids. *Sep. Sci. Technol.* 41: 1135-1153.
8. Gopalan Nair, K. & Dufresne, A. (2003). Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*, 4 (3): 657-665.
9. Jones, M., Weiland, K., Kujundzic, M., Theiner, J., Kahlig, H., Kontturi, E., et al. (2019). Waste-Derived Low-Cost Mycelium Nanopapers with Tunable Mechanical and Surface Properties. *Biomacromolecules*. 20: 3513–3523.
10. Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., Galli, E. (2008). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *Int. J. Biol. Macromol.* 43: 8–12.
11. Hassainia, A., Satha, H., Boufi, S. (2018). Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 117: 1334–1342.
12. Nawawi, W., Lee, K-Y, Kontturi, E., Murphy, R., Bismarck, A. (2019). Chitin nanopaper from mushroom extract: Natural composite of nanofibres and glucan from a single bio-based source. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7: 6492–6496.

13. Abdul Manan, M., Webb, C. (2017). Modern Microbial Solid State Fermentation Technology for Future Biorefineries for the Production of Added-Value Products. *Biofuel Res. J.* 4: 730–740.
14. 1.Atila, F., Owaid, M. N., Shariati, M. A. (2017). The nutritional and medical benefits of *Agaricus bisporus*: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7 (3): 281–286
15. 2.Muszyńska, B., Kała, K., Rojowski, J., Grzywacz, A., Opoka, W. (2017). Composition and biological properties of *Agaricus bisporus* fruiting bodies – a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 67 (3): 173-182.
16. 3.FAO, (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Regional Statistical Yearbooks. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Date of consultation 2018.
17. 4.Buruleanu, L. C., Radulescu, C., Georgescu, A., Danet, F. (2018). Olteanu R L, Nicolescu C M, Dulama I D. 2018. Statistical characterization of the phytochemical characteristics of edible mushroom extracts. *Analytical Letters*, 51 (7): 1039–1059.
18. 5.Urbina-Salazar, A., Inca-Torres, A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar, P., Rodríguez-Morgado, B., del Campo, J., et al. (2019). Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. *Waste and Biomass Valorization*, 10 (10): 2915-2923. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>.
19. 6.Elieh-Ali-Komi D, Hamblin M R. 2016. Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International journal of advanced research*, 4 (3): 411.
20. 7.Ozuna, C., Álvarez-Arenas, T., Riera, E., Cárcel, J., García-Pérez, J. (2014^a). Influence of material structure on air-borne ultrasonic application in drying. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21: 1235-1243.
21. 8.Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M, et al. (2009). Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. *Journal of Structural Biology*, 168 (3): 539-547.
22. 9.Inca-Torres, A., Urbina-Salazar, A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., et al. (2018). Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge. *Journal of Biotech Research*, 9: 14-26.

23. 10.Suryanarayana, S., Yashodha, K., Mattendrakar, N., Puttarajappa, P. (1987). Deacetylation of Chitin at Low Temperature by a Novel Álcali Impregnation Technique. *Indian Journal of Technology*. 25: 194-196.
24. Carroad, P., Tom, R. (1978). Bioconversion of Shellfish Chitin Wastes: Process. Conception and Selection of Microorganisms. *Journal of Food Science*. 43: 1158-1161.
25. 2.AOAC. (1995) Official Methods of Analysis, 13th ed .; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1995.
26. 3.Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28 (3): 350-356.
27. 4.Bustos, R., Healy, M. (1994). Microbial deproteinization of waste prawn shell; *Proceedings of the Second International Symposium on Environmental Biotechnology*; Brighton, UK: *Biotechnology* 94: 15–25.
28. 5.Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
29. 6.García-Mendoza, C. (2000). Some structural and functional aspects of the *Agaricus bisporus* cell wall and its most immediate applications. *Annals of the Royal Academy of Pharmacy*. 66: 1-19.
30. 7.Cardenas, T., Sanzana, L., Innocentini, M. (2002). Synthesis and characterization of Chitosan-PHB Blends. *Bol. Soc. Chil. Quim. Online*, 47 (4): 529-535.
31. 8.Silverstein, R., Clayton Bassler, G., Morrill, T. (1991). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39 (11): 546.
32. 9.Gianfranco Romanazzi, S., Marianna Sanzani, Yan Bi, Shiping Tian, P., Gutiérrez Martínez, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 82-94.
33. 10.Baranwal, A., Kumar, A., Priyadharshini, A., Oggu, G., Bhatnagar, I., Srivastava, A., Chandra, P. (2018). Chitosan: An undisputed bio-fabrication material for tissue engineering and bio-sensing applications. *Int J Biol Macromol*. 110: 110-123.

Referências

1. Langner, T. Göhre, V. (2016). Quitinases fúngicas: função, regulação e possíveis papéis nas interações planta / patógeno. *Curr Genet.* 62 (2): 243–54.
2. Merzendorfer, H. (2003). Metabolismo da quitina em insetos: estrutura, função e regulação das quitinas-sintases e quitinases. *J Exp Biol.* 206 (24): 4393–412
3. Fortuna-González, M. (2010). Caracterização bioquímica e molecular de quitinases em cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Tese de doutorado. Instituto Politécnico Nacional. Cidade do México, México. 2010.
4. Os dados foram analisados por meio de entrevistas semiestruturadas. Uma reavaliação da biomassa total e produção anual de krill antártico. *Deep Sea Res. Parte I Oceanogr. Res. Pap.* 56: 727-740.
5. Jeuniaux C, Voss-Foucart M.F. (1991). Biomassa e produção de quitina no ambiente marinho. *Biochem. Syst. Ecol.* 19: 347–356
6. Kurita, K. (2006). Quitina e quitosana: biopolímeros funcionais de crustáceos marinhos. *Mar. Biotechnol.* 8: 203.
7. Charoenvuttitham, P., Shi, J., Mittal, G. (2006). Extração de quitina a partir de resíduos de camarão tigre preto (*Penaeus monodon*) usando ácidos orgânicos. *Setembro Sci. Technol.* 41: 1135-1153.
8. Gopalan Nair, K. & Dufresne, A. (2003). Nanocompósitos de borracha natural reforçados com suportes de quitina de casca de caranguejo. 1. Comportamento de processamento e inchaço. *Biomacromolecules*, 4 (3): 657-665.
9. Jones, M., Weiland, K., Kujundzic, M., Theiner, J., Kahlig, H., Kontturi, E., et al. (2019). Nanopapers de micélio de baixo custo derivados de resíduos com propriedades mecânicas e de superfície ajustáveis. *Biomacromoléculas.* 20: 3513–3523.
10. Di Mario, F., Rapana, P., Tomati, U., Galli, E. (2008). Quitina e quitosana de Basidiomycetes. *Int. J. Biol. Macromol.* 43: 8-12.
11. Hassainia, A., Satha, H., Boufi, S. (2018). Quitina de *Agaricus bisporus*: extração e caracterização. *Int. J. Biol. Macromol.* 117: 1334–1342.
12. Os dados foram analisados por meio de entrevistas semiestruturadas e entrevistas semiestruturadas. Nanopapel de quitina do extrato de cogumelo: composto natural de nanofibras e glucano de uma única fonte de base biológica. *ACS Sustain. Eng. Chem.* 7: 6492-6496.

13. Abdul Manan, M., Webb, C. (2017). Tecnologia moderna de fermentação microbiana em estado sólido para futuras biorrefinarias para a produção de produtos com valor agregado. *Res. Biocombustível J.* 4: 730-740.
14. O que é o processo de envelhecimento e como ele funciona? Os benefícios nutricionais e médicos do *Agaricus bisporus*: uma revisão. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7 (3): 281–286
15. Os dados foram analisados por meio de entrevistas semiestruturadas e entrevistas semiestruturadas. Composição e propriedades biológicas dos corpos de frutificação de *Agaricus bisporus* - uma revisão. *Revista polonesa de ciências da alimentação e nutrição*, 67 (3): 173-182.
16. 3. FAO, (2018). Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, Anuários Estatísticos Regionais da FAO. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Data da consulta 2018.
17. Os dados foram analisados por meio de questionário descritivo. Olteanu RL, Nicolescu CM, Dulama I D. 2018. Caracterização estatística das características fitoquímicas dos extratos de cogumelos comestíveis. *Analytical Letters*, 51 (7): 1039-1059.
18. 5. Urbina-Salazar, A., Inca-Torres, A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar, P., Rodríguez-Morgado, B., del Campo, J., et al. (2019). Produção de quitinase por *Trichoderma harzianum* cultivada em meio formulado com subproduto de cogumelo rico em quitina. Valorização de resíduos e biomassa, 10 (10): 2915-2923. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0328-4>.
19. 6. Elieh-Ali-Komi D, Hamblin M. R. 2016. Quitina e quitosana: produção e aplicação de nanomateriais biomédicos versáteis. *Revista internacional de pesquisa avançada*, 4 (3): 411.
20. 7. Ozuna, C., Álvarez-Arenas, T., Riera, E., Cárcel, J., García-Pérez, J. (2014^a). Influência da estrutura do material na aplicação ultrassônica a ar na secagem. *Sonochemistry Ultrasonics*. 21: 1235-1243.
21. Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M, et al. (2009). Os andaimos à base de quitina são parte integrante do esqueleto da demosponja marinha *Ianthella basta*. *Journal of Structural Biology*, 168 (3): 539-547.
22. Inca-Torres, A., Urbina-Salazar, A., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar P., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., et al. (2018). Produção de enzimas hidrolíticas pelo crescimento de

- Bacillus licheniformis em meio de fermentação formulado com lodo de esgoto Journal of Biotech Research, 9: 14-26.
23. Suryanarayana, S., Yashodha, K., Mattendrakar, N., Puttarajappa, P. (1987). Desacetilação da quitina a baixa temperatura por uma nova técnica de impregnação com álcali. Jornal indiano de tecnologia. 25: 194-196.
 24. Carroad, P., Tom, R. (1978). Bioconversão de Resíduos de Quitina de Marisco: Processo. Concepção e Seleção de Microrganismos. Journal of Food Science. 43: 1158-1161.
 25. AOAC. (1995) Official Methods of Analysis, 13a ed.; Associação de Químicos Analíticos Oficiais: Washington, DC, 1995.
 26. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Método colorimétrico para determinação de açúcares e substâncias relacionadas. Analytical chemistry, 28 (3): 350-356.
 27. Bustos, R., Healy, M. (1994). Desproteínização microbiana de resíduos de casca de camarão; Anais do Segundo Simpósio Internacional de Biotecnologia Ambiental; Brighton, Reino Unido: Biotechnology 94: 15–25.
 28. Adler-Nissen, J. (1986). Hidrólise enzimática de proteínas alimentares. Londres: Elsevier Applied Science Publishers.
 29. García-Mendoza, C. (2000). Alguns aspectos estruturais e funcionais da parede celular de Agaricus bisporus e suas aplicações mais imediatas. Anais da Academia Real de Farmácia. 66: 1-19.
 30. Cardenas, T., Sanzana, L., Innocentini, M. (2002). Síntese e caracterização de misturas de quitosana-PHB. Bol. Soc. Chil. Quim. Online, 47 (4): 529-535.
 31. Silverstein, R., Clayton Bassler, G., Morrill, T. (1991). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Journal of Chemical Education, 39 (11): 546.
 32. Gianfranco Romanazzi, S., Marianna Sanzani, Yan Bi, Shiping Tian, P., Gutiérrez Martínez, N. (2016). Resistência induzida para controlar a deterioração pós-colheita de frutas e legumes. Biologia e Tecnologia Pós-colheita, 122: 82-94.
 33. Os dados foram analisados por meio de entrevistas semiestruturadas e entrevistas semi-estruturadas. Quitosana: Um material indiscutível de biofabricação para engenharia de tecidos e aplicações de bio-deteção. Int J Biol Macromol. 110: 110-123.

©2020 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).