

## DEGRADACIÓN Y DESACETILACIÓN DE QUITINA COLOIDAL POR ACCIÓN DE UNA QUITINASA BACTERIANA Y UNA DESACETILASA DE QUITINA FÚNGICA<sup>1\*</sup>

Adriana Álvarez De la Hoz<sup>1\*</sup> (Venezuela), Rocío Castro Mora<sup>1</sup> (Venezuela), César Izaguirre Guarisma<sup>2</sup> (Venezuela), Osmar Morillo Piña<sup>3</sup> (Venezuela), Pablo García Lugo<sup>1\*\*</sup> (Venezuela)

- 1) Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo”, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Estado Mérida, Venezuela. Correo electrónico: [alvarezd@ula.ve](mailto:alvarezd@ula.ve)
- 2) Laboratorio de Ciencia, Biotecnología e Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Los Andes, Mérida, Estado Mérida, Venezuela.
- 3) Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE), San Felipe, Estado Yaracuy, Venezuela. Correo electrónico: [pgarcial@ula.ve](mailto:pgarcial@ula.ve)

*Recibido: Julio 2011; Aceptado: Noviembre 2011*

### RESUMEN

La quitina es hidrolizada por quitinasas y transformada en quitosano por la desacetilasa de quitina (CDA). El quitosano y sus oligómeros tienen aplicaciones agroindustriales, biomédicas, y farmacéuticas, entre otras. Se evaluaron las actividades quitinasa de *Serratia* sp. BIOMI-363706 y CDA de *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 sobre diferentes sustratos quitinosos, y se acoplaron para incrementar la desacetilación de quitina coloidal. El medio de crecimiento de la bacteria fue utilizado como extracto enzimático con actividad quitinasa, y el extracto con actividad CDA fue el macerado del micelio del hongo, después de una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La actividad quitinasa fue mayor con quitina coloidal que con otros sustratos, mientras que la CDA presentó mayor actividad sobre glicolquitina. Para el acoplamiento, 8,5 mU de CDA fueron enriquecidas con 76 mU de quitinasa, e incubadas a pH 7,0 y 45 °C. La velocidad de la CDA sobre quitina coloidal aumentó  $3,9 \pm 0,8$  veces, obteniéndose  $6,5 \pm 0,6$  veces más de nanomoles de acetato liberadas después de 8 horas de reacción. El acoplamiento de estas enzimas representa un avance hacia una alternativa enzimática para la producción de quitosano y sus oligómeros.

**Palabras claves:** Desacetilasa de quitina, quitina, quitinasa, quitosano.

### ABSTRACT

Chitin is hydrolyzed by chitinases and converted into chitosan by chitin deacetylases (CDA). Chitosan and its oligomers have several agroindustrial, biomedical, and pharmaceutical applications. Chitinase activity from *Serratia* sp. BIOMI-363706 and CDA activity from *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 were evaluated towards different chitinous substrates and coupled in order to increase colloidal chitin deacetylation. The growth media of the bacteria was used as the enzymatic extract with chitinase activity. The CDA was obtained from fungal mycelia disrupted by grinding and was partially purified by fractional ammonium sulfate precipitation. Chitinase activity was higher using colloidal chitin than using other chitinous substrates, in contrast to CDA activity which was higher towards glycol-chitin. For coupling, 8.5 CDA mU were enriched with 76 chitinase mU, and incubated at pH 7.0 and 45 °C. CDA velocity towards colloidal chitin increased  $3.9 \pm 0.8$  times, resulting in the release of  $6.5 \pm 0.6$  times more acetate nanomols after eight hours of reaction. Coupling these enzymes is an advance towards an enzymatic alternative to produce chitosan and its oligomers.

**Key words:** Chitin, chitinase, chitosan, chitin deacetylase.

<sup>\*1</sup>) Trabajo presentado en las *I Jornada de Análisis Térmico de Materiales (I JAT), X Curso de Aplicación en Polímeros y VII EIP*, Universidad de Oriente (Venezuela) 2010.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La quitina es el polisacárido más abundante del océano y el segundo más abundante del planeta, después de la celulosa. Su principal derivado es el quitosano, el cual es el único polisacárido catiónico natural, y tiene numerosas aplicaciones en áreas como alimentos, agricultura, biomedicina, cosmética, y farmacéutica, entre otras [1]. Tanto la quitina como el quitosano son heteropolímeros de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y glucosamina (GlcN), unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4) [2], sólo que en la quitina predominan las unidades acetiladas y en el quitosano predominan las unidades desacetiladas (más del 50 %) [3, 4]. La quitina es extraída principalmente de los exoesqueletos de crustáceos desechados por la industria [1], mientras que el quitosano es obtenido a partir de la quitina, mediante un proceso termoquímico que genera productos con diferentes grados de desacetilación y pesos moleculares [5]. Una alternativa para la obtención de quitosano es la vía enzimática, que representaría un proceso controlado y compatible con el ambiente [6, 7]. La desacetilasa de quitina (CDA, EC 3.5.1.41) cataliza la conversión de quitina en quitosano [5], sin embargo, su actividad está limitada por la accesibilidad de los grupos acetilo de los residuos de GlcNAc [8]. La quitinasa (EC 3.2.11.14) hidroliza quitina en sus componentes oligo y monoméricos [9], y podría mejorar la accesibilidad de los sitios de corte de la CDA. El objetivo de este trabajo fue acoplar la actividad quitinasa bacteriana con la desacetilasa de quitina fúngica, para incrementar la desacetilación del sustrato quitina coloidal, y avanzar hacia la estandarización de la obtención enzimática del quitosano y sus oligómeros.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Preparación de sustratos.**

**2.1.1 Quitina en polvo (QP).** Se extrajo quitina a partir de exoesqueletos de camarón. La parte abdominal de los exoesqueletos se desmineralizó con HCl 1N en proporción 1:5 durante 4 horas a 37 °C, seguido de lavados sucesivos con agua destilada. Luego, se desproteinizó con NaOH 1 M en la misma proporción, a 65 °C durante 3 horas, y nuevamente se realizaron lavados. Se realizó el blanqueamiento con NaClO diluido durante 30 minutos. El material blanqueado se secó a 100 °C durante 24 horas, y se molió para obtener un tamaño de partícula  $\leq 1$  mm.

**2.1.1 Quitina coloidal (QC).** Se utilizó el protocolo de Hsu y Hockwood [10] modificado. Se mezclaron 40 g de polvo de quitina con 400 mL de HCl concentrado, con agitación durante 50 minutos. Se agregaron 2 L de agua destilada fría, y la mezcla se dejó en reposo durante 12 horas. Se centrifugó a 3.200 g durante 10 minutos, a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Se realizaron varios lavados sucesivos con agua destilada por centrifugación en las mismas condiciones anteriores, hasta que el pH del sobrenadante fuera mayor que 2. El material obtenido se esterilizó y se conservó a 4 °C.

**2.1.3 Glicol–quitina (GQ).** Se preparó a partir de glicol–quitosano (Sigma) según Trudel y Asselin [11].

## 2.2 Obtención de los extractos enzimáticos

**2.2.1 Microorganismos** Los microorganismos utilizados pertenecen al cepario del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo” de la Universidad de Los Andes, Mérida, Estado Mérida, Venezuela. La cepa bacteriana *Serratia* sp. BIOMI–363706 fue aislada de una fuente hidrotermal azufrada en Aguas Calientes, Ureña, Estado Táchira, Venezuela. La cepa fúngica *Mucor* sp. BIOMI–CIEPE–01 fue aislada por personal de la Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (Fundación CIEPE, San Felipe, Edo. Yaracuy, Venezuela), a partir de hojarasca de bosque ripario en la localidad de Santa Rosa, Municipio Libertador, Estado Mérida, Venezuela.

**2.2.2. Extracto de quitinasa extracelular** La cepa *Serratia* sp. BIOMI–363706 se sembró e incubó a 37 °C, con agitación de 120 rpm, durante 24 horas, en un medio de composición: 0,5 g/L de extracto de levadura, 1,0 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,36 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , QC 2% (peso húmedo/volumen), y pH 7,0. Este pre–inóculo fue transferido a 90 mL de un caldo de composición:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1%, QC 2% (peso húmedo/volumen), y pH 7,0. El cultivo se incubó a 37 °C, 120 rpm, durante 72 horas. El medio de crecimiento fue filtrado en frío con papel Whatman No.6, y centrifugado a 12.000 g durante 15 minutos, a 4 °C. El sobrenadante fue utilizado como el extracto crudo con actividad quitinasa.

**2.2.3. Extracto de CDA intracelular** Se inoculó caldo YPG (extracto de levadura 0,3%, peptona 0,5%, glucosa 1%) con  $10^5$  esporas/mL de la cepa *Mucor* sp. BIOMI–CIEPE–01. Se incubó durante 120 horas, a 28 °C, en oscuridad, con una agitación de 120 rpm. El micelio se filtró con doble gasa, se liofilizó y se maceró con perlas de vidrio resuspendiendo en buffer tetraborato/HCl

50 mM, pH 7,0, con inhibidor de proteasas (Roche). El macerado se centrifugó a 22.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Para la purificación parcial de la CDA, el sobrenadante se sometió a precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 60% y luego al 85%, realizando cada centrifugación a 22.000 g durante 15 minutos, a 4 °C. El pellet obtenido después de la saturación al 85% se resuspendió en buffer tetraborato/HCl 50 mM, pH 7,0, con 10% de sulfato de amonio, y se utilizó como extracto con actividad CDA.

**2.3. Ensayos de actividad de las enzimas.** La actividad quitinasa se determinó por el método de *Elson–Morgan* modificado según *Reissig et al.* [12], utilizando QC como sustrato. Se realizó una curva de calibración en un rango de concentración de 0 a 200 µg/mL de GlcNAc. Se tomó una unidad quitinasa (UQ) se tomó como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de GlcNAc en un minuto, a pH 6,5 y 50 °C [13].

La actividad CDA se determinó según *Kauss y Bauch* [14], utilizando GQ como sustrato. Se realizó una curva de calibración de 0 – 6 µg de GlcN.HCl. Estequiométricamente, 1 µmol de GlcN equivale a 1 µmol de acetato liberado. Una unidad CDA se tomó como la cantidad de enzima de libera 1 µmol de acetato en un minuto, a pH 7,0 y 40 °C.

**2.4. Estimación de la actividad con diferentes sustratos quitinosos.** Se estimaron velocidades iniciales de la actividad de las enzimas quitinasa y CDA sobre los sustratos QP, QC y GQ. Para la actividad quitinasa, se prepararon suspensiones al 1% (peso seco/volumen) con cada sustrato, en buffer fosfato 50 mM, pH 6,5. Para la actividad CDA, se prepararon suspensiones 0,5 mg/ml (peso seco) de cada uno de los sustratos, en buffer tetraborato/HCl 0,2 M a pH 7,0. Las reacciones se llevaron a cabo a la temperatura óptima de cada enzima (50 °C para quitinasa, y 40 °C para CDA), y se detuvieron a diferentes tiempos para la estimación de las velocidades iniciales. Las muestras con los sustratos QC y QP fueron centrifugadas a 3.200 g y 4°C antes de hacer las lecturas de absorbancia.

**2.5 Acoplamiento de las enzimas.** El buffer–sustrato fue una suspensión de QC 0,5 mg/mL (peso seco) en buffer tetraborato de sodio/HCl 0,3 M, pH 7,0. La mezcla de reacción consistió en 1,1 mL del buffer–sustrato, 1,1 mL del extracto con actividad quitinasa (76 mU), y 0,55 mL del extracto con actividad CDA (8,5 mU). Para la reacción control, el volumen del extracto con quitinasa fue sustituido por agua destilada. Las reacciones se incubaron a 45 °C durante 8 horas, y cada hora se tomó una alícuota cuantificar el producto de la reacción de la CDA. Se estimaron las velocidades iniciales de la CDA, calculando las pendientes de la parte recta de las curvas nmol de

acetato en función del tiempo.

### 3. RESULTADOS

Se determinó que la velocidad de la quitinasa bacteriana fue mayor sobre QC que sobre los sustratos GP y GQ (Figura 1a), mientras que la velocidad de la CDA fúngica fue mayor sobre la GQ, seguida por la QC y finalmente la QP (Figura 1b).

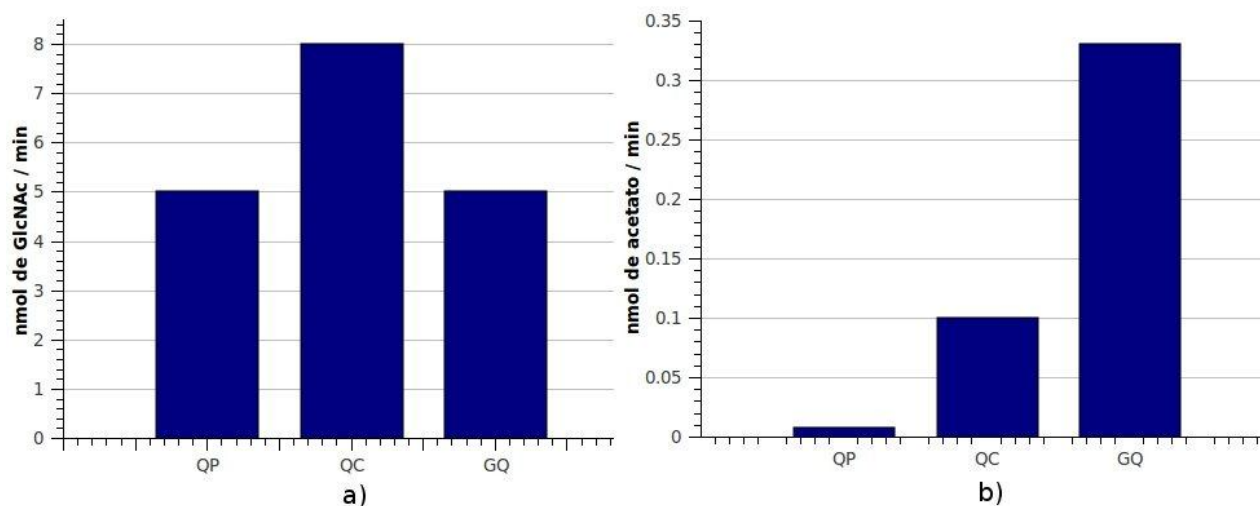


Figura 1. Velocidades iniciales de las enzimas a) quitinasa de *Serratia* sp. BIOMI-363706 y b) CDA de *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 frente a diferentes sustratos quitinosos. QP: Quitina en polvo, QC: Quitina coloidal, GQ: glicol-quitina.

Tabla 1. Velocidades iniciales de la CDA en los extractos con y sin quitinasa, y nanomoles de acetato liberadas al cabo de 8 horas de reacción. Los incrementos están expresados en número de veces.

<i>Extracto CDA</i>	<i>Velocidad inicial (nmol acetato/min)</i>	<i>nmol de acetato, 8 horas</i>
Sin quitinasa	1,7 ± 0,2	5,4 ± 0,4
Con quitinasa	6,7 ± 0,6	35 ± 1
Incremento	3,9 ± 0,8	6,5 ± 0,6

Dado que la QC fue el mejor sustrato para la quitinasa y es el siguiente más económico después de la QP, se eligió como sustrato candidato para aumentar su desacetilación enzimática mediante el acoplamiento de la quitinasa y la CDA. Al enriquecer el extracto de CDA con quitinasa,

se presentó un incremento notable en la actividad de la CDA sobre la QC con respecto al extracto sin enriquecer (Figura 2). Esto se traduce en un aumento en la velocidad inicial de reacción de la CDA, así como de la cantidad de producto final liberado (Tabla 1).

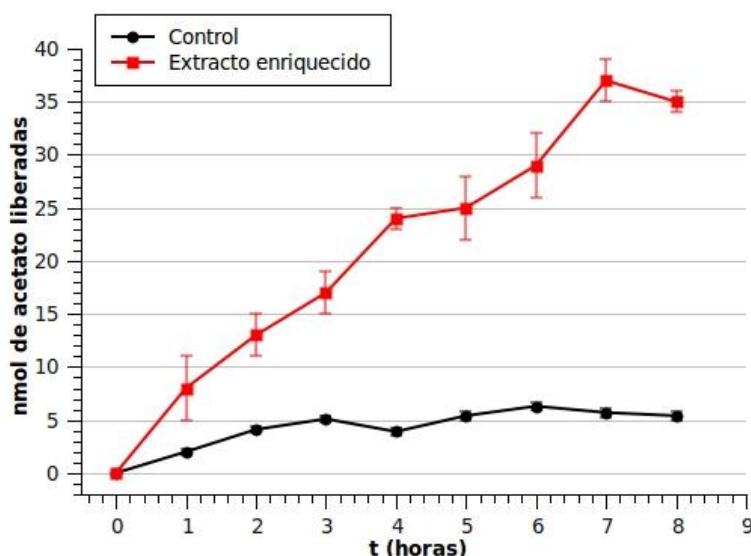


Figura 2. Actividad CDA de *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 en el tiempo, con y sin enriquecimiento con quitinasa de *Serratia* sp. BIOMI-363706. El control es el extracto de CDA sin enriquecimiento.

#### 4. DISCUSIÓN

La actividad de las enzimas sobre diferentes sustratos se encuentra relacionada con la naturaleza de cada sustrato. La QP es insoluble en soluciones acuosas, la QC es más hidrosoluble que la QP, mientras que la modificación química de la GQ (*O*-2-hidroxietil-quitina) la convierte en un sustrato de alta hidrosolubilidad en relación a la QC y la QP. La baja actividad sobre la QP por parte de ambas enzimas se debe probablemente a la baja accesibilidad de los sitios de corte producto de su escasa hidrosolubilidad. En el caso de la CDA, esta baja actividad sobre la QP se había observado previamente [8]. En cuanto a las actividades sobre el sustrato GQ, es posible que la modificación química de esta quitina haya podido afectar el reconocimiento de los sitios de corte de la quitinasa, sin embargo su alta hidrosolubilidad aumentó su accesibilidad a la CDA para la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de GlcNAc.

El aumento de la desacetilación de la QC observado al acoplar las actividades de la quitinasa bacteriana y la CDA fúngica, indica que la quitinasa facilitó la eliminación de los grupos acetilo por parte de la CDA. Este hecho se podría explicar entendiendo la quitinasa como una endoenzima que



realiza cortes al interior del polímero, y que por consiguiente disminuye la longitud de las cadenas volviéndolas más accesibles a la acción de la CDA.

El incremento en la actividad CDA sobre la quitina por la presencia de quitinasas ha sido reportado previamente con extractos crudos de *Mucor rouxii*, en estudios sobre las enzimas implicadas en la degradación de la pared celular [15]. En un trabajo similar con *Aspergillus nidulans*, se reportó el incremento de la actividad CDA por la presencia de quitinasa y de  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, así como la pérdida de actividad CDA en el proceso de purificación, posiblemente por su separación de la endoquitinasa, y subsecuente disminución de la concentración de sustrato. Además, se determinó que la incubación durante 30 horas de una endoquitinasa en presencia de CDA, produjo oligómeros de GlcN de 2 a 6 unidades [16].

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se reporta el acoplamiento de las actividades quitinasa y CDA provenientes de organismos de especies distintas, una quitinasa bacteriana extracelular y una CDA fúngica intracelular, como una vía para incrementar la desacetilación de QC. Este acoplamiento enzimático es un avance hacia el incremento de la desacetilación enzimática de la quitina, como alternativa biotecnológica para la obtención de quitosano y sus oligómeros.

**Agradecimientos.** Este trabajo se encuentra dentro de la “Identificación, selección y evaluación de cepas (fúngicas y bacterianas) con uso potencial en la industria alimentaria”, proyecto código PO05AE-06-12-15 de la *Fundación Centro de Investigaciones del Estado* para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE), *San Felipe – Edo. Yaracuy, Venezuela*. También agradecemos al *Ing. Rubén Gómez del Laboratorio de Ciencia, Biotecnología e Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Los Andes, Mérida – Edo. Mérida, Venezuela*.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pastor A, Higuera I, “Generalidades” En: Pastor A (Editora), *Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones*. Lima (Perú): Pontificia Universidad Católica del Perú, 2004, Cap.1.
- [2] Mourya V, Inamdar, N, *React. Funct. Polym.* **68**,1013 (2008).
- [3] Khor E. “*Chitin: fulfilling a biomaterials promise*”. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier Science Ltd., 2008, p. 1–8.
- [4] Lárez, C. *Av. Quím.* **1**(2), 15 (2006).
- [5] Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V, *Trends Biotechnol.* **18**(7), 305 (2000).
- [6] Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriotis V, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(7), 2564 (1993).
- [7] Amorim RVS, Ledingham WM, Fukushima K, Campos-Takaki GM, *J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.*, **32**(1), 19 (2000).
- [8] Win N, Stevens W, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 334 (2001).

- [9] Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta R, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **27**, 21 (2007)
- [10] Hsu S, Lockwood J, *App. Microbiol.*, **29**, 422 (1975)
- [11] Trudel J, Asselin A, *Anal. Biochem.*, **178**, 362 (1989)
- [12] Reissig J, Strominger J, Leloir L, *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955).
- [13] Gómez-Ramírez M., Rojas-Avelizapa L. I., Rojas-Avelizapa N. G., Cruz-Camarillo R., *J. Microbiol.*, **56**, 213 (2004)
- [14] Kauss H, Bauch B, *Method. Enzymol.*, **161**, 518 (1988)
- [15] Alfonso C, Martínez M, Fuensanta R, *FEMS Microbiol. Lett.*, **95**, 187 (1992)
- [16] Alfonso C, Nuero O, Santamaría F, Reyes F, *Curr. Microbiol.*, **30**(1), 49 (1995)