

QPP609
C3903



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA VENEZUELA

República Bolivariana de Venezuela

Universidad de Los Andes

Facultad de Ciencias

Postgrado en Biotecnología de Microorganismos

www.bdigital.ula.ve

**Selección de microorganismos productores de enzimas
quitinolíticas y caracterización de la actividad extracelular de
dos aislados de *Serratia* sp.**

DONACION

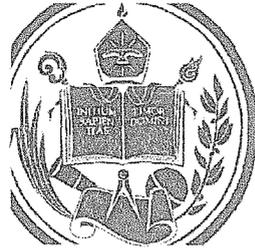
Autor: Ing. Rocío Jasmín Castro Mora

Tutor: Dr. Pablo García Lugo

Mérida, 2012

SERBIULA
Tullio Febres Cordero

Atribución - No Comercial - Compartir Igual 3.0 Venezuela
(CC BY - NC - SA 3.0 VE)



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA VENEZUELA

República Bolivariana de Venezuela

Universidad de Los Andes

Facultad de Ciencias

Postgrado en Biotecnología de Microorganismos

**Selección de microorganismos productores de enzimas
quitinolíticas y caracterización de la actividad extracelular de
dos aislados de *Serratia* sp.**

Trabajo de grado presentado ante la ilustre

Universidad de Los Andes

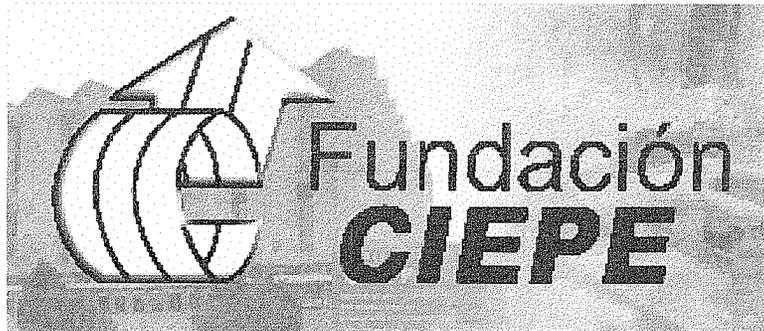
Como requisito parcial para optar al título de

Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos

Autor: Ing. Rocío Jasmin Castro Mora

Tutor: Dr. Pablo García Lugo

Mérida, 2012



Este trabajo fue financiado por la **Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE)**. Proyecto macro *“Identificación, selección y evaluación de cepas (fúngicas y bacterianas) con uso potencial en las industrias alimentaria y farmacéutica”*, Código: PO05AE-06-12-15, coordinado por el Ing. Osmar Morillo.

DEDICATORIA

*A la fuente infinita,
a Mike
a mis padres y hermanos
... que en todo momento me han brindado su apoyo incondicional,
les dedico este trabajo*

www.bdigital.ula.ve

*Todo lo gris es sólo teoría. Lo verde hace que
florezca el árbol dorado de la vida.
Goethe*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo García, por haber direccionado el desarrollo del proyecto, por sus enseñanzas, comprensión, paciencia, confianza y motivación para la realización de este trabajo.

A la Fundación CIEPE y al Ing. Osmar Morillo por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A los profesores Ing. Rubén Gómez e Ing. César Izaguirre, del Laboratorio de Ciencia, Biotecnología en Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería de la Universidad de Los Andes, por la donación de los exoesqueletos de camarón y su colaboración en la extracción de quitina.

Al profesor Balmore Guerrero, por sus explicaciones y aportes a lo largo del proceso.

A mis compañeros de laboratorio: Lic. Adriana Álvarez, Lic. Sonia Morales, Lic. Yary Guerrero, Li. Ana María Bolívar, Lic. Agustina Rojas (Tina), Lic. Mónica Mendoza, Lic. Yzoleth Torres, Lic. Alexis Zambrano, M.V. Datty Rosales, Ing. Chrystian Carrero y Lic. Elwi Machado.

Al técnico de Lab. Jesús Pacheco y la auxiliar de Lab. Flor Mery del laboratorio de Biotecnología de Microorganismos “Sixto David Rojo”.

Al Dr. Gustavo Bruges (Gus), por sus sugerencias, comentarios y buenas vibras siempre.

A mi gran amigo Ricardo Hidalgo, por todo el tiempo y disposición que pacientemente dedico a la revisión de este trabajo y por el apoyo incondicional en todos los momentos de dificultad.

¡¡¡Infinitas gracias!!!

Listado de profesores adscritos al postgrado

Áñez Néstor

Ball María Mercedes

Bianchi Ballesteros Guillermo

Bianchi Pérez Guillermo

Brito Carreño Francisco

Chataing Bernardo

Contreras Froilán

García Amor Enrique

García Lugo Pablo

García Víctor

González Valera Néstor

Gómez Rubén

Guerrero Cárdenas Balmore

Otoniel Rojas Julio

Paolini Gómez Jorge

Yarzabal Andrés

SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD EXTRACELULAR DE DOS AISLADOS DE *Serratia* sp.

RESUMEN

Las quitinasas son enzimas que hidrolizan la quitina en sus componentes oligo y monoméricos. Los quito-oligosacáridos, la glucosamina y los monómeros de N-acetil-D-glucosamina son de gran interés para la industria debido a su amplio rango de funciones biológicas: biomédicas, agrícolas, farmacéuticas y bioconservadoras de alimentos. En el presente trabajo, se realizó la caracterización quitinolítica extracelular de las cepas BIOMI-363706 y SM-BIOMI, descritas molecularmente como *Serratia* sp. Estos dos aislados bacterianos usan la quitina coloidal (QC) como única fuente de carbono y nitrógeno. Fueron inoculados en un medio que contenía 2 % y 5 % de QC; 0,1 % K_2HPO_4 y 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, con pH 7,2; y después de 72 horas de incubación a 37 °C produjeron óptimamente quitinasa extracelular. Usando los extractos crudos, se determinó que las quitinasas de BIOMI-363706 y SM-BIOMI tenían un pH óptimo de 6 y 6,5, respectivamente; una temperatura óptima de 50 °C; y el rango de estabilidad se situó entre 10 °C y 50 °C. No se observó un efecto notorio sobre la actividad quitinasa de ambas enzimas en presencia de cationes divalentes. En cambio, se evidenció que estas enzimas lograron ser activadas utilizando diferentes sustratos, con el siguiente orden de actividad: quitina coloidal > polvo de quitina (<1mm) > glicol-quitina. Por otra parte, tanto BIOMI-363706 como SM-BIOMI presentaron un valor de $V_{m\acute{a}x}$ de 0,015 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ y 0,045 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$; y un K_m de 1,278 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y 1,231 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectivamente. A continuación, se seleccionó a BIOMI-363706 como cepa de trabajo por producir los mayores niveles de quitinasa en el biorreactor. Así, el crecimiento celular de la cepa, con el empleo de QC al 2 % como sustrato, mostró una fase de crecimiento exponencial de hasta 16 h. Además, la producción de quitinasa fue proporcional al crecimiento celular, ya que expresó valores máximos de actividad quitinolítica de 2,043 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ después de 24 h a pH 7,7. Finalmente, se evaluó el acoplamiento de las enzimas de *Serratia* sp. BIOMI-363706 y la desacetilasa de quitina (CDA) de *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 para incrementar la desacetilación de la quitina coloidal. Se utilizaron 8,5 mU de CDA enriquecidas con 76 mU de quitinasa, y se incubaron a 45 °C, con pH 7,0. La velocidad de la CDA sobre la quitina coloidal aumentó $3,9 \pm 0,8$ veces, con lo cual se obtuvieron $6,5 \pm 0,6$ veces más de μmoles de acetato liberadas después de 8 h de reacción. Por lo tanto, en el contexto de los estudios de la desacetilación enzimática, la enzima BIOMI-363706 puede resultar una opción valiosa y ser una ventaja para la maximización de reacciones en escalas industriales que mejoren y potencien la degradación enzimática de la quitina.

Palabras clave: Quitina coloidal, actividad quitinasa, desacetilasa quitinasa, quito-oligosacáridos, N-acetil-D-glucosamina, *Serratia marcescens*.

SELECTION OF CHITINOLYTIC-ENZYMES-PRODUCING MICROORGANISMS AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR ACTIVITY FROM TWO *Serratia* sp. ISOLATES

ABSTRACT

Chitinases are hydrolytic enzymes that break down glycosidic bonds in monomeric and oligomeric components. The chito-oligosaccharides, glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine monomers are of great interest for industry due to its wide range of biological applications in several areas: biomedicine, agriculture, pharmaceuticals and food biopreservations. In this academic work was made the extracellular chitinolytic characterization of the strains BIOMI-363706 and SM-BIOMI described at the molecular level as *Serratia* sp. These two bacterial isolates use colloidal chitin (QC) as unique carbon and nitrogen source. They were inoculated in a medium containing 2% and 5% QC; 0.1% K_2HPO_4 ; 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.2. After 72 hours incubation at 37 ° C, they produced optimally extracellular chitinase. Using the crude extracts it was determined that chitinases BIOMI-363706 and SM-BIOMI had an optimum pH 6 and 6.5, respectively; an optimum temperature of 50 ° C; and the stability range was 10 ° C-50 ° C. Presence of divalent cations did not produce considerable effect on chitinase activity of both enzymes. Instead, it was evident that these enzymes could be activated using different substrates, with the following order of activity: colloidal chitin > chitin powder (<1mm) > glycol-chitin. Moreover, both BIOMI-363706 and SM-BIOMI had a $V_{max} = 0.015 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$ and $0.045 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, $K_m = 1.278$ and $1.231 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectively. Hence BIOMI-363706 was chosen as work-strain for producing higher levels of chitinase in the bioreactor. Thereby the cellular growth of this strain, using 2% QC as substrate, showed an exponential growth phase up to 16 h. Moreover, the production of chitinase was proportional to cell growth, being that it expressed a maximum chitinolytic activity = 2.043 U ml^{-1} after 24 h at pH 7.7. Finally, it was evaluated the coupling of the enzymes BIOMI-363706 from *Serratia* sp and chitin deacetylase (CDA) from *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 to increase the deacetylation of colloidal chitin. It was used 8.5 mU of CDA enriched with 76 mU of chitinase, and they were incubated at 45 ° C, pH 7.0. The CDA velocity, on colloidal chitin, increased 3.9 ± 0.8 times, whereby it was obtained 6.5 ± 0.6 times more μmoles acetate released after 8 hours of reaction. Therefore, in the context of studies on the enzymatic deacetylation, the enzyme BIOMI-363 706 could be a valuable option and be advantageous for maximizing reactions in industrial scales that improve and enhance the enzymatic degradation of chitin.

Keywords: Colloidal chitin, chitinase activity, chitin deacetylase, chito-oligosaccharide, N-acetyl-D-glucosamine, *Serratia marcescens*.

ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	x
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tablas.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Polímeros naturales.....	1
1.2.- Quitina: consideraciones generales.....	2
1.2.1.- Historia.....	2
1.2.2.- Ocurrencia y fuentes.....	3
1.2.3.- Métodos de obtención de la quitina.....	8
1.2.3.1.- Métodos químicos.....	8
1.2.3.2.- Métodos biológicos.....	9
1.2.4.- Estructura cristalina de la quitina.....	14
1.2.5.- Biosíntesis y biodegradación de la quitina.....	15
1.2.6.- Enzimas quitinolíticas.....	18
1.2.7.- Mecanismo catalítico propuesto de las quitinasas.....	26
1.2.8.- Microorganismos quitinolíticos.....	28
1.2.8.1.- <i>Serratia marcescens</i>	29
1.2.9.- Producción de quitinasas.....	30
1.2.10.- Aplicaciones biotecnológicas de las quitinasas.....	30
1.2.11.- Mercado de enzimas en Venezuela.....	35
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
III. HIPÓTESIS.....	38
IV. OBJETIVOS.....	38
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1.- Toma de muestras y aislamiento de microorganismos.....	40
5.2.- Proceso de extracción de la quitina a partir de exoesqueletos de camarón y obtención de polvo de quitina.....	40

5.2.1.- Pretratamiento de la materia prima.....	40
5.2.2.- Tratamiento químico.....	41
5.3.- Preparación de los sustratos especiales.....	42
5.3.1.- Preparación de la quitina coloidal (QC).....	42
5.3.2.- Preparación de glicol-quitina según Trudel y Asselin (1989).....	42
5.4.- Selección inicial de microorganismos productores de quitinasas.....	43
5.4.1.- Caracterización morfológica.....	43
5.5.- Segunda selección de microorganismos con actividad quitinolítica.....	43
5.6.- Selección de las cepas con mayor actividad quitinolítica.....	44
5.6.1.- Preparación del inóculo y el extracto crudo enzimático (ECE) a partir de cultivos bacterianos.....	44
5.6.2.- Determinación de la actividad enzimática.....	44
5.6.3.- Determinación de proteína.....	45
5.7.- Caracterización parcial de la enzima quitinasa producida por las cepas BIOMI-363706 y MF11.....	45
5.7.1.- Efecto del pH, la temperatura y estabilidad térmica en la actividad de la enzima quitinasa.....	45
5.7.2.- Efecto de varios compuestos químicos.....	46
5.7.3.- Actividad en diferentes sustratos.....	47
5.7.4.- Cinética de la enzima en el sustrato quitina coloidal.....	47
5.8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos caracterizados....	47
5.8.1.- Preparación de las muestras y condiciones de electroforesis.....	47
5.8.2.- Fijación, coloración y decoloración.....	48
5.8.3.- Determinación de la masa molecular.....	48
5.9.- Identificación molecular de las cepas aisladas.....	48
5.9.1.- Extracción de ADN genómico de las cepas.....	49
5.9.2.- Detección del ADN genómico por Electroforesis en Gel de Agarosa al 0,8 %.....	49
5.9.3.- Amplificación del gen 16S de ADNr de las cepas por PCR.....	50
5.9.4.- Purificación y secuenciación del ADNr 16S de las cepas.....	51

5.10.- Estudio del crecimiento celular y la producción de la enzima quitinasa secretada por la cepa BIOMI-363706.....	51
5.10.1.- Microorganismo.....	51
5.10.2.- Preparación de inóculos.....	52
5.10.3.- Inóculo para el biofermentador.....	53
5.10.4.- Determinación del crecimiento celular en un biofermentador.....	53
5.10.5.- Determinación de la actividad quitinolítica secretada por la cepa BIOMI-363706 en un biorreactor.....	53
5.10.6.- Determinación de proteína.....	53
5.10.7.- Ensayo de la producción de la enzima quitinolítica secretada por la cepa BIOMI-363706 con el empleo de QC como sustrato en un biorreactor.....	54
5.11.- Acoplamiento.....	55
5.11.1.- Obtención de los extractos enzimáticos.....	55
5.11.1.1.- Microorganismos.....	55
5.11.1.2.- Extracto de quitinasa extracelular.....	56
5.11.1.3.- Extracto de CDA intracelular.....	56
5.11.2.- Ensayos de actividad de las enzimas.....	56
5.11.2.1.- Estimación de la actividad con diferentes sustratos quitinosos.....	56
5.11.3.- Acoplamiento de las enzimas.....	57
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
6.1.- Aislamiento primario de las cepas de trabajo.....	58
6.1.1.- Preparación del medio de cultivo.....	58
6.2.- Evaluación de la producción de quitinasa en placa.....	64
6.2.1.- Selección de las cepas quitinolíticas.....	64
6.3.- Caracterización parcial de la enzima quitinasa producida por las cepas BIOMI-363706 y SM-BIOMI.....	71
6.4.- Evaluación del efecto de los iones metálicos y EDTA sobre la actividad enzimática.....	78
6.5.- Evaluación de la actividad quitinolítica utilizando diferentes sustratos	

como quitina en polvo, quitina coloidal, glicol quitina.....	80
6.6.- Estudio del K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ de las quitinasas en la preparaci3n cruda, utilizando quitina coloidal como sustrato.....	83
6.7.- Determinaci3n del peso molecular de los extractos caracterizados mediante electroforesis SDS-PAGE.....	86
6.8.- Identificaci3n de las cepas quitinol3ticas hasta nivel de g3nero, siguiendo criterios morfol3gicos, bioqu3micos y mediante secuenciamiento del ADNr.....	88
6.9.- Estudio escala de laboratorio del crecimiento celular y la producci3n de quitinasa secretada por la cepa BIOMI-363706 en un biorreactor de 6 litros.....	91
6.10.- Acoplamiento de la enzima BIOMI-363706 y una desacetilasa de quitina f3ngica para incrementar la desacetilaci3n enzim3tica de la quitina coloidal.....	92
VII. CONCLUSIONES.....	97
VIII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	99
IX. ANEXOS.....	101
X. REFERENCIAS.....	111

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los polímeros naturales de uso más generalizado.....	1
Figura 2. Relación estructural de la quitina (b) con el quitosano (c) y la celulosa (a).....	5
Figura 3. Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano.....	7
Figura 4. Representación esquemática del método empleado para la preparación de quitina y quitosano a partir de materia prima.....	13
Figura 5. Disposición molecular de las cadenas poliméricas dentro de las diferentes quitinas.....	15
Figura 6. Esquema de las rutas de novo y rescate para la biosíntesis de la quitina.....	16
Figura 7. Modelo general de la degradación enzimática de la quitina hasta N-acetil-D-glucosamina.....	22
Figura 8. Mecanismo catalítico de las quitinasas de las familias 18 y 19.....	27
Figura 9. Condiciones de ciclado de la PCR.....	51
Figura 10. Biorreactor Modular Bioflo 110 M12730054.....	54
Figura 11. Vista frontal de la interconexión de los módulos de control de nivel: dO ₂ (1) y pH (2), y regulador de la energía con rotámetro (3).....	55
Figura 12. Aspecto físico de la quitina en hojuelas secas (1) y polvo de quitina seca de un tamaño de partícula igual o inferior a 1 mm de diámetro (2).....	63
Figura 13. Aspecto físico de la quitina coloidal desmineralizada y desproteínizada.....	63
Figura 14. Visualización de la actividad quitinolítica extracelular semicuantitativa, y la diferencia en el diámetro de las colonias, y el crecimiento en placas que contienen quitina coloidal al 2 % y 5 %.....	64
Figura 15. Visualización del crecimiento en placas que contienen sólo quitina coloidal al 5 %, la hidrólisis de quitina coloidal y la diferencia en el diámetro de las colonias.....	66
Figura 16. Aspecto macroscópico del extracto crudo enzimático de las cepas: MF4 ₂ (1) y control SM-BIOMI (2).....	69
Figura 17. Cuantificación de la actividad enzimática extracelular en el extracto crudo,	69

ensayada de acuerdo con el método colorimétrico.....	
Figura 18. Fermentación de las cepas para determinar de manera cuantitativa la capacidad quitinolítica.....	69
Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de BIOMI-363706.....	71
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de BIOMI-363706.....	72
Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI.....	72
Figura 22. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI.....	73
Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI.....	76
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de BIOMI-363706.....	76
Figura 25. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica del extracto crudo de BIOMI-363706 a diferentes gradientes de temperatura y con un pH 6,0.....	77
Figura 26. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica del extracto crudo de SM-BIOMI a diferentes gradientes de temperatura y con un pH 6,5.....	77
Figura 27. Especificidad en diversos sustratos de la quitinasa de BIOMI-363706.....	82
Figura 28. Especificidad en diversos sustratos de la quitinasa de SM-BIOMI.....	83
Figura 29. Gel SDS-PAGE al 12 %, bajo condiciones desnaturalizantes, de BIOMI-363706.....	87
Figura 30. Gel de agarosa al 0,8 % que muestran el ADN genómico de las cepas.....	89
Figura 31. Gel de agarosa al 2 % que muestra los resultados de amplificación del gen 16S del ADNr de las cepas.....	89
Figura 32. Curva de crecimiento y producción de enzima quitinasa secretada por BIOMI-363706 en medio mínimo.....	92
Figura 33. Curvas de actividad de la CDA de <i>Mucor</i> sp. BIOMI-CIEPE-01 (a) y <i>Mucor</i> sp. BIOMI-00-01 (b) en el tiempo, con enriquecimiento y sin él, de quitinasa de <i>Serratia</i> sp. BIOMI-363706.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. El papel de las quitinasas en diferentes Phyla.....	19
Tabla 2. Las propiedades fisiológicas de quitinasas purificadas a partir de fuentes microbianas.....	25
Tabla 3. Fuentes de las quitinasas y algunas propiedades básicas.....	28
Tabla 4. Procedencia de las cepas aisladas y su codificación asignada.....	59
Tabla 5. Selección primaria, características macromorfológicas y morfología microscópica de las cepas en estudio por su actividad quitinolítica extracelular semicuantitativa.....	66
Tabla 6. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática y específica.....	70
Tabla 7. Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI y BIOMI-363706.....	78
Tabla 8. Parámetros cinéticos de la quitinasa BIOMI-363706 sobre el sustrato quitina coloidal.....	84
Tabla 9. Análisis de las secuencias del ADNr 16S e identificación de las cepas.....	90
Tabla 10. Efectos de la actividad CDA de los extractos, con el acoplamiento de la actividad quitinasa bacteriana y sin él, sobre la desacetilación de QC.....	95

I. INTRODUCCIÓN

1.1.- Polímeros naturales

Los polímeros naturales, procedentes de las plantas y los animales, han sido utilizados a lo largo de miles de años, pero hace apenas un siglo fueron reconocidas sus singulares propiedades. Entre estos materiales se incluyen la lana, el caucho, la seda, la madera, las proteínas, los polisacáridos, los polinucleótidos, las enzimas, y otros. Sus ventajas es que son más biocompatibles, se obtienen fácilmente, además de ser modificables químicamente (Ratner, 1996). En la Figura 1 se describe la clasificación de estos polímeros basada en su estructura química.

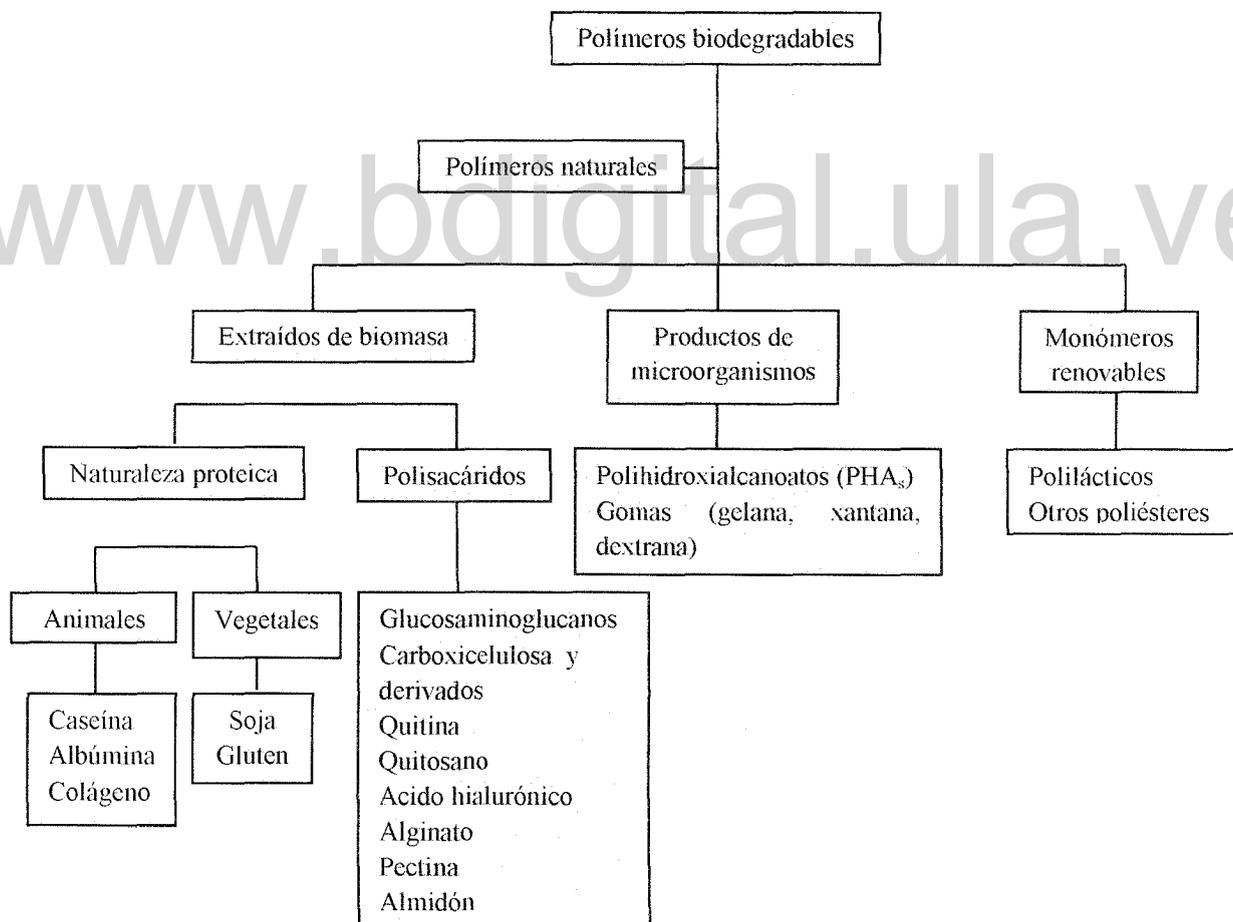


Figura 1. Clasificación de los polímeros naturales de uso más generalizado (Gallur, 2010).

La mayoría de los hidratos de carbono presentes en la naturaleza se produce en forma de polisacáridos, los cuales son una clase de biopolímeros formados por la unión de una gran cantidad de monosacáridos —más de 20— que, a través de enlaces glucosídicos establecidos entre el grupo hidroxilo (OH) presente en cada unidad monosacáridica, tienen la habilidad de formar biopolímeros lineales o ramificados. Desde el punto de vista funcional, encontramos polisacáridos de reserva como el almidón, el glucógeno y los dextranos, y polisacáridos estructurales como la celulosa, la quitina y los glicosaminoglicanos (Nishinari y Takahashi, 2003; Nelson y Cox, 1995).

En los últimos años, la quitina y sus derivados, como el quitosano y los quitooligómeros, han pasado a ser polímeros de gran aplicabilidad en los más diversos campos de la actividad humana: han sido empleados con éxito en la industria farmacéutica, cosmética, la agricultura, en aplicaciones biomédicas, biotecnológicas, en la industria de alimentos y bebidas, en diferentes procesos industriales para el tratamiento de aguas residuales y en procesos de purificación de agua potable, en la fabricación de papel y en la industria textil, entre otros muchos (Abdou *y col.*, 2008). En la actualidad, numerosos estudios han centrado su atención en el desarrollo de materiales basados en estos biopolímeros debido a su actividad biológica, a su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y a su baja toxicidad, además de ser naturalmente abundantes y renovables (Singla y Chawla, 2001; Kumar, 2000). Tales características, conjuntamente con la posibilidad de modificar sus propiedades físico-químicas mediante rutas sintéticas, siguen estimulando la investigación de estos polisacáridos naturales. A continuación, dedicaremos un apartado a los aspectos y virtudes principales de la quitina, la cual es la que nos ocupa en este estudio, y el quitosano.

1.2.- Quitina: consideraciones generales

1.2.1.- Historia

El primer científico que consiguió describir correctamente la estructura química de la quitina fue el conocido químico suizo Albert Hofmann, quien recibió una distinción en su tesis doctoral por esta investigación en el año 1930; no obstante, los principios básicos de su existencia y su

aislamiento datan desde el inicio del siglo XIX, cuando en el año 1811 Henri Braconnot aisló una fracción que llamó «fungina» de las membranas celulares de hongos superiores en el momento en que las trató en caliente con álcali diluido, y notó la producción de amoníaco a través de la destilación con hidróxido de potasio y la generación de ácido acético por su degradación con ácido sulfúrico (Tokura y Tamura, 2007). Señaló que los hongos tratados eran significativamente distintos de aquellos conocidos por hallarse en plantas. Más tarde, en 1823, Odier encontró una sustancia similar en insectos y la nombró «quitina» —un vocablo que proviene del griego y significa cubierta o envoltura—. Posteriormente, sugirió que era el material base del exoesqueleto de todos los insectos y, tal vez, de los arácnidos. En 1843, Payen generó una discusión sobre la diferencia entre la celulosa, como material de soporte de las plantas, y la quitina en levadura en gemación. En el mismo año, Lassaingne aisló material quitinoso del exoesqueleto de gusanos de seda —*Bombyx mori*— por medio de un tratamiento con hidróxido de potasio caliente y demostró la presencia de nitrógeno en la quitina. Años después, se repitieron estudios en cuanto a la preparación de materiales similares a partir de varios exoesqueletos de insectos y a través del tratamiento con hidróxido de potasio e hipoclorito de potasio. En 1859, el profesor Rouget observó que, tratando quitina con hidróxido de sodio concentrado, obtenía un nuevo producto, al cual denominó «quitina modificada», y que era soluble en ácidos orgánicos. Pero no es hasta 1894 cuando Hoppe-Seyler sometió la quitina a reflujo a una temperatura de 180 °C en hidróxido de potasio y observó que el producto que se formaba era bastante soluble en ácido acético y clorhídrico, y lo denominó quitosano. Una identificación clara de la quitina, en lo que se refiere a estar compuesta por glucosamina y ácido acético, fue realizada por Ledderhase. De ahí que Glison, en 1894, reportó la confirmación de la glucosamina (Pastor e Higuera, 2004; Tokura y Tamura, 2007).

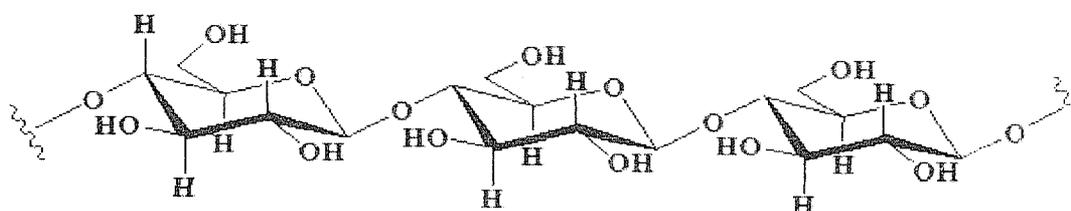
1.2.2.- Ocurrencia y fuentes

La ocurrencia y la distribución de la quitina fueron reportadas por primera vez por Von Wisselingh en 1898. En el año 1931, Rammelberg, a partir de hongos y conchas de cangrejos, confirmó la identidad del polisacárido sobre la base de la naturaleza de productos químicos y bacteriales de descomposición, y mediante la aplicación de un análisis elemental y la reactividad química. Posteriormente, en 1937, Zobell detectó la presencia del compuesto en algunas

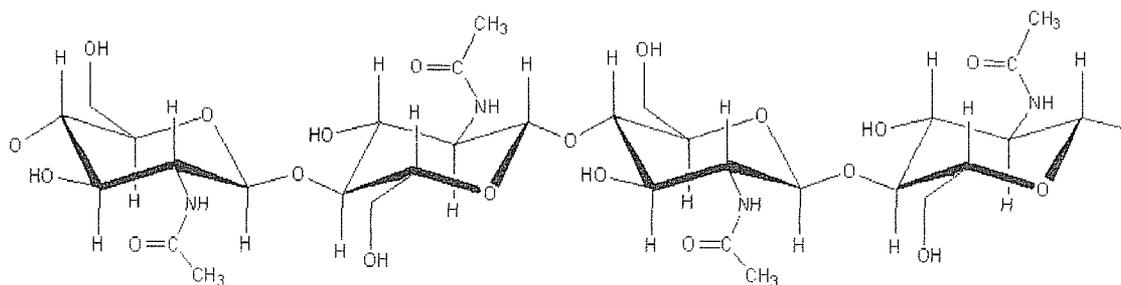
bacterias. Finalmente, Purchase y Braun, en 1946, proponen su estructura química como la de un polisacárido de N-acetilglucosamina (Tokura y Tamura, 2007).

La quitina [$(C_8H_{13}NO_5)_n$] está ampliamente distribuida en la naturaleza, particularmente como un polisacárido estructural de las paredes celulares de algunos hongos (ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, con excepción de los oomicetos), en un porcentaje que fluctúa entre 22 % y 44 % (Mukherjee y Sen, 2006). Además, se sabe que las paredes celulares de *Mucoraceae* tienen quitosano, aparte de quitina (Herrera-Ruiz, 1990; Pastor e Higuera, 2004; Dahiya y col., 2006). Es el componente orgánico más abundante de numerosos organismos vivos, ya que se encuentra asociado a diversas proteínas en la conformación esquelética, en la que desempeña un importante papel estructural, de artrópodos, anélidos, braquiópodos; en la concha exterior de crustáceos y moluscos; y es menos abundante en los nematodos y celenterados. Está presente también en algas, como las diatomeas y los crisoflagelados. Entre los protozoos, algunos ciliados utilizan el polisacárido para construir estructuras protectoras —lorigas— y variadas amebas lo emplean para formar quistes. Sin embargo, la quitina no ha sido detectada en plantas superiores, vertebrados y procariotas (Herrera-Ruiz, 1990; Flach y col., 1992; Nuero, 1995; Fenice y col., 1996; Cottrell y col., 1999; Nava-Arenas, 2009).

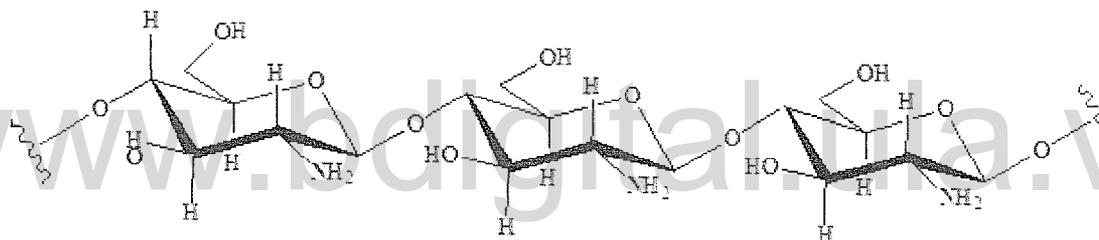
Este biopolímero es uno de los más abundantes después de la celulosa (Roberts, 2006), pero posee una mayor tasa de recambio que esta última; no obstante, ambas constituyen importantes recursos renovables producidos por síntesis biológica, que comparten gran semejanza tanto en su función biológica como en su estructura. A diferencia de la celulosa, la quitina puede ser una fuente de nitrógeno, así como de carbono —C: N = 8:1— (Struszczyk, 2006). Químicamente hablando, la diferencia estructural entre ambos polímeros se encuentra en los sustituyentes del carbono dos del residuo de β -D-glucosa, en la que la celulosa contiene un grupo hidroxilo secundario, mientras que la quitina carga un grupo acetamida. Esto le permite un incremento de las interacciones entre las fibras, ya que son más fuertes debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos acetamídicos de las fibras apiladas unas sobre otras, lo que da origen a una asociación más rígida e inerte que la observada en la celulosa (Peniche, 2006; King y col., 2007). La similitud estructural existente entre la quitina, la celulosa y el quitosano se muestra en la Figura 2.



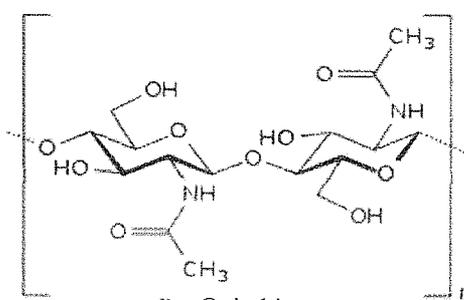
a) Celulosa



b) Quitina (cadenas de N-acetilglucosamina)



c) Quitosano (cadenas de N-acetilglucosamina desacetilada)



d) Quitobiosa

Figura 2. Relación estructural de la quitina (b) con el quitosano (c) y la celulosa (a). Puede observarse que la diferencia entre los tres polisacáridos está en los radicales unidos al carbono dos de la hexosa. En (d) se muestra la unidad estructural mínima (quitobiosa), que se repite sucesivamente en la molécula de quitina (Nava-Arenas, 2009).

La quitina es un material ligero, no tóxico, biodegradable, biocompatible, altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno intermoleculares que presenta su estructura; se disuelve en N,N-dimetil acetamida, hexafluoracetona o hexafluor 2-propanol (Pastor e Higuera, 2004). Tiene una apariencia blanca, en forma de polvo o copos, de naturaleza dura e inflexible, parcialmente cristalina e inodora; y destaca su composición química, ya que es un polisacárido nitrogenado: en su estructura, contiene 6-7 % de nitrógeno y en su forma desacetilada, 7-9,5 % de nitrógeno (Becerra *y col.*, 2011). Se compone de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa, conectadas covalentemente por enlaces glicosídicos del tipo β -(1,4) para formar una cadena lineal. Algunos de los residuos se encuentran desacetilados (Figura 3). Incluso se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación (DA) de 0,66, lo que significa que una de cada tres de sus unidades se encuentra desacetilada. En efecto, cuando sus grupos amino pueden estar totalmente acetilados, el polímero produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como «quitano»; sin embargo, cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado y a temperaturas superiores a 60 °C y se logra eliminar al menos 50 % de sus grupos acetilo, se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades estructurales β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa (GlcNAc) y β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa (GlcN), enlazadas por uniones glicosídicas β -(1,4), aunque se hallan constituidas fundamentalmente por glucosamina, en vez de acetil-glucosamina. De ahí que su relación dependa de las condiciones de reacción y que genere, como es obvio, un material con distintas propiedades y diferentes pesos moleculares (50 KDa a 2.000 KDa) denominado «quitosano» —también llamado quitosana— (Banks *y col.*, 2005; Peniche, 2006; Lárez, 2006; Khoushab y Yamabhai, 2010).

A pesar de que en su estructura química ambos polisacáridos son similares, los grupos amino libres del quitosano le confieren características y propiedades diferentes, ya que, con pH ácido, se comporta como un polielectrolito. Es un compuesto biodegradable, biocompatible, no tóxico para animales, soluble en soluciones ácidas y, además, de más fácil tratamiento que la quitina (Tsigos *y col.*, 2000). Igualmente, posee excelentes propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivíricas, emulsionantes, filmogénicas, absorbentes de grasas, adsorbentes de metales contaminantes, entre otras. Esto lo convierte en un biomaterial atractivo de gran utilidad por sus más de 200

aplicaciones biotecnológicas en distintos campos de la industria, como la biomedicina, agricultura, cosmética, farmacéutica y en el tratamiento de aguas (Abdou y col., 2008).

La distribución del quitosano en la naturaleza es muy limitada. Sin embargo, es un constituyente importante de las paredes celulares de algunos hongos como *Mucor*, *Absidia*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus oryzae*, entre otros. Tales especies han mostrado ser una fuente de quitosano barata y de fácil obtención, a partir de procesos de fermentación para la producción de biomasa celular (Becerra y col., 2011).

Asimismo, es producido tras la biosíntesis de la quitina en el alga verde *Chlorella* sp., en levaduras y protozoarios, así como en cutículas de insectos y hongos —principalmente, de la clase zigomicetos— por la acción de la enzima desacetilasa de quitina, que se puede encontrar tanto dentro como fuera de las células. El grado de desacetilación del quitosano presente en estos hongos puede ser tan bajo como el 10 %. Además, es susceptible de la degradación enzimática por proteínas de diferentes fuentes, entre ellas las enzimas no específicas, como la lisozima, quitinasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas y glucanasas; y las enzimas específicas, como las quitosanasas. (Herrera-Ruiz, 1990; Matsumoto y col., 1991; Mitsutomi y col., 1990; Peral y Gartzia, 2001; Banks y col., 2005; Nava-Arenas, 2009; Castañeda y col., 2011). De modo industrial, el quitosano se puede producir por desacetilación química de la quitina y sus derivados (Lárez, 2006), o por desacetilación enzimática de los derivados hidrosolubles (Win y Stevens, 2001).

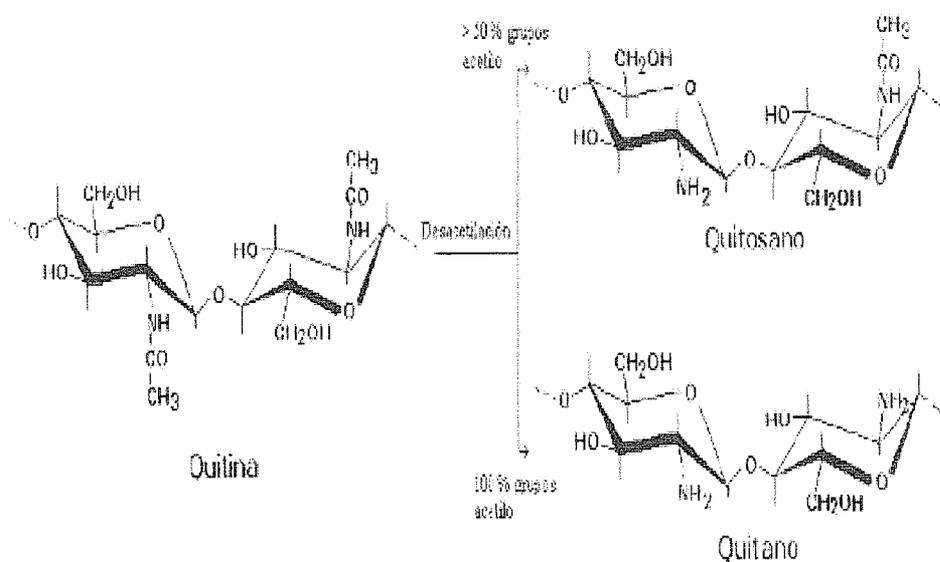


Figura 3. Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano (Lárez, 2006).

1.2.3.- Métodos de obtención de la quitina

En la actualidad, las principales fuentes comerciales para la producción de este biopolímero son los desechos generados por el procesamiento industrial de diversos tipos de crustáceos y moluscos (camarones, langostas, langostinos, cangrejos, krill y calamares), debido a la facilidad de su recolección y por su abundancia y contenido de quitina; asimismo, para aminorar su alto efecto contaminante. Para el año 2004, se ha estimado una producción total de desechos quitinosos de 1.440.000 toneladas/año, de las cuales, aproximadamente, 170.000 toneladas de residuos quitinosos sólidos provienen de la industria mundial del pescado. Si se trataran todas ellas, se calcula en más de 25.000 las toneladas de quitina que se podrían recuperar (Goycolea y col., 2004).

La composición química de los desechos quitinosos varía con la especie biológica y la época del año en proporciones muy amplias para los distintos constituyentes. La composición de los crustáceos en base seca es: proteínas (13-58 %), sales de calcio —fosfato de calcio y carbonato de calcio— (20-72 %), pequeñas cantidades de lípidos (0,8-12,0 %) y quitina (14-35 %) (Ramírez y col., 2010). Estos compuestos se encuentran estrechamente asociados y representan alrededor del 90 % del peso seco total del caparazón (Rødde y col., 2008). Por ello, se han utilizado varios métodos de producción de quitina a partir de estos residuos, basados en técnicas químicas o biológicas.

1.2.3.1.- Métodos químicos. Los métodos convencionales de producción de quitina a partir de residuos de la industria camaronera implican el uso de álcalis fuertes para solubilizar las proteínas, y ácidos para disolver el carbonato de calcio. Si bien ofrecen una posibilidad de desvío de contaminantes, utilizan una cantidad de materiales y energía que hacen del proceso, en su totalidad, poco sustentable, ecológicamente nocivo y, por ende, una fuente de contaminación, ya que suscita problemas de eliminación de residuos corrosivos, cuya solución implica neutralizar y desintoxicar las aguas residuales descargadas. Además, causa la destrucción de proteínas y la despolimerización de la quitina debido a las condiciones severas del tratamiento; por lo tanto, se reduce la calidad de la quitina y, a su vez, disminuye el valor del líquido desproteinizado por la presencia del hidróxido de sodio (Shirai y col., 2001; Majtán y col., 2007; Xu y col., 2008). Es entonces de vital importancia la optimización de la extracción de la quitina para minimizar su

degradación y, al mismo tiempo, bajar la cantidad de impurezas hasta un nivel satisfactorio para ciertas aplicaciones específicas (Rødde y col., 2008).

1.2.3.2.- Métodos biológicos. Como alternativa a los métodos químicos, se han empleado técnicas biológicas y enzimáticas, que permiten recuperar productos y minimizan, aparentemente, la degradación de la quitina, aunque los rendimientos suelen ser bajos. La degradación enzimática es totalmente compatible con el ambiente y es segura para los operadores, además conduce a obtener un producto uniforme en sus propiedades físicas y químicas, por consiguiente, son de mayor utilidad en las áreas farmacéuticas biomédicas e industriales (Martinou y col., 1998)

En la actualidad se investigan tratamientos enzimáticos como una alternativa promisorio; en efecto, se han reportado procesos que utilizan extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas, pero aún sin la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico y los procesos de desacetilación enzimática de carácter industrial (Peniche, 2006). La papaína, la pepsina, la tripsina y la pronasa se han reportado para desproteínización. También se ha recurrido, con este fin, al uso de microorganismos proteolíticos con actividad no quitinolítica, como *Pseudomonas maltophilia*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* y *Aspergillus oryzae*. Diversos estudios han demostrado que el tratamiento de los desechos con enzimas proteolíticas facilita la extracción de carotenoproteínas y astaxantinas (Matsumoto, 2006; Goycolea y col., 2004).

Varios autores (Goycolea y col., 2004; Peniche, 2006) coinciden en que los procesos de obtención de la quitina son desarrollados comúnmente mediante las siguientes operaciones básicas:

1. Acondicionamiento de la materia prima. Consiste en el lavado con agua destilada, cocción de los caparzones por procesarse y separación de la masa que pudiera haber quedado adherida a ellos. Posteriormente, se procede a su molienda hasta obtener el tamaño de partículas adecuado para la extracción.

2. Desproteínización (separación de la proteína). Puede ser química o enzimática. En el proceso químico, los exoesqueletos de los crustáceos son tratados, normalmente, con soluciones

de NaOH (1-10 %) a temperaturas que van desde los 65 °C hasta los 100 °C, y durante un periodo de 1 h a 24 h. El proceso enzimático consiste en la digestión enzimática o fermentación con bacterias proteolíticas con actividad no quitinolítica; por ejemplo, *Pseudomonas maltophilia*.

Otra operación que se realiza en el proceso de la extracción de proteínas es el ensilado, el cual consiste en almacenar anaeróbicamente materiales de origen biológico. La mayoría de éstos son susceptibles de descomposición por microorganismos aeróbicos debido a su alto contenido de humedad y composición química. De ahí que el ensilado de residuos de crustáceos y una producción de ácido láctico *in situ* por bacterias lácticas pertenecientes a la microflora natural o como cultivos iniciadores inducen la licuefacción del residuo semisólido, y se produce una disminución en el pH, así como la activación de proteasas que desproteinizan los residuos (Shirai, 1999).

Un efecto secundario del ensilado es la producción de ácido láctico por la fermentación de carbohidratos, lo que produce una desmineralización de los residuos y una precipitación parcial de los iones de calcio, como lactato de calcio (Xu *y col.*, 2008; Gimeno *y col.*, 2007). La fermentación del residuo de camarón resulta en un extracto rico en proteínas, minerales y carotenoides (especialmente, astaxantina), con una fracción sólida rica en quitina. Sin embargo, para producir una quitina de calidad promedio, la proteína y los minerales residuales de la quitina cruda deben ser removidos mediante tratamientos suaves con álcalis y ácidos, ya que no se consigue la eliminación de toda la proteína. En cuanto a la fracción líquida, puede ser utilizada como suplemento de proteínas y minerales para consumo humano o alimentación animal (Shirai *y col.*, 2001; Cira *y col.*, 2002; Bhaskar *y col.*, 2006; Sini *y col.*, 2007). Por sus características, los ensilados proporcionan una fuente rica de quitina que favorece la producción de quitinasas.

3. Desmineralización (eliminación de la materia inorgánica). La eliminación del carbonato de calcio se realiza por tratamiento ácido con soluciones diluidas de HCl, aunque también se han utilizado otros ácidos, como H₂SO₃, HNO₃, CH₃COOH, HCOOH. El tiempo de tratamiento puede variar desde media hora hasta varios días, según los métodos de preparación desarrollados a temperatura ambiente. Un tratamiento alternativo para disminuir la degradación

consiste en el empleo del agente acomplejante EDTA. Al concluir la operación, se realiza el lavado de la quitina.

4. Decoloración de la quitina obtenida (separación de los pigmentos lipídicos carotenoides). Los exoesqueletos de los crustáceos contienen pigmentos que pueden ser recuperados, ya que poseen un alto valor comercial. La mayor parte de éstos son la astacina, la astaxantina, la cantaxantina, la luteína y el β -caroteno. Tras la desmineralización con tratamientos ácidos, estos pigmentos pueden ser separados mediante extracciones con etanol, éter, acetona y cloroformo. El empleo de ácido acético al 50 %, en caliente, puede desmineralizar las cáscaras y extraer los carotenoides al mismo tiempo. Otra opción para realizar la decoloración sería emplear agentes blanqueadores como H_2O_2 al 0,5-3 % o $NaClO$ al 0,32 % a temperatura ambiente, aunque debe tenerse presente que también suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el biopolímero. En último lugar, una vez obtenida, la quitina se deja secar a temperatura ambiente, con circulación de aire caliente u otro tratamiento. Seguidamente, se muele para lograr un tamaño de partícula uniforme (<1 mm).

5. Obtención del quitosano. El quitosano se puede producir por desacetilación química de la quitina y sus derivados (Lárez, 2006), o por desacetilación enzimática de derivados hidrosolubles (Win y Stevens, 2001). El proceso químico-industrial se puede llevar a cabo de dos maneras:

- a. La desacetilación homogénea, que se inicia con un pretratamiento de hinchamiento y la eventual disolución completa de la quitina en frío (~ 0 °C) mediante la utilización de una relación de quitina a $NaOH$ (p/p) de 1:10. Luego, se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la del ambiente durante periodos largos de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y que el ataque a los grupos amida sea más uniforme.
- b. La desacetilación heterogénea, que se lleva a cabo, en algunos casos, en soluciones acuosas concentradas de bases como $NaOH$ o KOH , bajo condiciones severas (100-160 °C). La reacción se produce, preferentemente, en las regiones amorfas del polímero. Las condiciones en las que se desarrolla la desacetilación

heterogénea pueden reducir la longitud de la cadena; por este motivo, es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino durante cortos periodos de tiempo y aislando el producto en cada etapa (Goycolea y col., 2004). En el proceso, se incluyen lavados periódicos intermitentes con agua.

Otro método para obtener quitosano es la utilización de enzimas. Su principal ventaja, con respecto al químico, es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, lo que le otorga, por consiguiente, una mayor utilidad para aplicaciones biomédicas. La desacetilasa de quitina es una glicoproteína que cataliza la conversión de quitina a quitosano y acetato por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. Fue identificada y parcialmente purificada por primera vez a partir de extractos del hongo *Mucor rouxii*. Se ha demostrado que la acción de esta enzima es muy baja (5-10 %) sobre la quitina sólida, mientras que es significativamente alta (cerca del 90 %) cuando su sustrato son derivados solubles de quitina, que permiten que aumente la accesibilidad de la enzima a los grupos acetilo del polímero, para así retirarlos por medio de un mecanismo de ataque. La limitación de este método es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de la quitina insoluble y, por lo tanto, es necesario un pretratamiento de los sustratos cristalinos de la quitina que favorezca la accesibilidad de los grupos acetamida a la enzima múltiple (Win y Stevens, 2001; Goycolea y col., 2004). En la actualidad se exploran métodos más novedosos para desacetilar la quitina, los que hacen uso de la radiación con microondas o consisten en tratamientos termomecánicos, entre otros (García y Roca, 2008).

En general, el criterio utilizado para distinguir entre la quitina y el quitosano es, evidentemente, la solubilidad de este último en soluciones de ácido diluido. Por tanto, el quitosano no es una entidad química única y definida, sino que designa a una familia de polisacáridos que varían entre sí por su composición y tamaño molecular. Esta variabilidad se asocia, primordialmente, a las condiciones del proceso de obtención. Por todo lo expuesto, las características y aplicaciones del quitosano van a depender, sobre todo, del grado de desacetilación y el tamaño de la cadena polimérica. En consecuencia, se requiere un control estricto de las condiciones de reacción, lo cual es esencial para un proceso de magnitud industrial, ya que es preciso obtener un polímero de cadena larga con el intervalo deseado (Goycolea y col.,

2004; Cardoso, 2007). En la Figura 4 se observa, simplificado, el proceso de obtención de la quitina y el quitosano a partir de la materia prima.

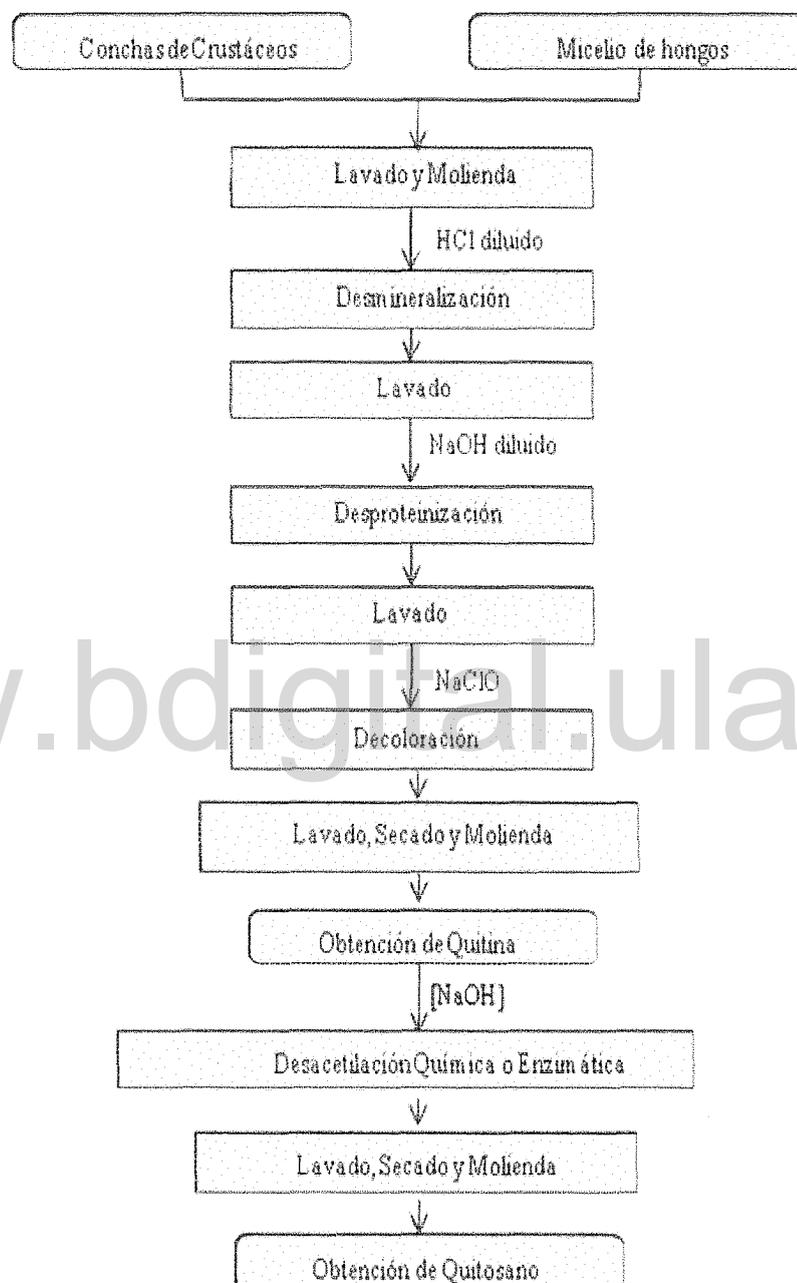


Figura 4. Representación esquemática del método empleado para la preparación de quitina y quitosano a partir de la materia prima (Aranaz y col., 2009).

1.2.4.- Estructura cristalina de la quitina

Estudios de difracción de rayos X revelaron que la quitina se encuentra en tres diferentes formas naturales: alfa, beta y gamma-quitina, las cuales difieren en el arreglo y número de las cadenas moleculares dentro de la estructura cristalina, por el grado de hidratación y el tamaño de sus cadenas poliméricas. Así, en la α -quitina, las cadenas están arregladas en una forma antiparalela, es decir, cada una de ellas está dispuesta en sentido contrario, de modo que se complementan unas con otras de la misma manera que la hélice del ADN; esta disposición antiparalela da lugar a fuertes enlaces de hidrógeno; por consiguiente, hace que sea más estable. Se obtiene, principalmente, de cangrejos y conchas de camarón. La β -quitina, cuyas cadenas son paralelas (como las de la celulosa nativa), se encuentra en la pluma de los calamares. Por su parte, en la γ -quitina, que es la más rara de las tres formas y se encuentra en los capullos de los escarabajos *Ptinus tectus* y *Rhynchaemus fagi*, las cadenas están en una forma mixta. De todas ellas, la α -quitina es la forma más abundante en la naturaleza (crustáceos, hongos). La conversión de la forma β a la forma α es posible mediante tratamientos químicos, mientras que la forma γ -quitina se puede convertir en α -quitina por tratamiento con tiocianato litio (LiSCN). Ambas conversiones son irreversibles (Pastor e Higuera, 2004; Dahiya y col., 2006; Tokura y Tamura, 2007; Khoushab y Yamabhai, 2010). Una representación esquemática de las tres estructuras se muestra en la Figura 5.

No se conocen las razones debido a las cuales la quitina se puede cristalizar, bajo condiciones naturales, en tres formas distintas, pero el fenómeno evidencia varias consecuencias. En primer lugar, las tres tienen propiedades distintas que les permiten acometer funciones diferentes; así, la forma alfa es la más rígida y cumple funciones esqueléticas, como la cutícula de artrópodos, y justifica su asociación con las proteínas esclerotizadas y los carbonatos. En tanto, las otras dos, capaces de hidratarse y, a la vez, ser flexibles, desarrollaron propiedades mecánicas semejantes a las del cartílago. Así pues, el origen de la quitina incide en su cristalinidad, pureza, arreglo de la cadena polimérica, y define sus propiedades (Khoushab y Yamabhai, 2010).

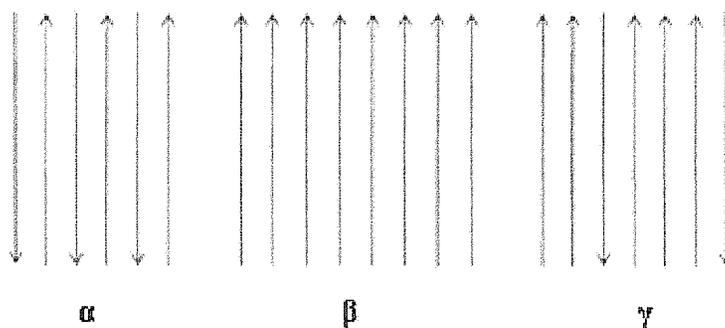


Figura 5. Disposición molecular de las cadenas poliméricas dentro de las diferentes quitinas (Aranaz y col., 2009).

1.2.5.- Biosíntesis y biodegradación de la quitina

El mecanismo de biosíntesis de la quitina ha sido estudiado en detalle en gran variedad de organismos; entre ellos, los hongos, insectos y crustáceos. La enzima que realiza la síntesis se denomina quitín sintetasa (EC 2.4.1.16). Desde un punto de vista bioquímico, la síntesis de la quitina es un proceso relativamente simple: ocurre por la transferencia de un radical glicosilo de un donador, que de forma universal es la Uridina Difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), a un aceptor, que es la cadena naciente del polisacárido. La reacción requiere de un metal divalente; el Mg^{2+} es el más eficiente en casi todos los sistemas (Herrera-Ruiz, 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* han sido identificadas tres enzimas de quitín sintetasa: CS I, CS II y CS III. Éstas son diferentes unas de otras por su función y su actividad catalítica; de hecho, la mayor parte de la quitina es sintetizada por CS III. En cuanto a los hongos, las CS se agrupan en dos familias y cinco clases. El papel de estas CS consiste en usar la UDP-GlcNAc como sustrato para producir fibrillas de quitina en la pared celular. Esto quedó demostrado en un experimento con *Mucor rouxii*. Los insectos poseen dos genes de CS; de igual manera, los nematodos tienen dos genes de CS, que son expresados distintamente. Por lo tanto, parece existir una especialización entre las CS en los diversos organismos, en los que desempeñan funciones diferentes (Tokura y Tamura, 2007; Khoushab y Yamabhai, 2010).

En efecto, para la biosíntesis de la quitina, los artrópodos utilizan varias rutas: la primera es la «ruta de novo», que se inicia a partir de la hidrólisis de la trehalosa en la sangre de los insectos para generar glucosa, que luego, a través de varias etapas intermedias, se convierte en N-

acetilglucosamina-6-fosfato. La segunda es la «ruta de rescate», en la cual se obtiene N-acetilglucosamina (GlcNAc) a través del reciclado de las cutículas de quitina desprendidas por la ecdisis o proceso de muda que ocurre en la ruta biosintética de novo. Si bien el mecanismo de este proceso no se ha mostrado claramente, las cutículas desprendidas son hidrolizadas mediante varias enzimas. En primer lugar, la GlcNAc es hidrolizada en oligosacáridos de GlcNAc por endoquitinasas (EC 3.2.1.14); luego, los oligosacáridos son hidrolizados en GlcNAc mediante exo-N-acetilglucosamidasa-tipo (EC 3.2.1.30), que se suministran después a la ruta de la CS (la ruta de rescate). Por lo tanto, una poca cantidad de aminoazúcares serán liberados al ambiente, siempre y cuando los artrópodos mantengan el metabolismo activo (Tokura y Tamura, 2007). En la Figura 6 se observa el esquema de las rutas de novo y rescate para la biosíntesis de la quitina en los artrópodos.

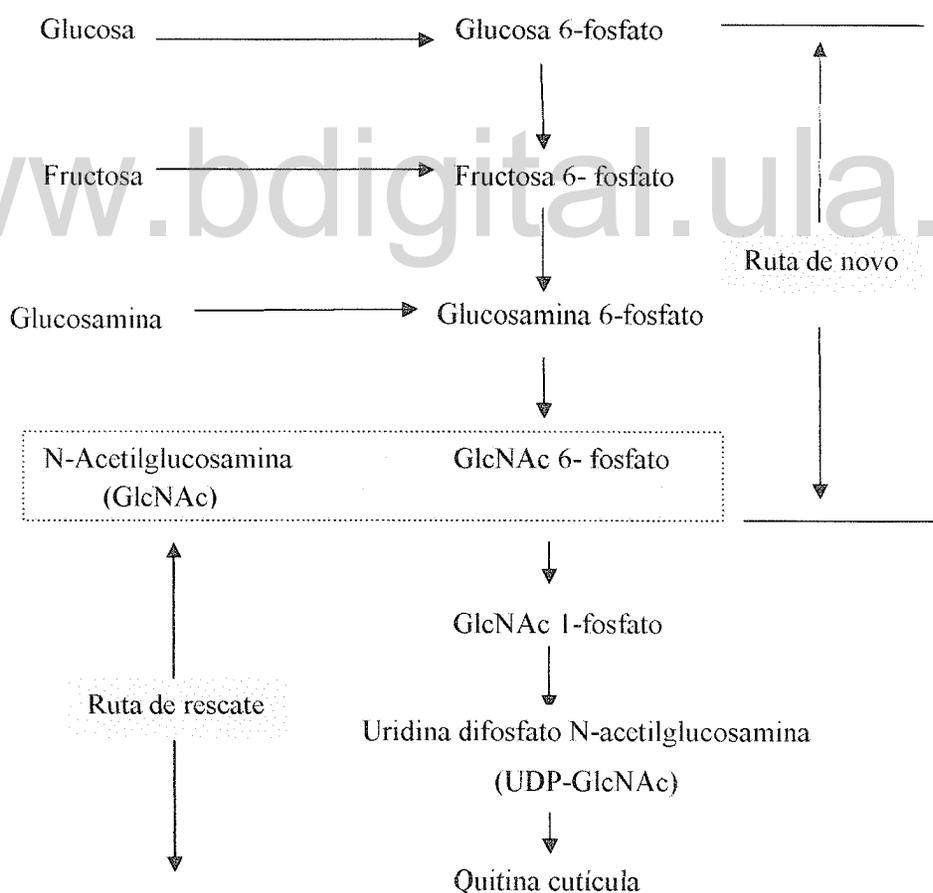


Figura 6. Esquema de las rutas de novo y rescate para la biosíntesis de la quitina en los artrópodos (Tokura y Tamura, 2007).

Las plantas no producen ningún material quitinoso ni poseen quitina en su estructura, lo que ha llevado a la aceptación de que, en ellas, las quitinasas están implicadas en los mecanismos de autodefensa contra el ataque de patógenos. Por ello, estas enzimas, clasificadas como proteínas PR, pueden actuar directamente gracias a sus propiedades antifúngicas, o indirectamente a través de la liberación de quitoooligosacáridos capaces de inducir una amplia gama de respuestas defensivas en las plantas (Gómez *y col.*, 2002; Akimoto-Tomiyama *y col.*, 2003). Se han obtenido numerosas pruebas sobre la capacidad de las quitinasas de plantas y frutos para degradar la pared celular de hongos e inhibir el crecimiento fúngico, especialmente si son combinadas con 1,3-β-glucanasas de clase I (Yun *y col.*, 1996; Fernández-Caballero *y col.*, 2009). Asimismo, se ha detectado la expresión de un gran número de genes de quitinasa, inducidos durante la infección por fitopatógenos, y se ha observado cómo se acumulan alrededor de las paredes celulares de las hifas en los puntos de infección in vivo (Wubben *y col.*, 1992).

Mauch y Staehelin, en 1989, propusieron un modelo acerca de la funcionalidad dual de las quitinasas en la respuesta de defensa de las plantas frente a la colonización por fitopatógenos. Por un lado, las quitinasas secretadas en el medio extracelular están implicadas en las primeras etapas de la infección, durante las cuales liberan oligosacáridos que transfieren información sobre la penetración de la hifa en el espacio intercelular. Posteriormente, estos elicitores (moléculas «señal») se unen a receptores específicos que inducirán respuestas de defensa activas, como la síntesis de quitinasas apoplásticas y vacuolares, nuevas proteínas PR, como osmotina o taumatina, fitoalexinas y otros compuestos (Lorito *y col.*, 1996; Akimoto-Tomiyama *y col.*, 2003; Goñi, 2010). A lo largo de la siguiente etapa de la infección, cuando las enzimas fúngicas digieren la pared celular de la planta y destruyen la célula, las quitinasas y 1,3-β-glucanasas vacuolares entran en acción sobre las hifas invasoras al inhibir de forma directa el crecimiento del hongo. Este papel de las quitinasas vacuolares, especialmente las de la clase I, ha sido confirmado gracias a los resultados de una coevolución existente entre el sitio activo de estas enzimas y la capacidad inhibitoria de proteínas fúngicas (Bishop *y col.*, 2000).

1.2.6.- Enzimas quitinolíticas

El estudio de las quitinasas se ha incrementado entre la comunidad científica durante los últimos años. El interés radica en su gran variedad, su presencia entre una amplia gama de grupos bacterianos y su gran potencial biotecnológico, aplicable a diferentes campos de la investigación, medicina e industria.

Fueron observadas por primera vez por Bernard en 1911, cuando aisló una fracción quitinolítica termoestable y antifúngica difusible a partir de bulbos de orquídeas. Esto fue posteriormente confirmado por Karrer y Hoffman, quienes demostraron la presencia de enzimas quitinolíticas en caracoles (Flach *y col.*, 1992; Felse y Panda, 2000). En un principio, todas las enzimas capaces de catalizar la degradación de la quitina o los quitoooligosacáridos mediante la hidrólisis del enlace 1,4- β -glucosídico entre unidades de N-acetilglucosamina son definidas como enzimas quitinolíticas. En este contexto, las quitinasas (EC 3.2.1.14) son glicosil hidrolasas. En general, el término quitinasa se refiere a un complejo multienzimático cuyas acciones pueden ser armónicas, sinérgicas y consecutivas, ya que actúan sobre el sustrato específico de distintas maneras para liberar N-acetilglucosamina. Las quitinasas son biosintetizadas por una gran variedad de organismos: bacterias, hongos, insectos, plantas, animales e incluso humanos (Flach *y col.*, 1992; Gohel *y col.*, 2006; Khoushab y Yamabhai, 2010). Dependiendo del organismo de origen, las quitinasas presentan diferentes funciones. Sin embargo, algunos otros que no las sintetizan también pueden producir quitinasas, como ocurre con gran variedad de bacterias y plantas superiores. En tal contexto, las funciones fisiológicas de estas enzimas dependen de su fuente (Tabla 1).

Tabla 1. El papel de las quitinasas en diferentes Phyla (Gohel *y col.*, 2006).

Organismo	Papel de las quitinasas	Referencias
Bacterias*	Las quitinasas producidas hidrolizan y mineralizan la quitina presente en la naturaleza, la cual les sirve como fuente de carbono y nitrógeno; además, actúan contra el parasitismo. En efecto, algunas quitinasas de bacterias quitinolíticas son agentes potenciales para el control biológico de enfermedades de plantas causadas por diversos hongos fitopatógenos, pues hidrolizan la quitina presente en la pared celular del hongo. Adicionalmente, las bacterias fitopatógenas también pueden ser controladas por estas enzimas debido a que algunas de ellas presentan actividad lisozimal, lo cual permite la degradación de la pared celular bacteriana. Además, la actividad de la quitinasa desempeña un papel importante en la ecología de muchas bacterias marinas.	Flach <i>y col.</i> (1992), Connell <i>y col.</i> (1998), De la Cruz <i>y col.</i> (1992), Bhattacharya <i>y col.</i> (2007).
Hongos*	Cumplen un papel fisiológico en la división celular, la diferenciación y la nutrición relacionadas con la actividad micoparasítica (por ejemplo, en <i>Trichoderma</i> sp.). También presentan cierta actividad en el desarrollo de los procesos de morfogénesis para el crecimiento normal de las hifas y la ramificación.	Kuranda y Robbins (1991), Gooday <i>y col.</i> (1992), Mellor <i>y col.</i> (1994), Alam <i>y col.</i> (1995), Castañeda <i>y col.</i> (2011).
Plantas	La producción de quitinasas desempeña un papel muy importante en los mecanismos de defensa contra el ataque de muchos patógenos (fúngicos y bacteriales), cuyas paredes celulares son susceptibles de degradación al tener como constituyente estructural a la quitina. Las isoformas específicas pueden actuar en el desarrollo embrionario, la polinización y reproducción sexual.	Schlumbaum <i>y col.</i> (1986), De Jong <i>y col.</i> (1992), Leung (1992), Kim y An (2002), Castañeda <i>y col.</i> (2011).
Insectos y crustáceos	El papel principal de estas enzimas es, primero, modificar las estructuras quitinosas mediante fenómenos de síntesis-degradación, lo que permite la renovación de la cutícula (en diferentes estadios larvarios); y, segundo, actuar en defensa contra los parásitos.	Kramer y Fukamizo (1985), Merzendorfer y Zimoch (2003).
Protozoarios*	La cantidad de quitinasa producida por los parásitos de la malaria es suficiente para penetrar en la matriz peritrófica (que contiene quitina) del intestino medio del mosquito.	Huber <i>y col.</i> (1991), Langer <i>y col.</i> (2002).
Humanos	La actividad de la quitotriosidasa ayuda en la defensa contra las infecciones de tipo nematodal. Por otra parte, su acción enzimática es marcadamente elevada en el suero de los pacientes que sufren desórdenes lisosomales de almacenamiento de lípidos, sarcoidosis y talasemia.	Escott <i>y col.</i> (1996), Choi <i>y col.</i> (2001), Aguilera <i>y col.</i> (2003), Gianfrancesco y Musumeci (2004).

Continúa en la siguiente página

Tabla 1. Continuación de la página anterior

Organismo	Papel de las quitinasas	Referencias
Animales (vertebrados)	Las quitinasas en los vertebrados son secretadas por el páncreas y en la mucosa gástrica de peces, anfibios, reptiles y en algunos pájaros. Muchos vertebrados presentan en la sangre actividad quitinolítica; así, se encuentran quitinasas en sus células rojas y blancas. La actividad quitinolítica en los leucocitos tiene un papel de defensa en la digestión de patógenos de la quitina. En este sentido, en el suero de algunos rumiantes y algunos mamíferos está presente para defensa contra algunos hongos patógenos.	Lundblad <i>y col.</i> (1974), Gooday (1996).
Levaduras	La subunidad- α de la toxina secretada por <i>Kluyveromyces lactis</i> tiene actividad quitinasa, que es requerida posiblemente en la subunidad- γ para poder entrar en la célula sensible. Además, las quitinasas tienen un papel esencial en la separación de las células durante la gemación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cuya quitinasa se utiliza también como antifúngico.	Butler <i>y col.</i> (1991), Kuranda y Robbins (1991), Carstens <i>y col.</i> (2003), Adams (2004).

*Las quitinasas se pueden producir de manera inducida o constitutiva. Sin embargo, casi siempre son de naturaleza inducible y extracelular

En términos generales, las enzimas quitinolíticas pueden ser clasificadas en dos tipos: exo y endoenzimas, lo cual depende principalmente de la naturaleza del sustrato (Shaikh y Deshpande, 1993):

1. Las endoquitinasas (poli- β -1 \rightarrow 4-(2-acetamida-2-deoxi)-D-glucósido glicanohidrolasa; EC 3.2.1.14): hidrolizan la quitina de manera aleatoria en los enlaces glicosídicos internos β -(1-4) y liberan oligosacáridos solubles de baja masa molecular (entre 2 y 6 unidades de GlcNAc), como quitotriosa, quitotetraosa o el dímero diacetilquitobiosa.

2. Las exoquitinasas (EC 3.2.1.52): actúan de manera progresiva por el extremo no reductor de la quitina y liberan unidades de quitobiosa y N-acetilglucosamina.

Las exoquitinasas pueden dividirse en dos subcategorías:

2.1. Quitobiosidasas (EC 3.2.1.30) o Exo-N-diacetil-quitobiohidrolasas (EC 3.2.1.29): catalizan de un modo sucesivo la liberación exclusiva de diacetilquitobiosas desde el extremo no reductor de la molécula de quitina, o la de aquellos quitooligosacáridos mayores de 3 unidades de GlcNAc. Una vía alternativa envuelve la desacetilación de la quitina a quitosano, el cual es finalmente convertido en residuos de glucosamina por la acción de la quitosanasas (EC 3.2.1.32) (Dahiya *y col.*, 2006).

2.2. β -(1,4)-N-acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.96) o N- β -acetilhexosaminidasas (EC 3.2.1.52): hidrolizan la quitina y los productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas desde su extremo no reductor, de manera que generan únicamente monómeros de GlcNAc. La enzima N- β -acetilhexosaminidasa utiliza, con preferencia, a la quitobiosa como sustrato y puede actuar sobre quitotriosa o quitotetraosa. Por otro lado, hay que tener en cuenta que, aunque presentan la capacidad de hidrolizar cadenas de oligosacáridos de diferente tamaño, su velocidad de reacción es mayor frente a mono y disacáridos, y disminuye considerablemente la constante de especificidad al incrementarse la longitud de la cadena.

Es preciso señalar que, en la naturaleza, la acción sinérgica y consecutiva de estas tres clases de enzimas con actividad quitinolítica permite la total degradación de la quitina en monómeros de GlcNAc libres (Patil *y col.*, 2000). Incluso, algunas quitinasas muestran actividad lisozimal (CE 3.2.1.17) correspondiente a la separación de un enlace glicosídico entre el C1 del ácido N-acetilmurámico y el C4 de N-acetilhexosamina en el peptidoglicano bacteriano (Matsumoto, 2006). En la Figura 7 se puede observar la acción específica de las quitinasas para degradar la quitina en sitios particulares.

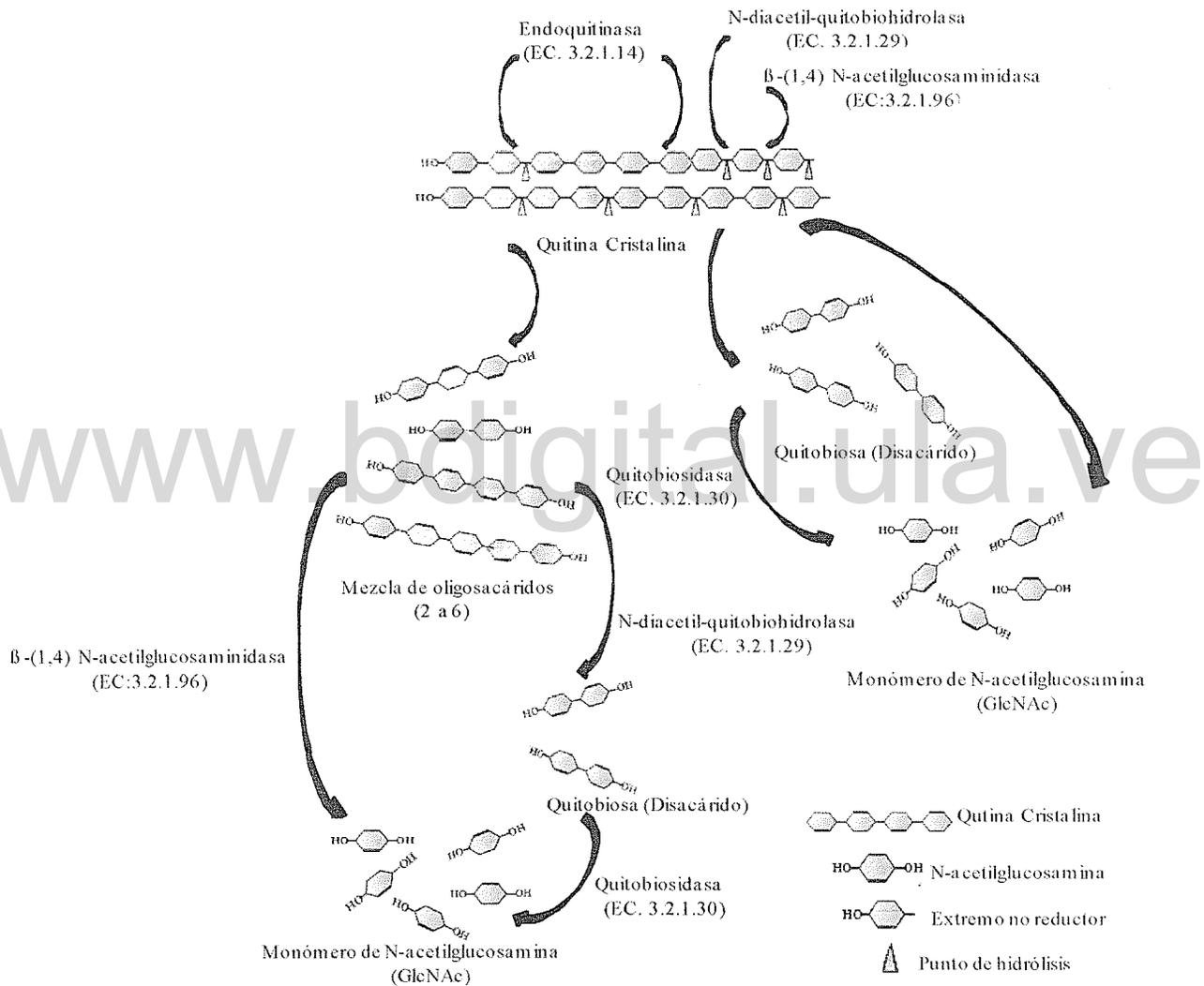


Figura 7. Modelo general de la degradación enzimática de la quitina hasta N-acetil-D-glucosamina. Se produce la acción hidrolítica de las endoquitinasas y exoquitinasas. Las endoquitinasas actúan en los enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4) internos de la quitina y liberan quitooligosacáridos de diferente grado de polimerización (GP). Las exoquitinasas, que actúan por el extremo no reductor de la quitina, liberan unidades de quitobiosas (GP=2) (quitobiosidasas) o N-acetilglucosamina (GlcNAc, GP=1) [β -(1, 4)-N-acetilglucosaminidasas]. Las quitobiasas, al actuar de manera específica sobre dimeros de GlcNAc, liberan el monómero (Modificado por Nava-Arenas, 2009).

De acuerdo con el sistema de las glicosil hidrolasas, que se basa en la similitud de la secuencia de aminoácidos y los dominios catalíticos, las enzimas quitinolíticas se agrupan en las familias 18, 19 y 20 (Henrissat y Bairoch, 1993). De esta manera, la familia 18 (GH18) corresponde a un conjunto de quitinasas ancestrales y es diversa en términos evolutivos: contiene quitinasas de bacterias, hongos, virus, animales y se ha identificado un número relativamente pequeño de quitinasas GH18 procedentes de algunas plantas (clases III y V) (Dahiya *y col.*, 2006). En este sentido, la familia GH18 se divide en dos clases generales: una está asociada a plantas, y se caracteriza por una actividad endoquitinasa cuyos productos son de longitud variable y la otra se relaciona con bacterias y muestra una actividad quitobiosidasa (Andersen *y col.*, 2005; Van Aalten *y col.*, 2001).

La familia 19 (GH19) está compuesta, en su mayoría, de quitinasas de origen vegetal (clases I, II y IV) y algunas quitinasas de *Streptomyces griseus* HUT 6037 —quitinasas C (ChiC)—; éstas fueron las primeras quitinasas bacterianas de la familia 19 descubiertas, capaces de generar la inhibición de la extensión hifal de *Trichoderma reesei* in vitro (Itoh *y col.*, 2003). Hasta hace diez años sólo se había observado la presencia de esta familia en plantas superiores. Sin embargo, los progresos recientes en los proyectos de secuenciación del genoma han revelado su existencia en ciertas bacterias y nematodos (Ueda *y col.*, 2003).

Debido a que no muestran afinidad en la secuencia de aminoácidos, incluso son completamente diferentes en la estructura tridimensional de su módulo catalítico y su mecanismo de catálisis sobre el enlace glucosídico, las quitinasas de las familias 18 y 19 parecen haber evolucionado desde diferentes antepasados (Dahiya *y col.*, 2006). Esto explica el hecho de que las quitinasas de plantas pertenecientes a la familia 18 presentan un plegamiento $(\alpha/\beta)_8$ o barril TIM en su dominio catalítico y utilizan un mecanismo de doble desplazamiento asociado al sustrato. El dominio catalítico de las quitinasas GH19, por su parte, presenta un aspecto compacto, un elevado contenido en hélice α y tres enlaces disulfuro conservados; de este modo, el teórico bolsillo de unión al sustrato estaría compuesto por dos hélices α y una lámina β de tres hebras. Asimismo, se han encontrado ciertas similitudes estructurales con lisozimas y quitosanasas, aunque no compartan homología en la secuencia. En tal sentido, estas semejanzas en el plegamiento llevaron a Monzingo *y col.* (1996) a concluir que las quitinasas GH19 de plantas y

determinadas lisozimas de animales habían surgido de un antepasado común por evolución divergente. La hidrólisis de las quitinasas GH19 implica un mecanismo general ácido-base y un único desplazamiento, el cual provoca la inversión del carbón anomérico (Fukamizo, 2000; Hahn *y col.*, 2000; Kezuka *y col.*, 2004; Ubhayasekera *y col.*, 2009). Las quitinasas de la GH18 hidrolizan enlaces GlcNAc-GlcNAc y GlcNAc-GLcN (glucosamina), mientras que las de la familia 19 hidrolizan GlcNAc-GlcNAc y GlcN-GlcNAc (Matsumoto, 2006).

Acerca de la familia 20, ésta incluye las β -N-acetilhexosaminidasas de bacterias, *Streptomyces* y humanos (Dahiya *y col.*, 2006).

Las quitinasas también se ordenan en clases de acuerdo con su secuencia N-terminal, la localización de la enzima, el pH, el punto isoeléctrico (pI) y el péptido señal. Así, las quitinasas de la Clase I se encuentran en las plantas, mientras que las enzimas de la Clase II están contenidas en las plantas, los hongos y las bacterias. Las quitinasas de la Clase III no mostraron ninguna secuencia similar a las de las enzimas de la Clase I o II. Asimismo, las quitinasas de la Clase IV tienen características similares a las quitinasas de la Clase I; por ejemplo, sus propiedades inmunológicas, aunque son significativamente menores que las de la Clase I. La Clase V, a su vez, se ha detectado en estudios sobre interacciones simbióticas planta-microorganismo (Matsumoto, 2006).

No obstante, las quitinasas bacteriales están claramente separadas en tres subfamilias mayores: ChiA, ChiB y ChiC, basadas en la secuencia de aminoácidos de dominios catalíticos individuales. Así, las quitinasas de la subfamilia A presentan un tercer dominio correspondiente a la inserción de una región plegada $\alpha+\beta$ entre el séptimo y el octavo carril ($\alpha+\beta$)₈. En cambio, ninguna de las quitinasas de las subfamilias B y C tiene esa inserción. La ChiB consta de un dominio catalítico que tiene un pliegue similar al de la ChiA y un dominio de unión de quitina putativa pequeño (ChiBD) en su extremo C-terminal. A pesar de tener los dominios catalíticos con pliegues similares, se considera que las dos quitinasas digieren las cadenas de quitina en la dirección opuesta; es decir, se propone que ChiA degrada la cadena de quitina desde el extremo reductor y ChiB desde el extremo no reductor. Se ha señalado que algunas bacterias quitinolíticas, como *Serratia marcescens*, *Bacillus circulans* WL-12 y *Streptomyces coelicolor* A3, poseen quitinasas

pertenecientes a diferentes subfamilias (Suzuki *y col.*, 2002; Dahiya *y col.*, 2006). Las características de algunas quitinasas son resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2. Las propiedades fisiológicas de quitinasas purificadas a partir de fuentes microbianas.

Microorganismo	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Aplicación	Inhibidores	Referencias
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	5,5	45	La liberación de protoplastos de hongos, producción de GlcNAc y potencial antifúngico.	(NBS)	Dahiya <i>y col.</i> , (2005b)
<i>Enterobacter</i> sp. G-1	7,0	40	n.s.	EDTA, PCMB	Park <i>y col.</i> (1997)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6,0	55	n.s.	Hg ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺	Tang <i>y col.</i> (2001)
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	5,0	50	Potencial antifúngico.	Cu ²⁺ , Na ⁺	Vaidya <i>y col.</i> (2003)
<i>Vibrio alginolyticus</i> TK-22	4,0-9,0	45	Preparación de quitopentosa y quitotriosa.	n.s.	Murao <i>y col.</i> (1992)
<i>Bacillus</i> sp. BG-11	7,5-9,0	45-55	Potencial antifúngico.	Alosamidina, EDTA, Ácido yodoacético	Bhushan y Hoondal (1998)
<i>Bacillus</i> sp. NCTU2	7,0	60	n.s.	n.s.	Wen <i>y col.</i> (2002)
<i>Bacillus</i> sp. 13.26	7,0-8,0	60	n.s.		Yuli <i>y col.</i> (2004)
<i>Serratia marcescens</i> QMB1466	4,0-7,0	30	n.s.	n.s.	Roberts y Cabib (1982)
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	5,4	55	Potencial antifúngico.	Co ²⁺ , Cu ²⁺	Frankowski <i>y col.</i> (2001)

n.s.: No especificado.

NBS: N-Bromosuccinimida.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

PCMB: Ácido p-Cloromercuribenzoico.

1.2.7.- Mecanismo catalítico propuesto de las quitinasas

Hay dos vías generales para la hidrólisis glicosil ácido-catalizada, que se resumen en lo siguiente:

1. Retención de la estereoquímica del oxígeno anomérico en C-1, relativo a la configuración inicial.
2. Inversión de la estereoquímica.

Un ejemplo del mecanismo de retención es la lisozima de la clara del huevo de gallina. El mecanismo es conocido por proceder como sigue: el β -(1,4) oxígeno glicosídico es primero protonado conduciendo a una intermediación de un ion oxocarbenio, de modo que un segundo carboxilato lo estabiliza —ambos procesos se efectúan mediante interacciones covalentes o electrostáticas—. El ataque nucleofílico del agua rinde los productos de la hidrólisis, provocando la retención de la configuración anomérica del nuevo extremo reductor formado. Esto es comúnmente referido como el mecanismo de hidrólisis de doble desplazamiento asociado al sustrato, el cual requiere la presencia de un residuo ácido en el centro activo —generalmente, ácido glutámico (Glu)— y provoca la retención de la configuración anomérica del nuevo extremo reductor formado (Dahiya *y col.*, 2006). Este mecanismo se propone para las quitinasas de la familia 18, (Figura 8a).

Aunque la estructura mostrada por los rayos X de la familia 19, revela un pliegue similar a la lisozima, lo que sugiere un mecanismo de doble desplazamiento, los productos de la hidrólisis de dos quitinasas de la familia 19 muestran inversión de la configuración anomérica. Esto conduce al segundo mecanismo de hidrólisis comúnmente discutido: una reacción de desplazamiento simple concertado, en que una molécula de agua unida actúa como nucleófilo. Por consiguiente, en los miembros de la familia GH19 se ha postulado la necesaria presencia de dos residuos ácidos enfrentados para el desarrollo de la catálisis; uno de ellos actuaría como un ácido general que dona un protón al enlace glucosídico; y el otro, como una base general que promueve un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua y estabiliza el intermedio de reacción cargado. Así, por medio de sus espectros, la estructura cristalina sugiere que el segundo carboxilato catalítico puede ser exitosamente cerrado para permitir la coordinación de una molécula de agua, lo cual es consistente con un mecanismo de desplazamiento simple. En contraste con la familia

GH18, no se han resuelto hasta fechas recientes estructuras de quitinasas GH19 unidas a sustratos. Debido a ello, la localización de su sitio activo ha sido adjudicada sistemáticamente a dos residuos Glu altamente conservados e idóneos teóricamente para la unión e hidrólisis de la cadena de quitina (Fukamizo, 2000; Hahn *y col.*, 2000; Kezuka *y col.*, 2004; Ubhayasekera *y col.*, 2009). Este mecanismo se propone para las quitinasas de la familia 19 (Figura 8b).

Se ha reportado que quitinasas de la familia 18 rinden productos hidrolíticos que conforman la configuración anomérica en C-1. Sin embargo, la estructura cristalina, mostrada por los rayos X, de dos quitinasas de la familia 18 revela la ausencia de un segundo residuo ácido en el sitio activo, en el cual sería capaz de estabilizar al ion oxocarbenio. De este modo, ni el mecanismo de simple desplazamiento ni el de doble desplazamiento son consistentes con la estructura y los productos de la hidrólisis observados. Los Resultados experimentales y teóricos apuntan a un ion oxazolina intermedio formado a través de una asistencia quimérica del vecino grupo N-acetil. Los últimos análisis cristalográficos de una quitinasa GH19 de papaya unida a dos moléculas de N-acetil-D-glucosamina confirman la función de estos dos residuos ácidos en el mecanismo de reacción propuesto (Dahiya *y col.*, 2006; Huet *y col.*, 2008).

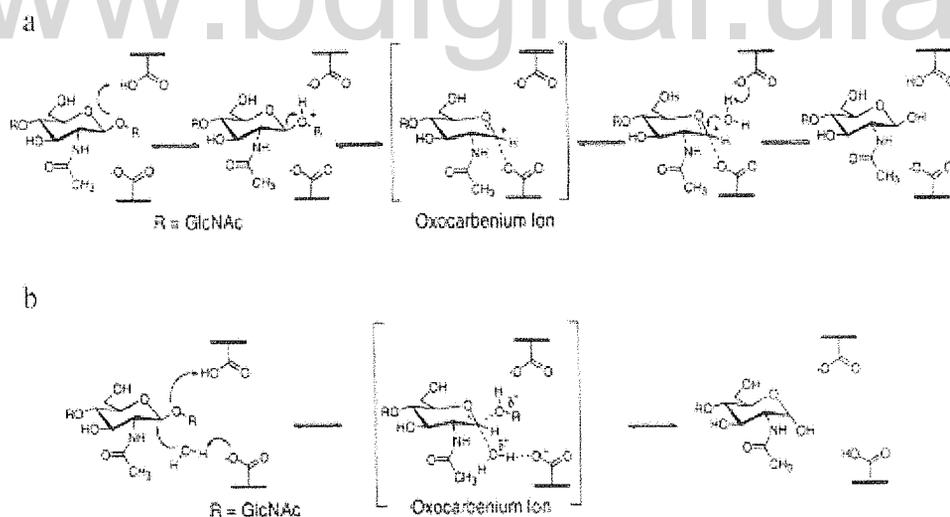


Figura 8. Mecanismo catalítico de las quitinasas de las familias 18 y 19. **(a)** Mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración del carbono anomérico, planteado para las quitinasas de la familia 18. La protonación de un residuo de GlcNAc en una conformación de bote lleva a una oxazolina intermedia, la cual puede ser hidrolizada para formar un producto con retención de la configuración anomérica. **(b)** El mecanismo de hidrólisis de desplazamiento simple con inversión de la configuración del carbono anomérico, propuesto para las quitinasas de la familia 19. Dos residuos ácidos son requeridos en el sitio activo, y el producto de la hidrólisis muestra una inversión de la configuración anomérica (Dahiya *y col.*, 2006).

1.2.8.- Microorganismos quitinolíticos

La gran variedad de formas de quitina presentes en la naturaleza requiere de microorganismos que tengan un gran número de diferentes quitinasas y otras enzimas degradadoras de quitina, las cuales actúan como un complejo multienzimático. Las bacterias son los organismos quitinolíticos más prometedores: sometidas a diversos estudios, han demostrado ser las mayores productoras de enzimas degradadoras de quitina (Castañeda y col., 2011). Además, se encuentran ampliamente diseminadas entre varios grupos taxonómicos de microorganismos, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Fuentes de las quitinasas y algunas propiedades básicas.

Tipo de quitinasas	Peso Molecular (kDa)	Organismo	pH Óptimo	Punto Isoeléctrico (pI)	Referencias
Bacterianas	~ 20-90	<i>Aeromonas</i> , <i>Myxobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Aeromonas</i> sp. No. 10S24, <i>Alcaligenes xylooxidans</i> , <i>arqueobacterias</i> , <i>Bacillus circulans</i> WL-12, <i>B.</i> sp. BG-11, <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. licheniformis</i> X-74, <i>B. stearothermophilus</i> CH-4, <i>B. subtilis</i> KU007, <i>Clostridium septicum</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Nocardia orientalis</i> , <i>Pantoea dispersa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. TKU015, <i>P. aeruginosa</i> K-187, <i>Photobacterium</i> sp. NRG-4, <i>Streptomyces</i> sp. J. 13.3, <i>S. griseus</i> HUT 6037, <i>S. thermoviolaceus</i> OPC-520, <i>S. cinereoruber</i> , <i>S. olivaceoviridis</i> , <i>S. lividans</i> , <i>Thermococcus chitinophagus</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> 283, <i>V. carchariae</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. furnissii</i> .	7,0-9,0	~4,5-8,5	Clarke y Tracey (1956), Cottrell y col. (1999), Wang y Hwang (2001), Vaidya y col. (2003), Guo y col. (2004), Hoster y col. (2005), Dahiya y col. (2006), Wang y col. (2008).

Continúa en la siguiente página

Tabla 3. Continuación de la página anterior

Tipo de quitinasas	Peso Molecular (kDa)	Organismo	pH Óptimo	Punto Isoeléctrico (pI)	Referencias
Vegetales	~ 25-40	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Ipomoea carnea</i> .	NE	NE	Ano y col. (2003), Xu y col. (2007), Patel y col. (2010).
De insectos	~ 40-85	<i>Manduca sexta</i> ^{**} , <i>Bombyx mori</i> ^{**} , <i>Hyphantria cunea</i> , <i>Spodoptera litura</i> , <i>Choristoneura fumiferana</i> .	NE	NE	Daimon y col. (2003).
Fúngicas	~83-97	<i>Agaricus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Mortierella spp.</i> , <i>Mucor rouxii</i> ^{***} , <i>Lecanicillium</i> , <i>Lycoperdon</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. viride</i> , <i>Verticillium lecanii</i> .	4,0-7,0	NE	Uchida y Ohtkara (1988), Deshpande (1986), Gooday (1990), De la Cruz y col. (1992), Cruz y Rojas (1996), Fenice y col. (1996), St-Leger y col. (1998), Matsumoto (2006).

NE: No evaluado.

*Estas enzimas pertenecen a los géneros bacterianos más conocidos.

**Las estructuras genómicas de los genes quitinasa han sido determinadas en estas especies.

***Se han hecho estudios muy amplios sobre las quitosanas de esta especie.

1.2.8.1.- *Serratia marcescens*

Es un bacilo motil Gram-negativo no esporulado, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria saprofita habita nichos ecológicos tan variados como aguas, suelos, aire, plantas y animales, y se ha encontrado en los alimentos, en particular los ricos en almidón, que le proporcionan un entorno de crecimiento excelente. El potencial de *S. marcescens* para utilizar una amplia gama de nutrientes se expresa con claridad en su capacidad para sobrevivir y crecer en condiciones extremas, incluso en presencia de desinfectantes, antisépticos, agua bidestilada y desionizada (Hejazi y Falkner, 1997). Es un germen patógeno oportunista, responsable de numerosas dolencias nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos: puede infectar los tractos respiratorio y urinario, provocar septicemia, meningitis, endocarditis e infección de heridas. Según esté creciendo en un medio líquido o sólido, presenta flagelos o no (algunas cepas tienen la capacidad de producir el

pigmento prodigiosina, de un color rojo característico). Además, es única entre las bacterias entéricas, ya que secreta enzimas extracelulares, como quitinasas, varias proteasas, una lecitinasa, una hemolisina, una nucleasa y una lipasa; también produce un agente biosurfactante llamado *serrawettin*, que ayuda en la colonización de las superficies. Posee un sistema quitinolítico completo, que transforma extracelularmente la quitina en N-acetil-D-glucosamina, la cual atraviesa la barrera membranal y se incorpora a diversas vías metabólicas, tanto de síntesis como de degradación (Nava-Arenas, 2009; Espinosa *y col.*, 2009).

Esta bacteria produce quitinasas de dos tipos: ChiA y ChiB, las cuales pertenecen a la familia 18. La ChiA tiene una longitud de 538 aminoácidos, en tanto que la ChiB posee una de 488. Asimismo, *S. marcescens* produce una quitobiasa de 95 kDa. Otra especie perteneciente a este género, *S. liquefaciens*, también produce dos quitinasas y una quitobiasa (Sastoque, 2005).

1.2.9.- Producción de quitinasas

La producción de quitinasas a partir de microorganismos ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a su potencial aprovechamiento en el primer paso de bioconversión de los desechos de crustáceos. Generalmente, la quitinasa que procede de microorganismos es inducible en la naturaleza. Se ha reportado que la producción de quitinasa extracelular es influida por los componentes del medio (fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, etc.) o los residuos de la agricultura (afrecho de arroz y trigo, etc.). La quitinasa microbial ha sido obtenida mediante fermentación aislada líquida, fermentación continua, fermentación alimentado-aislada, fermentación en estado sólido y sistemas celulares bifásicos. Por otro lado, para la producción de estas enzimas es necesario tomar en cuenta varios factores, que dependerán del microorganismo utilizado y el tipo de fermentación: el pH, la temperatura y el tipo de sustrato (quitina y sus derivados) (Wang y Chang, 1997; Dahiya *y col.*, 2006).

1.2.10.- Aplicaciones biotecnológicas de las quitinasas

Las quitinasas han mostrado un inmenso potencial biotecnológico gracias a la actividad que ejercen sobre la quitina para generar productos de amplia utilización en diversos campos. Las mayores aplicaciones de estas enzimas son:

1.- Localización citoquímica de quitina/quitosano con el uso de complejos de oro-quitinasa/quitosanasa. Complejos de aglutinina-oro de germen de trigo han sido utilizados como pruebas para la detección de residuos de GlcNAc en la pared secundaria de las células de plantas y en hongos patogénicos. Los compuestos de quitinasa etiquetada con oro han sido también usados para la localización inmunocitoquímica y citoquímica de quitina y residuos de N-acetil-D-glucosamina en un micoparásito biotrófico, *Piptocephalis virginiana* (Dahiya y col., 2006).

2.- Producción de proteína unicelular o mononuclear. Aquí se considera la bioconversión enzimática de los desperdicios derivados del procesamiento de crustáceos que recurre al sistema quitinasa de *S. marcescens* para hidrolizar la quitina y producir amino azúcares, principalmente N-acetil-D-glucosamina, con los que posteriormente se preparan medios de cultivo que se utilizan en la producción de biomasa de levaduras (por ejemplo, *Pichia kudriavzevii*, que contiene 45 % de proteína y 8-11 % de ácidos nucleicos). Dicha biomasa puede ser empleada como suplemento alimenticio para animales de granja y en acuicultura (este aspecto se ha estudiado sólo con las quitinasas). Por otra parte, los hongos comúnmente usados como fuente de proteína celular son: *Hansenula polymorpha*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Myrothecium verrucaria*. El criterio usado para evaluar la producción de proteína celular es el rendimiento en cuanto al crecimiento, la proteína total y el contenido de ácidos nucleicos (Revah-Moiseev y Carroad, 1981; Dahiya y col., 2006).

3.- Aislamiento de protoplastos. Las quitinasas y quitosanasas han sido usadas como una efectiva herramienta experimental para la producción de protoplastos fúngicos. En este caso, las enzimas referidas digieren la pared celular y propician la formación de protoplastos, los cuales pueden ser utilizados como modelos de trabajo para estudiar la síntesis de la pared celular, los mecanismos de secreción de macromoléculas, la transferencia de material genético mediante fusión de protoplastos, y también en el mejoramiento de líneas para aplicaciones biotecnológicas (Wiwat y col., 1996). En el caso particular de las quitosanasas, éstas han sido de gran utilidad en estudios de hibridación somática mediante fusión de protoplastos en el grupo de los mucorales, ya que el quitosano es uno de los compuestos principales en las paredes de sus hifas y esporas. Dahiya y col. (2005a) reportaron la efectividad de la quitinasa de *Enterobacter* sp. NRG4 en la

generación de protoplastos a partir de *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida*, *Agaricus bisporus* y *A. niger*.

4.- Quitinasa como biocontrol. Las quitinasas pueden emplearse en la formulación de bioinsecticidas y biofungicidas (Podile y Prakash, 1996), pues la quitina, al estar presente en el exoesqueleto y en el revestimiento del tubo digestivo de los insectos-plaga, se convierte en la molécula blanco que atacan los agentes biológicos que contienen o producen quitinasas. En este contexto, se han hecho formulaciones de bioinsecticidas con cristales proteicos entomopatógenos de *Bacillus thuringiensis* y quitinasas exógenas para propiciar un efecto sinérgico que, por lo mismo, aumente la actividad bioinsecticida, ya que tal bacteria Gram-positiva sintetiza gran cantidad de proteínas llamadas Cry, las cuales forman cuerpos de oclusión o cristales que constituyen el principio activo de los bioinsecticidas comerciales (Cruz y Rojas, 1996; Castañeda y col., 2011). También se han producido plantas transgénicas que, además de sus propias quitinasas, secretan toxinas entomopatógenas que han sido empleadas para formular antifúngicos, cuando el hongo agresor posee quitosano en su pared (Shaikh y Deshpande 1993).

5.- Estimación de la biomasa fúngica. Una variedad de métodos han sido descritos para cuantificar los hongos en el suelo. Las técnicas incluyen la observación directa en el microscopio y la extracción de moléculas indicadoras específicas de los hongos, tales como el ergosterol y la glucosamina. Una fuerte correlación ha sido reportada entre la actividad de la quitinasa y la población de hongos en el suelo. Tal correlación no ha sido encontrada en bacterias ni actinomicetos. Por lo tanto, la actividad de la quitinasa parece ser un indicador adecuado de crecimiento activo de hongos en el suelo (Dahiya y col., 2006).

6.- Control de mosquitos. Las quitinasas pueden ser exploradas como potenciales agentes de control de mosquitos. En este caso, hongos entomopatógenicos, como *Beauveria bassiana*, pueden infectar los huevos de *Aedes aegypti*, un vector de la fiebre amarilla y el dengue, y otras especies relacionadas, como *Galleria mellonella* y *Trichoplusia ni*, aunque en este caso se involucran también otras enzimas, como elastasas, quimi tripsinas y esterases (Cruz y Rojas, 1996). De igual manera, los huevos de escarabajo que yacen en el suelo son vulnerables ante *B. bassiana*. Se ha sugerido utilizar quitinasas de otros microorganismos, como *Myrothecium*

verrucaria, un hongo saprofita, el cual produce un complejo enzimático que degrada la cutícula del mosquito *A. aegypti* (Dahiya y col., 2006).

7.- Morfogénesis. Las quitinasas desempeñan un papel importante en la morfogénesis de levaduras (células elongadas y gordas) y la separación celular durante el crecimiento de *S. cerevisiae* e insectos (Dahiya y col., 2006).

8.- Aplicaciones médicas. Las quitinasas pueden ser empleadas en el cuidado de la salud humana; por ejemplo, ser parte de las preparaciones oftálmicas junto con microbicidas; también, en una utilización médica directa, se han propuesto en la terapia para las enfermedades fúngicas, ya que tienen la capacidad de potenciar la actividad de las drogas antifúngicas. Además, se han sugerido para combatir importantes infecciones micóticas superficiales debido a sus aplicaciones tópicas —aunque tendrían que analizarse y resolverse importantes problemas inmunológicos antes de considerar realmente a estas enzimas como agentes terapéuticos— (Matsumoto, 2001; Dahiya y col., 2006).

9.- Control de hongos patógenos de plantas. El control biológico —el uso de microorganismos o sus secreciones— para prevenir los patógenos de plantas o las plagas de insectos se ofrece como una atractiva alternativa en el combate contra las enfermedades de las plantas. Por esto, las tácticas de control biológico se han convertido en una aproximación importante para facilitar la agricultura sostenible (Dahiya y col., 2006).

La utilización de las quitinasas producidas por microorganismos como agentes de biocontrol es muy amplia: en algunos casos, se aplican directamente; y en otros, los genes que codifican a las quitinasas son clonados en las plantas (Lorito y col., 1996). En cuanto a la producción, tal actividad se ha reportado en el hongo *Stachybotrys elegans*, cuyas quitinasas atacan la pared celular de hongos fitopatógenos, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y otros. Asimismo, la quitinasa producida por *Enterobacter* sp. NRG4 es altamente activa contra *Fusarium moniliforme*, *A. niger*, *Mucor rouxii* y *Rhizopus nigricans*. La quitinasa de *Alcaligenes xylosoxidans*, por su parte, inhibe el crecimiento de *Fusarium udum* y *Rhizoctonia bataticola* (Dahiya y col., 2006).

10.- Localización histoquímica. Existen técnicas de microscopía óptica en las cuales las quitinasas son marcadas con isocianato de fluoresceína para establecer la ubicación *in situ* de la quitina en los exoesqueletos de los insectos (Shaikh y Deshpande, 1993).

11.- Producción de quitooligosacáridos, glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. El estudio de este tipo de moléculas ha creado un mercado diversificado e ilimitado por sus posibles actividades biotecnológicas e inmensas potencialidades farmacéuticas (Shaikh y Deshpande, 1993). En efecto, los quitooligosacáridos constituyen un área de creciente interés: se obtienen al emplear las condiciones y tratamientos químicos, físicos o enzimáticos apropiados para transformar la quitina en compuestos más simples, con uno o más residuos de N-acetil-D-glucosamina. Son muy útiles en la medicina humana; por ejemplo, la quitohexaosa y la quitoheptaosa muestran actividad antitumoral, favorecen la desaparición de la metástasis y también protegen a ratones de laboratorio de la infección causada por *Listeria monocytogenes*. Además, promueven la propagación de las bifidobacterias en el tracto digestivo, las que ayudan a aliviar los síntomas de la llamada intolerancia a la lactosa. Asimismo, se ha propuesto usar la N-acetil-D-glucosamina y sus derivados como posibles aditivos, prebióticos o bioconservadores y edulcorantes en la industria alimentaria.

Otros oligosacáridos han demostrado tener propiedades biomédicas enfocadas en acciones reguladoras y farmacológicas muy importantes: anticancerígenas, antivirales, antioxidantes, de modulación inmunológica, antidiabéticas, antimicrobianas, de influjo en la disminución de la presión sanguínea (hipertensivos) y de reducción de los efectos hipocolesterolémicos. Además, en la agricultura, se han aplicado como factores de nodulación, agentes osmoprotectores, antioxidantes, así como también en nuevas formulaciones que promueven el desarrollo de las plantas y optimizan la fijación del nitrógeno. Actualmente, se están desarrollando investigaciones innovadoras para lograr optimizar la producción y purificación de quito-oligosacáridos en gran escala, lo cual incrementaría su potencial aplicación como bioconservadores de alimentos debido a que tienen actividad inhibitoria contra bacterias patógenas de suma gravedad para la salud pública, muchas de ellas transmitidas por alimentos (Dahiya y col., 2006; Castañeda y col., 2011).

Combinaciones específicas de enzimas quitinolíticas podrían ser necesarias para obtener la longitud de cadena deseada de un oligómero. Por ejemplo, la producción de quitooligosacáridos requiere altos niveles de endoquitinasa y bajos niveles de N-acetilglucosaminidasa y exoquitinasa, mientras que la producción de GlcNAc requiere más alta proporción de exoquitinasa y N-acetilglucosaminidasa. Alternativamente, la actividad de transglicosilación de una variedad de endoquitinasas y N-acetilglucosaminidasas podría también ser útil para generar quitooligómeros deseados, oligómeros con enlaces glicosídicos cambiados y glicopéptidos (Dahiya *y col.*, 2006).

1.2.11.- Mercado de enzimas en Venezuela

Actualmente, el mercado venezolano de enzimas se clasifica como uno de competencia imperfecta, ya que existen pocos oferentes, los que influyen en el precio final del producto. En consecuencia, su estructura ha sido altamente dependiente de las importaciones de enzimas usadas por la industria. De ahí que las escasas empresas que las ofrecen no logren cubrir la gran demanda nacional (Morillo, 2007). Por estas razones, es urgente promover el desarrollo biotecnológico nacional con el fin de generar una producción que satisfaga la necesidad creciente de diferentes enzimas de uso industrial.

Dadas las aplicaciones y propiedades de la quitina, se ha estimulado la investigación de la hidrólisis enzimática de los residuos de camarón, así como la de los aspectos bioquímicos, regulatorios y moleculares de los sistemas de enzimas quitinolíticas aisladas de microorganismos con el fin de mejorar y potenciar la producción enzimática de la quitina por su utilidad en diversos procesos industriales del país.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción mundial de crustáceos (camarón, cangrejo, langosta, krill, etc.) ha crecido considerablemente en los últimos años. En general, solamente una pequeña porción (entre 20 % y 30 %) del peso vivo de estas especies es utilizada para la alimentación humana. Según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2006), Venezuela ha sido el decimoquinto productor de camarones a nivel mundial desde el año 2003 hasta el 2006, y de acuerdo con las estadísticas del último informe del Servicio Autónomo de Recursos Pesqueros y Acuícolas (SARPA, 2001) y el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA, 2004), la producción pesquera ha aumentado de manera sostenida durante los últimos años: para 2001 se estimó en 550.000 toneladas métricas, de las cuales 16.000 TM fueron de camarón; anualmente, se producen 30.000 TM de crustáceos (camarones, langostinos, cangrejos). Cerca del 75 % del peso total del camarón se considera desecho, y entre el 14 % y el 28 % del peso total de éste es quitina, principal componente estructural del exoesqueleto de crustáceos, insectos, paredes celulares de ciertos hongos, levaduras y algas (Lárez, 2006; Abdou *y col.*, 2008; Shirai *y col.*, 1996; Mármol *y col.*, 2004; Revah-Moiseev y Carroad, 1981).

La cosecha del camarón (ya sea por métodos tradicionales de recolección o mediante granjas acuícolas), así como su posterior industrialización, provocan un impacto negativo no sólo en los ecosistemas costeros, sino también, de manera indirecta, en otros ecosistemas, en particular aquellos asociados con las zonas de depósito de desperdicios, debido a que los caparazones desechados por las fábricas tras la extracción de la parte comestible se acumulan en enormes basurales que, al constituir un grave foco contaminante por su lenta capacidad de degradación, originan diferentes grados de polución de acuerdo con la magnitud del desecho, hasta el punto de causar muchas veces daños ambientales irreversibles. Esta situación, en consecuencia, ha estimulado una gran actividad investigadora y la vigilancia de los desechos de crustáceos (camarones, cangrejos, langostas, langostinos, etc.) con el objeto de perfeccionar la producción a gran escala, lo que implica tener en cuenta las cantidades obtenidas, su calidad, y el impacto ambiental del proceso (Abdou *y col.*, 2008; Shirai *y col.*, 1996).

Por lo tanto, existe una alta necesidad de desarrollar métodos de obtención de productos con valor añadido a partir de este tipo de residuos y según las tendencias actuales en biotecnología, la cual propone procedimientos alternativos a los químicos (procesos de bioconversión) para la elaboración de productos comerciales, biocompatibles y de investigación, tales como la quitina, polímero natural biodegradable que se puede utilizar como sustrato de fermentación para producir enzimas quitinolíticas activas y estables, sintetizadas por microorganismos; el quitosano, polisacárido catiónico natural, antimicrobiano y principal derivado de la quitina (industrialmente, se puede producir por desacetilación química o enzimática de ésta); pigmentos (astaxantinas) y proteínas (García, 1997), todo lo cual brindaría una solución factible a problemas de las empresas camaroneras y al país.

En los últimos años la producción de quitina y quitosano ha tomado gran importancia en la industria debido a sus más de 200 aplicaciones en campos como la agricultura, biomedicina, cosmética, farmacéutica, industria alimentaria y también en el tratamiento de aguas residuales y en procesos de purificación de agua potable (Harish y Tharanathan, 2007). Estos compuestos se encuentran asociados y los procesos químicos convencionales para su separación involucran el uso de reactivos que son demasiado agresivos, contaminantes, de difícil manejo, y la utilización de una cantidad tal de energía que hacen el proceso, en su totalidad, poco sustentable, ya que ocasionan la destrucción de proteínas y la depolimerización de la quitina, lo que conlleva, por lo general, a la obtención de productos de características no uniformes (Haki y Rakshit, 2003). Como alternativa a los métodos químicos se han empleado enzimas quitinolíticas aisladas de microorganismos, los cuales son fuentes biológicas estables, seguras y baratas que tienen un gran número de diferentes quitinasas y otras enzimas responsables de la degradación de la quitina, y cuyas propiedades son mejores, ya que permiten recuperar productos, aunque con frecuencia los rendimientos son bajos.

En la presente tesis, se reporta la selección de estirpes microbianas productoras de enzimas quitinolíticas y la caracterización de la actividad quitinolítica extracelular producida por dos cepas de *Serratia* sp., que emplean como sustrato quitina coloidal obtenida de las fibras del exoesqueleto del camarón, con el objeto de mejorar la producción enzimática de la quitina con fines industriales.

III. HIPÓTESIS

A partir de la recolección y selección de microorganismos originarios de diversas fuentes naturales, es posible el aislamiento de cepas silvestres productoras de enzimas quitinolíticas termoestables, que utilizan quitina coloidal como fuente de energía.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Seleccionar microorganismos productores de enzimas quitinolíticas y caracterizar su actividad extracelular.

ESPECÍFICOS:

1. Aislar y seleccionar microorganismos quitinolíticos de diversas fuentes originarias de los estados Mérida y Táchira en medios quitina coloidal.
2. Obtener quitina a partir del exoesqueleto del camarón por procesamiento químico.
3. Cuantificar la actividad quitinolítica de las mejores cepas microbianas con un método colorimétrico.
4. Caracterizar parcialmente la actividad quitinasa, determinando la influencia del pH, la temperatura y estabilidad térmica.
5. Evaluar el efecto de los iones metálicos y EDTA sobre la actividad enzimática.
6. Evaluar la actividad quitinolítica utilizando diferentes sustratos, como quitina en polvo, quitina coloidal y glicol quitina.

7. Establecer los valores de K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ de las quitinasas en la preparaci3n cruda utilizando quitina coloidal como sustrato.
8. Determinar el peso molecular de las prote3nas caracterizadas mediante electroforesis SDS-PAGE.
9. Identificar las cepas quitinol3ticas hasta el rango del g3nero siguiendo criterios morfol3gicos, bioqu3micos y mediante secuenciamiento del ADNr 16S.
10. Ensayar, en una escala de laboratorio, el crecimiento celular y la producci3n de quitinasa secretada por la cepa en un biorreactor de 6 litros.
11. Enriquecer los extractos f3ngicos de una desacetilasa de quitina (CDA) con un extracto de quitinasa de origen bacteriano para incrementar la desacetilaci3n enzim3tica de la quitina coloidal.

www.bdigital.ula.ve

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Toma de muestras y aislamiento de microorganismos

Se tomaron muestras de diversos orígenes y aleatoriamente en diferentes zonas de los estados Mérida y Táchira. El transporte y la preservación se realizaron a 4 °C. El aislamiento primario se efectuó tomando 5 g de cada una de las diferentes muestras orgánicas (tabla 4), las cuales habían sido agregadas a 45 ml de agua peptonada estéril. Se procedió a licuar para homogeneizar el tamaño durante 5 min. Seguidamente, el homogeneizado fue filtrado durante 10 min. La solución filtrada se utilizó para realizar la técnica de dilución decimal y recuento en placa sobre agar nutritivo (AN) (Anexo 1). Las cajas se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente, 37 °C y 50 °C. Los microorganismos que crecieron en el medio fueron purificados en colonias individuales mediante las técnicas de aislamiento en placa por estrías y por dilución en medio sólido. Estos cultivos, a su vez, se reaislaron con el método de estrías, en que se utilizó nuevamente el medio AN para asegurar la obtención de un cultivo puro del microorganismo de interés. Se evaluó la viabilidad de las cepas durante la fase experimental de este trabajo. Posteriormente, se realizaron la observación, la descripción y la codificación de todas las colonias bacterianas aisladas y sembradas en tubos con tapón de rosca, con medio AN inclinado, y mantenidas a 4 °C hasta su posterior utilización.

5.2.- Proceso de extracción de la quitina a partir de exoesqueletos de camarón y obtención de polvo de quitina

Para la obtención de la quitina, se utilizaron residuos de camarones congelados, que fueron donados por el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de los Andes. El procedimiento se llevó a cabo en dos etapas (Agulló *y col.*, 2004).

5.2.1.- Pretratamiento de la materia prima

A partir de exoesqueletos de camarón congelados se extrajo quitina, una vez descongelados se lavaron con agua destilada y, en seguida, se los sometió a una cocción de, aproximadamente, 30

min. La separación de los exoesqueletos de camarón se hizo en forma manual para obtener sólo los fragmentos del caparazón, patas y colas. Únicamente la parte del abdomen se lavó a mano, con agua y jabón para eliminar los restos de carne. Una vez enjuagados con abundante agua destilada, los caparazones se escurrieron y fueron llevados a una cámara de secado con flujo de aire continuo a 100 °C durante 24 horas.

5.2.2.- Tratamiento químico

A partir de 400 g de exoesqueletos de camarón secos se realizó el proceso de extracción de quitina en 4 subetapas:

1. Desmineralización: el residuo sólido obtenido en el paso anterior se trató con una solución de HCl 1N en proporción 1:5 durante 4 horas, a 37 °C y en agitación constante. Se lavó nuevamente con abundante agua destilada.
2. Desproteización: en este paso, se removieron las proteínas contenidas en los caparazones con un tratamiento NaOH 1M en la misma proporción, en agitación constante durante 3 horas a 65 °C, y se realizaron lavados sucesivos con abundante agua destilada.
3. Blanqueo: los caparazones desproteizados y desmineralizados se blanquearon con hipoclorito de sodio al 5 % durante 30 minutos, y fueron lavados sucesivamente con abundante agua destilada.
4. Secado: el material blanqueado se secó en una estufa a 100 °C durante 24 horas para su posterior molienda en un molino Wiley, de la cual se obtuvo polvo de quitina seca de un tamaño de partícula igual o inferior a 1 mm de diámetro. El cálculo del porcentaje de Rendimiento se realizó sobre la base de la materia prima seca. Por último, se empacó y almacenó el producto final para usos posteriores.

Este proceso en su totalidad, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de los Andes, bajo la supervisión de los Ing. Rubén Gómez y César Izaguirre.

5.3.- Preparación de los sustratos especiales

5.3.1.- Preparación de la quitina coloidal (QC)

La quitina coloidal se preparó según la modificación del método de Hsu y Lockwood (1975), el cual consiste en mezclar 40 g de quitina con 400 ml de HCl 37 %, en agitación constante durante 50 min. A continuación, se añadieron 2 L de agua destilada fría. La mezcla se dejó en reposo durante 12 horas, a temperatura ambiente. Después, se procedió a centrifugar a 3.200 g durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se efectuaron sucesivos lavados con agua destilada por centrifugación en las mismas condiciones anteriores con el fin de eliminar el ácido y obtener un pH mayor a 2 en el sobrenadante. La pasta obtenida, de consistencia gelatinosa, se esterilizó durante 15 min a 15 psi; luego, se almacenó a 4 °C hasta su siguiente uso.

Posteriormente, una cantidad de la quitina coloidal se secó por liofilización, proceso durante el cual se calculó el porcentaje de humedad. Finalmente, se realizó espectroscopia FT-IR a una muestra de quitina en polvo y quitina coloidal utilizando un espectrómetro Perkin Elmer modelo 2000.

5.3.2.- Preparación de glicol quitina según Trudel y Asselin (1989)

Se partió de 2,5 g de glicol quitosano (Sigma). El glicol quitosano se homogeneizó en un mortero con 50 ml de ácido acético al 10 %, a temperatura ambiente. La mezcla viscosa se dejó en reposo a 22 °C durante toda la noche. Luego, se agregaron 225 ml de metanol muy lentamente, y la solución se filtró al vacío con papel 11 µm. A continuación, se agregaron 3,75 ml de anhídrido acético con agitación magnética, tras lo cual se obtuvo un gel que se dejó en reposo durante 30 min y que se cortó en pedazos pequeños con una espátula, se transfirió a una licuadora, se cubrió con metanol y se licuó a máxima velocidad durante 4 min. La suspensión se centrifugó a 25.800 g durante 15 minutos, a 4 °C, y al pellet se le agregó un volumen de metanol, y se homogeneizó nuevamente con la licuadora a máxima velocidad durante 4 minutos. La suspensión se centrifugó a 28.000 g durante 15 minutos, a 4 °C, y el pellet se homogeneizó en la licuadora con 250 ml de azida de sodio al 0,02 %, preparada con agua destilada estéril. Se obtuvo una suspensión de glicol quitina al 1 % (10 mg/ml), la cual fue almacenada a 4 °C.

5.4.- Selección inicial de microorganismos productores de quitinasas

Se partió de un total de 168 aislamientos, los que se inocularon en el medio de cultivo agar QC reportado por Gohel y Naseby (2007) (Anexo 1). Se realizaron preinóculos de cada cepa en 3 ml de caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas; luego, se tomaron alícuotas de 3 µL, las cuales fueron inoculadas por triplicado en superficie sobre el medio QC. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 4 ó 5 días, mientras se examinaban a diario el crecimiento y la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias (Suginta, 2007).

Se tomó como criterio de selección en placa de este subgrupo de cepas la presencia de halos mayores que 1 cm de diámetro luego de 4 días de incubación, con lo cual se las calificaba cualitativamente o no como posibles productoras de quitinasa; las observaciones se basaron en la velocidad del crecimiento, el tiempo de aparición, tamaño y color del halo formado. Se incluyó la *Serratia* sp. BIOMI-363706 como cepa de referencia. Se seleccionaron 19 cepas del banco para continuar con una inspección secundaria.

5.4.1.- Caracterización morfológica

A las colonias que, presumiblemente, presentaron actividad quitinolítica se les realizó la caracterización morfológica mediante la observación al microscopio y con la tinción de Gram y motilidad. Asimismo, se estudió su morfología macroscópica observando la velocidad de crecimiento, la forma y el color (Philipp, 1994). Fueron preservadas a -20 °C en glicerol al 60 % v/v, según la metodología de Meza *y col.* (2004).

5.5.- Segunda selección de microorganismos con actividad quitinolítica

Un total de 19 cepas fueron capaces de crecer y presentar, alrededor de las colonias, halos de hidrólisis. Con cada una de ellas, se realizó un preinóculo en 5 ml de caldo nutritivo (Anexo 1); se incubó durante 24 horas a 37 °C y, luego, se añadió en fiolas de 125 ml que contenían 45 ml de medio líquido, reportado por Wang *y col.* (2008) (Anexo 1). El procedimiento, que se realizó por triplicado, consistió en incubar las bacterias a 37 °C durante 120 h, y en agitación constante 125 rpm. Se usó SM-BIOMI como control positivo (+). Después, los medios se filtraron con papel

Whatman No. 6. Posteriormente, se centrifugó el cultivo durante 15 min a 3.200 g, a 4 °C, con inhibidor de proteasas. El sedimento se descartó y el sobrenadante representó el extracto crudo enzimático (ECE) con actividad quitinasa, el cual se congeló a -20 °C para luego hacer las mediciones cuantitativas pertinentes.

5.6.- Selección de las cepas con mayor actividad quitinolítica

5.6.1.- Preparación del inóculo y el extracto crudo enzimático (ECE) a partir de cultivos bacterianos

La selección se realizó teniendo en cuenta la actividad quitinolítica en placa —prueba cualitativa— de los filtrados del cultivo de cinco cepas. Por lo tanto, con cada una de ellas se realizó un preinóculo, y los sobrenadantes de cada cultivo fueron obtenidos según se describe en el punto 5.5.

5.6.2.- Determinación de la actividad enzimática

El procedimiento utilizado —que se basa en evaluar coloriméricamente la N-acetilglucosamina (GlcNAc) liberada por la acción hidrolítica de la quitinasa sobre el sustrato quitina coloidal, según el método de Morgan-Elson, y adaptado por Reissig *y col.* (1955)— se realizó como sigue: la mezcla de la reacción se compuso con 1 ml del extracto crudo enzimático y 1 ml de QC al 10 % (peso húmedo/volumen), y se suspendió en buffer fosfato 0,2 mM, con pH 7. Se incubó a 50 °C, durante 1 hora, en baño María. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de NaOH al 1 %. Posteriormente, a 250 µL del sobrenadante obtenido se les adicionaron 40 µL de tetraborato de potasio 0,8 mM, con pH 9,1, y se sometieron a ebullición en baño María durante 3 min. La mezcla se enfrió en baño de hielo; a continuación, para el desarrollo del color, se le agregó 1 ml de p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) al 10 % en ácido acético glacial al 87,5 %, antes de ser incubada a 37 °C durante 1 hora.

Después del tiempo de incubación, las muestras debieron ser centrifugadas a 3.200 g durante 10 minutos, a 4 °C, para eliminar la quitina insoluble antes de realizar las lecturas de la absorbancia a 585 nm. El color fue estable incluso durante 2 horas. Los resultados se

interpolaron, en un rango de concentración de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$, en una curva patrón preparada con GlcNAc (Anexo 2), con la cual se transformaron las absorbancias en μmol y se expresó la actividad en unidades de quitinasa (UQUITINASA). Se realizaron seis réplicas de esta curva, y se optimizó la recta con el programa Kalibo versión 1.2a. Se tomó como 1 unidad (U) quitinolítica la cantidad de enzima que produce un μmol de GlcNAc en un minuto, bajo las condiciones antes descritas (Gómez-Ramírez, 2006).

5.6.3.- Determinación de proteína

El contenido de proteína en los extractos fue determinado mediante el método Bradford (1976), usando albúmina de suero bovino como patrón. En el ensayo, se utilizaron 1 ml del reactivo de Bradford y 0,1 ml de la muestra de extracto crudo enzimático. Los datos extraídos de la proteína se compararon con los datos correspondientes a la curva de calibración de 0-100 μg de albúmina sérica bovina (Anexo 3), realizada por triplicado y calculada con regresión lineal en el programa de cómputo Kalibo versión 1.2a.

5.7.- Caracterización parcial de la enzima quitinasa producida por las cepas BIOM1-363706 y MF11

Se realizó utilizando el extracto crudo enzimático de las cepas en estudio. En cada caso, se evaluaron las condiciones óptimas de pH y temperatura, la estabilidad térmica de la enzima, el efecto de los iones metálicos y EDTA sobre la actividad quitinasa. Se empleó la QC como sustrato en las diferentes etapas del trabajo. Asimismo, se determinó la actividad enzimática en diferentes sustratos y se estudió la cinética enzimática con la QC como sustrato. Se procedió a realizar las pruebas preliminares del modo como se menciona a continuación:

5.7.1.- Efecto del pH, la temperatura y estabilidad térmica en la actividad de la enzima quitinasa

Para determinar el pH óptimo de cada una de las quitinasas, se hizo reaccionar 1 ml de extracto crudo enzimático con 1 ml de quitina coloidal al 10 % (peso húmedo/volumen), mezcla que fue suspendida en los siguientes buffers: glicina-HCl (50 mM, pH 3), acetato (50 mM, pH 4-

5), fosfato (50 mM, pH 6-8) y $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ (50 mM, pH 9-11) (Wang *y col.*, 2008). Se incubó a 37 °C y 50 °C durante 30 minutos. Luego, se centrifugó a 3.200 g durante 10 minutos, a 4 °C. Posteriormente, se establecieron las unidades quitinolíticas utilizando el método definido en la sección 5.6.2. Teniendo en cuenta el pH óptimo, se realizó la determinación de la temperatura óptima. Concurrieron las mismas condiciones de la mezcla de reacción anterior, se incubó a distintas temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C), se dejó avanzar la incubación durante 30 min con agitación esporádica, y se detuvo colocándola en un baño de hielo durante 5 minutos. Se llevó a centrifugar a 3.200 g durante 10 minutos, a 4 °C. Por último, se determinaron las unidades quitinolíticas (UQ) de la manera descrita en la sección 6.2.

La estabilidad térmica de la enzima se consiguió sometiendo el extracto enzimático a diferentes gradientes de temperatura: de 10 °C a 30 °C, de 40 °C a 60 °C y de 70 °C a 90 °C. Se incubó durante 5 min, y luego las muestras fueron mantenidas en baño de hielo durante 30 min (Martin *y col.*, 2006). Seguidamente, se llevó a cabo la reacción con 500 μL de extracto enzimático y 500 μL de quitina coloidal al 10 % (peso húmedo/volumen), mezcla suspendida en buffer fosfato 0,2 mM, con pH y temperatura óptimos, e incubada durante 30 min. Se centrifugó a 3.200 g durante 10 minutos, a 4 °C, y se realizó la cuantificación de la actividad residual de la enzima tratada bajo condiciones de ensayo según la forma indicada en la sección 5.6.2. En todos los casos, las muestras se ensayaron por triplicado.

5.7.2.- Efecto de varios compuestos químicos

Con la finalidad de determinar el efecto inhibitorio de algunos metales divalentes sobre la actividad quitinasa, se procedió a preincubar la enzima en 50 mM de buffer fosfato, pH 6,5, durante 30 min a 50 °C, en presencia de las siguientes sales de cloruro: CaCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 y ZnCl_2 , en concentración de 2 mM (Purwani *y col.*, 2004). Se realizaron controles negativos sin añadir ninguna de las sales. La actividad residual de la enzima se determinó bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.6.2.

5.7.3.- Actividad en diferentes sustratos

Se evaluó la actividad quitinasa sobre los siguientes sustratos: QC al 1 % (peso húmedo/volumen), como control positivo; quitina en polvo (QP) al 1 % (p/v); y glicol quitina (GQ) al 1 % (p/v) (Wang *y col.*, 2008). Las preparaciones enzimáticas fueron incubadas a 50 °C y la reacción se llevó a cabo durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min. Las muestras con los sustratos QC al 1 % (peso húmedo/volumen) QP) al 1 % (p/v) y GQ al 1 % (p/v), fueron centrifugadas a 3.200 g y 4 °C antes de hacer las lecturas de absorbancia. El montaje se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos. La actividad de las enzimas, con diferentes sustratos, se determinó según lo indicado en la sección 5.6.2.

5.7.4.- Cinética de la enzima en el sustrato quitina coloidal

Se efectuaron reacciones de despolimerización con la enzima quitinasa empleando QC en distintas concentraciones: 2,5, 5, 7, 10 y 15 % (peso húmedo/volumen) en buffer fosfato 0,2 mM, ajustado a pH óptimo. Una vez conformadas, las mezclas enzima/sustrato se incubaron a temperatura óptima durante tiempos variables: 0, 5, 15, 30, 45, 60 y 75 min. Se estimaron velocidades iniciales deteniendo la reacción en los momentos de tiempo mencionados. La actividad enzimática se determinó según lo indicado en el apartado 5.6.2. Los valores de K_m y $V_{máx}$ aparentes se determinaron utilizando el método de Lineweaver-Burk.

5.8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos caracterizados

La electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). El gel de resolución se preparó al 12 % de acrilamida.

5.8.1.- Preparación de las muestras y condiciones de la electroforesis

Las muestras fueron preparadas agregando un volumen de buffer de carga, cuya composición era la siguiente: Tris-HCl 250 mM, con pH 6,8; glicerol al 10%; SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,01% (p/v); y agua destilada hasta completar 9,5 ml (en el caso de las condiciones

desnaturalizantes, se añadían 50 µl de β-mercaptoetanol). A continuación, se diluyó la muestra 1:2 con buffer de muestra. Por último, las muestras preparadas se dejaron hervir durante 5 min.

Los volúmenes de siembra fueron: 3 µl para el marcador de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards, Bio-Rad, N° de catálogo 161-0318); 11 µl de proteína del extracto de la muestra BIOMI-363706; y 0,5 µl para la seroalbúmina (66,2 kDa), utilizada como patrón de peso molecular; de modo que se completó, un volumen máximo de 20 µl con buffer de muestra. Se aplicó un campo eléctrico de 200 V durante 45 min.

5.8.2.- Fijación, coloración y decoloración

Inmediatamente después de sacar el gel, se realizó el proceso de fijación y tinte por inmersión según el método de Fairbanks *y col.* (1971).

5.8.3.- Determinación de la masa molecular

Para la determinación del peso molecular de cada una de las bandas observadas y registradas por fotografías con un sistema de revelado instantáneo (Cámara Digital Kodak Easy share Z1485 IS), se recurrió al cálculo de su Rf mediante una curva de calibración previamente confeccionada a partir de proteínas patrones (Anexos 4 y 6), que fueron corridas en la electroforesis desnaturalizante en iguales condiciones que los diferentes extractos, y cuyos pesos moleculares, transformados en logaritmos, se graficaron comparativamente con sus correspondientes movilidades relativas mediante un tratamiento de correlación lineal simple ($r^2 = 0,9988$). El peso molecular se estimó por medio del cálculo del antilogaritmo de la ecuación $Y = -1,8035X + 2,3799$ (anexo 6).

5.9.- Identificación molecular de las cepas aisladas

Con el fin de realizar la identificación taxonómica, hasta el nivel del género, de las cepas aisladas, se empleó la técnica de análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica el ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Actualmente, es una técnica muy utilizada en la identificación molecular debido a su reproductibilidad, simplicidad, poder de discriminación y universalidad.

Por consiguiente, se amplificó por PCR la región ADN_r 16S, y se utilizaron cebadores universales para el dominio bacteria (Weisburg y col., 1991).

5.9.1.- Extracción de ADN genómico de las cepas

Se tomó 1 ml de los cultivos en caldo nutritivo (crecidos durante toda la noche) y se centrifugó a 3.000 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 100 µl de buffer de lisis —10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl con pH 7,5— y se agregaron 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se incubaron durante 1 hora a 56 °C en baño María para que ocurriera la lisis de la pared celular; luego, se dejaron en ebullición durante 10 min y, a continuación, fueron centrifugados a 3.000 g durante 10 min. Finalmente, se tomó el sobrenadante y se lo mantuvo a -20 °C hasta su uso (Maniatis y col., 1982).

En el proceso de purificación del ADN genómico, a las muestras en estudio se les colocó una gota de ribonucleasa —RNAsa—, se las dejó en reposo durante 20 min para luego tomar, de cada una de ellas, 450 µl, a los que se agregaron 450 µl de fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico; la mezcla se centrifugó a 1.500 g durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se repitió el procedimiento 2 veces. Después, se tomó el sobrenadante y se le adicionó etanol hasta completar dos volúmenes, que se guardaron a -20 °C durante 12 h. Posteriormente, se centrifugaron a 1.500 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con etanol al 70 %. Se repitió el procedimiento 2 veces. Se centrifugó a 1.500 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol durante 3 h. Se solubilizó el precipitado con 100 µl de agua destilada. Finalmente, se guardó hasta su próximo uso (Chen y Kuo, 1993).

5.9.2.- Detección del ADN genómico por Electroforesis en Gel de Agarosa al 0,8 %

Se realizó en una cámara BIO-RAD Wide Mini-Sub[®] cell GT. Se pesaron 0,24 g de agarosa y se disolvieron en 30 ml de buffer Tris-Acetato EDTA (TAE 50 X), cuya composición en g l⁻¹ fue: 242 g de Tris-Base a 0,04 mM; 57,1 ml de ácido acético glacial; 100 ml de solución EDTA a 0,5 mM, con pH 8,0. Se utilizó como buffer de corrida Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (pH 8,0).

Se mezclaron 5 µl de cada muestra con 3 µl de buffer de carga (Orange Grew); luego, se cargaron 7 µl de cada muestra por pocillo. Posteriormente, se realizó la electroforesis a 90 voltios durante 30 min. Una vez finalizada la corrida electroforética, se procedió a la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio, en una concentración de 1 mg/L durante 15 min. A continuación, se lavó el gel con agua destilada y se procedió a visualizar las bandas del ADN genómico de las diferentes muestras en un transiluminador White/ Ultraviolet.

5.9.3.- Amplificación del gen 16S de ADNr de las cepas por PCR

Se realizó utilizando los siguientes cebadores universales: FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y K2R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3') (Weisburg y col., 1991).

La mezcla de reacción se preparó con los siguientes componentes en un tubo de Eppendorf de 0,5 ml, con un volumen final de 25 µl:

- o 5 µl de buffer Green Go Taq® (1X);
- o 2,5 µl de Cloruro de Magnesio —MgCl₂— (25 mM);
- o 0,5 µl de Desoxirribonucleótidos trifosfato —dNTPs— (10 mM);
- o 1 µl de FD1 (10 µM);
- o 1 µl de K2R (10 µM);
- o 0,125 µl de Enzima polimerasa termoestable —Taq ADN polimerasa— de origen comercial (5 U/µl);
- o 1 µl de la muestra de ADN (concentrado); y
- o 13,8 µl de Agua Calidad Biología Molecular estéril.

Se utilizó el siguiente programa (Figura 9):

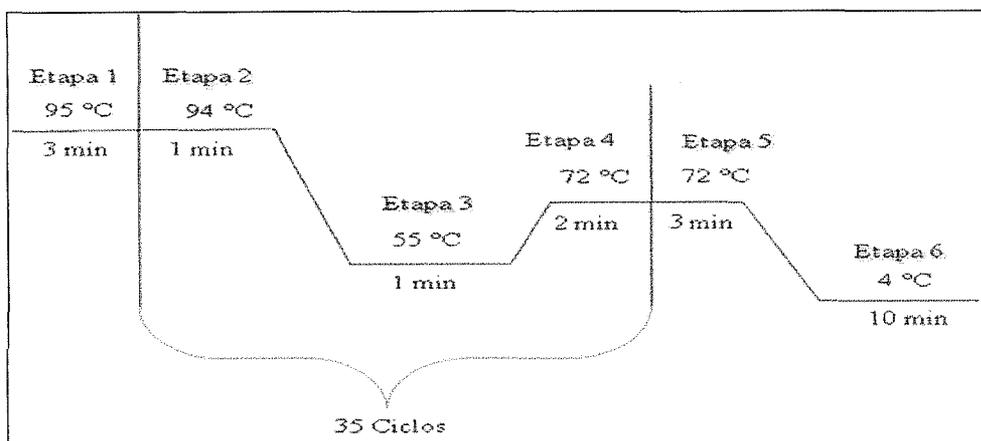


Figura 9. Condiciones de ciclado de la PCR.

5.9.4.- Purificación y secuenciación del ADNr 16S de las cepas

Para realizar la purificación y secuenciación de las muestras obtenidas, se recurrió al servicio del Centro de Secuenciamiento y Análisis de Ácidos Nucleicos (CeSAAN), perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Posteriormente, se compararon las secuencias obtenidas (Tabla 1) con los programas y bases de datos disponibles en las páginas electrónicas de las siguientes instituciones: National Center for Biotechnology Information (NCBI) y The European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

5.10.- Estudio del crecimiento celular y la producción de la enzima quitinasa secretada por la cepa BIOMI-363706

5.10.1.- Microorganismo

Se utilizó la bacteria *Serratia* sp. cepa BIOMI-363706, perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos «Sixto David Rojo», de la Universidad de los Andes.

Para la reactivación de la cepa, que se encontraba conservada en viales con glicerol al 60 % v/v —siguiendo la metodología descrita por Meza y col. (2004)—, se emplearon:

a) Medio agar nutritivo

Este medio, cuya composición se describe en el paso 1 —tanto en su modalidad sólida (añadiendo el agar al final) como líquida (sin agar), y siempre mantenido en refrigeración—, fue útil para la conservación de la cepa durante tiempos cortos y la confirmación de su pureza.

b) Medio quitina coloidal

Este medio de cultivo agar QC modificado, reportado por Gohel y Naseby (2007) (Anexo 1), se utilizó para realizar el preinóculo de la cepa.

Para la experiencia de la fermentación en el biorreactor de 6 L, el medio líquido modificado que se empleó —y que tenía como fuente de carbono la QC— fue el reportado por Wang *y col.* (2008) (Anexo 1), cuya composición se describe en el paso 5. La preparación consistió en disolver todos los componentes en 3.000 ml de agua destilada, en agitación constante, y en calentar la mezcla hasta diluirla completamente. Luego, se la colocó en el biorreactor y se procedió a esterilizarla por autoclavado durante 15 min, a 121 °C y 15 lb. de presión.

5.10.2.- Preparación de inóculos

Fueron preparados a partir de cuñas de mantenimiento de la cepa. Cada preinóculo, tomado con una azada, procedió de 3 ó 4 colonias y se inoculó en 30 ml de caldo de QC contenidos en un Erlenmeyer de 125 ml; se dejó en incubación durante 24 horas, a 37 °C y en agitación constante de 150 rpm.

Posteriormente, se transfirió un 10 % del preinóculo a matraces Erlenmeyer que contenían 300 ml de medio líquido QC, modificado por Wang *y col.* (2008); se dejó incubando durante 48 horas, a 37 °C y en agitación constante de 120 rpm. El experimento se realizó por triplicado.

5.10.3.- Inóculo para el biofermentador

En 270 ml de medio líquido QC modificado —contenidos en un Erlenmeyer de 1.000 ml— se inocularon 30 ml de la cepa crecida en un medio líquido QC, modificado según Gohel y Naseby (2007). Se llevó a incubar durante 24 h, a 37 °C y en agitación constante de 180 rpm. Se inocularon los 300 ml de este cultivo en 3.000 ml del mismo medio contenidos en el biorreactor.

5.10.4.- Determinación del crecimiento celular en un biofermentador

Para este paso, se recurrió al método de extensión en placa: a partir de la suspensión bacteriana crecida en el medio líquido QC, se tomaron 7 ml del cultivo desde el tiempo cero y cada 8 horas, y conservando las condiciones de esterilidad, hasta alcanzar la fase estacionaria. Luego, se procedió a filtrar cada muestra con papel Whatman No. 6, se centrifugó a 380 g durante 5 min, a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante fue de utilidad como ECE con actividad quitinasa.

Para el estudio del crecimiento celular, se separaron 0,5 ml, con los que se realizaron diluciones seriadas, a partir de las cuales se tomaron 100 µl, que fueron sembrados —utilizando un rastrillo estéril de extensión— en una placa con medio AN e incubados a 37 °C durante 12 horas. Finalmente, se procedió al conteo de las colonias. Esta experiencia se realizó por triplicado (Madigan y *col.*, 2004).

5.10.5.- Determinación de la actividad quitinolítica secretada por la cepa BIOMI-363706 en un biofermentador

Para la realización de esta prueba, los sobrenadantes del cultivo se procesaron según la secuencia descrita en el paso 6.2.

5.10.6.- Determinación de proteína

Se determinó el contenido de proteína aplicando el proceso descrito en el paso 6.3.

5.10.7.- Ensayo de la producción de la enzima quitinolítica secretada por la cepa BIOMI-363706 con el empleo de QC como sustrato en un biorreactor

Se cultivó la bacteria en un biorreactor de 6 L de capacidad, de marca New Brunswick Scientific, con un volumen de trabajo de 3.000 ml, durante 104 horas. A partir del inóculo en medio QC, preparado como se indicó anteriormente, se tomaron 300 ml para inocularlos en 3.000 ml del medio contenido en el biorreactor (Figura 10).

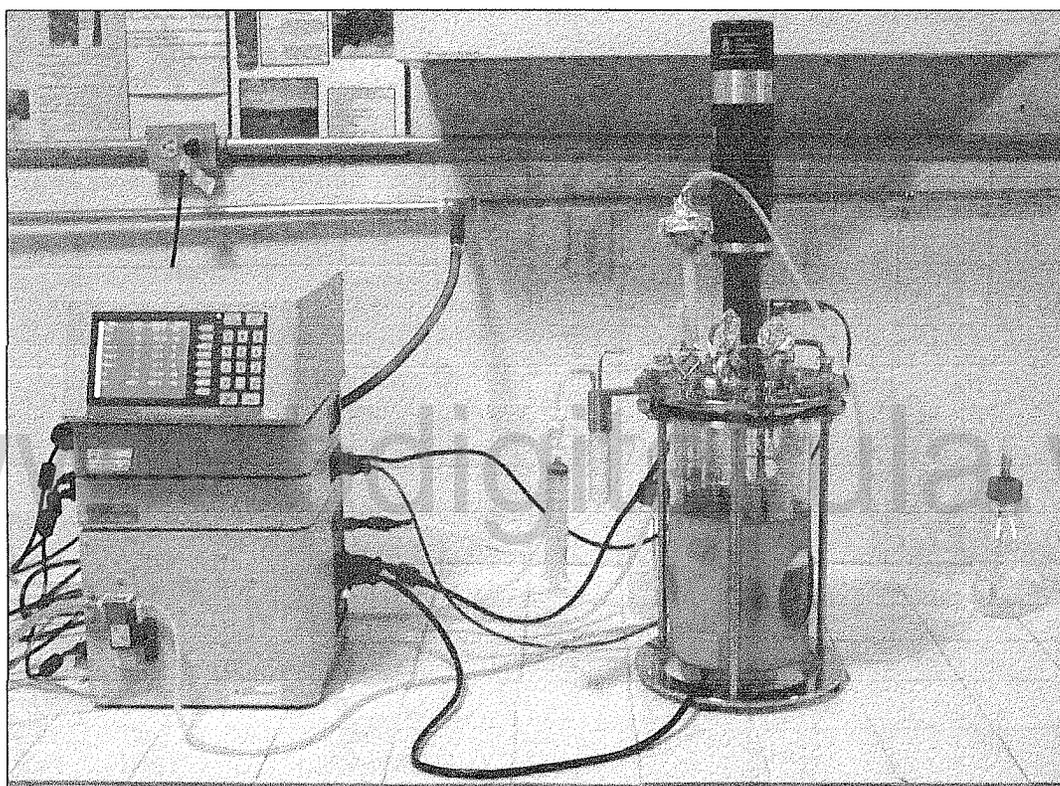


Figura 10. Biorreactor Modular Bioflo 110 M12730054 de 6 litros de capacidad.

Se extrajeron, de manera estéril, 7 ml de la muestra en el tiempo cero y cada 8 horas para el estudio del crecimiento celular y la producción de enzimas quitinolíticas, de acuerdo con la manera antes descrita. Las condiciones de operación utilizadas han sido las siguientes: temperatura constante a 37 °C; caudal de aire de 1 L/min —se leyó constantemente el rotámetro del biorreactor (Figura 11)—; velocidad de agitación constante e igual a 180 rpm y con un pH inicial de 7,2, el cual no se controló durante la fermentación.



Figura 11. Vista frontal de la interconexión de los módulos de control de nivel: dO₂ (1), pH (2), y regulador de la energía con rotámetro (3).

5.11.- Acoplamiento

5.11.1.- Obtención de los extractos enzimáticos

5.11.1.1.- 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 seleccionada como la mejor para continuar con el estudio y fue obtenida por la autora de este trabajo. La cepa fúngica *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 fue aislada por el 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. Esta cepa, seleccionada y caracterizada como potencial productora de desacetilasa de quitina (CDA) intracelular (Álvarez, 2010).

5.11.1.2.- Extracto de quitinasa extracelular

La cepa *Serratia* sp. BIOMI-363706 se sembró e incubó a 37 °C, durante 24 horas y a 120 rpm, en un medio nutritivo. Este preinóculo se transfirió a 90 ml de caldo QC (Anexo 1). El cultivo se incubó a 37 °C, durante 72 horas y a 120 rpm. 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 se utilizó como el extracto crudo con actividad quitinasa.

5.11.1.3.- Extracto de CDA intracelular

En un caldo YPG (Anexo 1), se inocularon 105 esporas/ml de la cepa *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01. La incubación duró 120 h 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. Se resuspendió en buffer tetraborato/HCl 50 mM, con pH 7,0 e inhibidor de proteasas. El macerado se centrifugó a 22.000 g durante 15 min, 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 %; y cada centrifugación se realizó a 22.000 g durante 15 min, a 4 °C. Al sobrenadante obtenido después de la saturación al 85 % se le agregó 10 % más de sulfato de amonio para la preservación de la actividad de la enzima, y fue tomado como el extracto con actividad CDA.

5.11.2.- Ensayos de actividad de las enzimas

La actividad quitinasa se determinó tal como se indica en el paso 6.2.

5.11.2.1.- Estimación de la actividad con diferentes sustratos quitinosos

Se estimaron velocidades iniciales de la actividad de las enzimas quitinasa y CDA sobre los sustratos QC, QP y GQ. Para la actividad quitinasa, se prepararon suspensiones al 1 % (peso seco/volumen) con cada sustrato, en buffer fosfato 50 mM, con pH 6,5. Para la actividad CDA, se prepararon suspensiones al 0,5 % mg/ml (peso seco) de cada uno de los sustratos, en buffer tetraborato/HCl 0,2 mM, con 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 en diferentes tiempos

para la estimación de las velocidades iniciales. Las muestras con los sustratos QC y QP fueron centrifugadas a 3.200 g y a 4 °C antes de hacer las lecturas de absorbancia.

5.11.3.- Acoplamiento de las enzimas

El buffer-sustrato fue una suspensión de QC al 0,5 % mg/ml (peso seco) en buffer tetraborato de sodio/HCl 0,3 mM, con pH 7,0. La mezcla de reacción consistió en 1,1 ml del buffer-sustrato, 1,1 ml del extracto con actividad quitinasa y 0,55 ml del extracto con actividad CDA. Para la reacción de control, el volumen del extracto con quitinasa fue sustituido por agua destilada. Las reacciones se incubaron a 45 °C durante 8 h, y cada hora se tomó una alícuota para detener la reacción de la CDA y realizar las determinaciones. Se estimaron las velocidades iniciales de la CDA calculando las pendientes de la parte recta de las curvas de μmol de acetato en contraste con el tiempo.

www.bdigital.ula.ve

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Aislamiento primario de las cepas de trabajo

6.1.1.- Preparación del medio de cultivo

La realización de un ensayo *in vitro* de aislamiento de microorganismos requiere de una adecuada selección del medio de cultivo, ya que éste resulta ser un factor determinante para el crecimiento de aquéllos y la producción de metabolitos (Shanmugaiah *y col.*, 2008). Se decidió emplear un medio mínimo modificado, reportado por Gohel y Naseby (2007), con adición de un 2 % de QC (peso húmedo/volumen) como única fuente de carbono; extracto de levadura como fuente orgánica de nitrógeno y carbono; sulfato de magnesio como fuente de azufre; y fosfato diácido de potasio, el cual funcionó como fuente de fósforo y sistema amortiguador del pH del medio (Matsumoto, 2001). Se tuvo en cuenta lo indicado por Safarida *y col.*, (2006) quienes señalan la importancia de los micronutrientes, tales como P, Mg y Ca, en la conservación de la conformación estructural de las enzimas.

Hsu y Lockwood (1975) demostraron un crecimiento más efectivo de aislamientos de actinomicetos marinos y del suelo cuando se empleó agar QC con sales minerales, en relación con lo obtenido en un medio carente de éstas. Por ello, se tomó su artículo como base para llevar a cabo la búsqueda de microorganismos productores de quitinasas. Sin embargo, los protocolos de aislamiento fueron modificados para hacerlos aplicables al estudio, de modo que se obtuviera quitina en polvo de las fibras del exoesqueleto del camarón (Figura 12); y a partir de ella, a su vez, quitina coloidal por medio de un proceso de extracción química. Así, se obtuvo un sustrato sin grumos visibles, de consistencia cremosa, sin cambios de color, con un 95,4 % de humedad, un rendimiento de 44,9 % y un valor de pH mayor a 2. La intención al usar QC desmineralizada y desproteínizada (Figura 13) fue evitar la formación de halos de proteólisis, que con frecuencia enmascaran los halos de quitinasa y dan falsos positivos (Gómez-Ramírez, 2006). De tal manera que el medio de cultivo facilitó el proceso de selectividad, dada su limitación en la fuente de carbono. En la Tabla 4 se señalan el tipo de muestra y la procedencia de las cepas aisladas.

Tabla 4. Procedencia de las cepas aisladas y su codificación asignada.

Número	Tipo de muestra	Procedencia	Cantidad de aislados	Códigos de las cepas en la colección
01	Compost	Bacteria aislada de un compostero ubicado en las inmediaciones de Tabay, Municipio Santos Marquina del estado Mérida. Donada por el Dr. Pablo García.	4	013701, 014501, 014502, 014503.
02, 39	Lombrices rojas californianas (<i>Eisenia foetida</i>)	Bacteria aislada de un compostero ubicado en las inmediaciones de Tabay, Municipio Santos Marquina del estado Mérida. Donada por el Dr. Pablo García.	14	023701, 023702, 023703, 023704, 024501, 024502, 024503, 024504, 024505, 024506, 393701, 394501, 394502, 394503,
03	Bosta bovina	Bacteria aislada de una zona montañosa del páramo La Culata, La Musuy, Municipio Rangel en Mucuchíes, estado Mérida.	3	033701, 034501, 034502,
04, 05, 06, 07, 08, 09, 35, 36, 37, 38	Algas verdes	Bacteria aislada de algas recolectadas de la superficie de rocas en exposición constante a aguas termales sulfatadas de origen natural, ubicadas en el Páramo La Culata, La Musuy, Municipio Rangel en Mucuchíes, Edo. Mérida.	59	043701, 043702, 043703, 043704, 044501, 044502, 053701, 053702, 054501, 063701, 063702, 063703, 063704, 063705, 064501, 064502, 064503, 073701, 073702, 073703, 073704, 074501, 074502, 083701, 084501, 084502, 084503, 084504, 084505, 084506, 084507, 093701, 093702, 094501, 094502, 094503, 094504, 094505, 353701, 353702, 353703, 353704, 353705, 353706, 354501, 363701, 363702, 363703, 363704, 363705, 363706- BIOMI, 364501, 364502, 383701, 383702, 383703, 383704, 383705, 384501,
10	Guano de murciélago insectívoro (<i>Pteronotus parnellii</i>)	Bacteria aislada de guano de murciélago insectívoro recolectado en el estado Barinas.	3	104501, 104502, 104503,
11	Heces de sapo común (<i>Bufo bufo</i>)	Bacteria aislada de las heces de sapo común, donadas por la Fundación «Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial», CIEPE, del estado Yaracuy.	3	113701, 114501, 114502,

Continúa en la siguiente página

Tabla 4. Continuación de la página anterior

Número	Tipo de muestra	Procedencia	Cantidad de aislados	Códigos de las cepas en la colección
12	Harina de camarón	Bacteria aislada de la harina de camarón, donada por la Fundación CIEPE, del estado Yaracuy.	6	123701, 123702, 123703, 123704, 123705, 124501 ,
13	Agua residual	Bacteria aislada de agua residual y donada por el Dr. Pablo García.	1	133701,
14, 30	Bosta de caballo (<i>Equus caballus</i>)	Bacteria aislada de bosta de caballo procedente de las inmediaciones del Laboratorio de Biotecnología «SIXTO David Rojo», de la ULA, Municipio Libertador del Edo. Mérida.	7	143701, 143702 143703 , 144501, 303701, 303702, 303703
15	Heces de perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Bacteria aislada de heces de perro obtenidas en las inmediaciones de la Facultad de Ciencias de la ULA, Municipio Libertador del estado Mérida.	2	153701, 154501,
16	Restos de alacrán (<i>Centruroides</i> spp.)	Bacteria aislada de restos de alacrán recolectados en las inmediaciones del sector El Llano, Municipio Libertador del estado Mérida.	1	163701,
17	Heces de paloma (<i>Columba livia domestica</i>)	Bacteria aislada de excremento de paloma recolectado en los alrededores de la Facultad de Ciencias de la ULA, Municipio Libertador del estado Mérida.	3	173701, 174501, 174502 ,
18 ^a , 23 ^b , 24 ^c , 25 ^d , 26 ^{bl} , 27 ^{d1} , 28 ^{cl}	Suelo	^a Bacteria aislada de muestra de suelo recolectada en la Urbanización Don Perucho, sector el Arenal, Parroquia Arias, Municipio Libertador del Edo. Mérida. ^b Bacteria aislada del suelo de la Estación del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicada en San Juan de Lagunillas, Municipio Sucre del Edo. Mérida. ^{bl} La muestra fue tomada en la época seca (02/04/08). ^c Bacteria aislada del suelo de la Finca Pedregal-Tucamí, Edo. Mérida. La muestra fue tomada en la época lluviosa (19/09/08). ^{cl} La muestra fue tomada en la época seca (04/04/08). ^d Bacteria aislada del suelo de la Estación Experimental Chama del INIA, Edo. Zulia. La muestra fue tomada en la época lluviosa (19/09/08). ^{d1} La muestra fue tomada en la época seca (04/04/08).	48	183701, 183702, 183703, 183704, 183705, 184501, 184502, 184503, 184504, 184505, 233701, 233702, 233703, 233704, 233705, 234501, 234502, 243701, 243702, 243703, 243704, 243705 , 243706, 243707, 244501, 244502, 253701, 253702, 253703, 253704, 253705, 253706 , 253707, 253708, 253709, 253710, 253711, 263701, 263702, 263703, 263704, 273701, 273702, 273703, 274501, 283701, 283702, 283703,

Tabla 4. Continuación de la página anterior

Número	Tipo de muestra	Procedencia	Cantidad de aislados	Códigos de las cepas en la colección
19	Homóptero	Bacteria aislada de un homóptero colonizado por hongos y bacterias, encontrado por el Dr. Pablo García en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos «Sixto David Rojo» (BIOMI), ULA, Municipio Libertador del estado Mérida.	5	193701, 193702, 194501, 194502 ⁺ , 194503 ⁺ ,
20	Pupa de insecto	Bacteria aislada de una pupa de insecto encontrada por el Dr. Pablo García en las instalaciones de BIOMI, ULA, Municipio Libertador del estado Mérida.	2	203701, 203702,
21	Lepidóptero	Bacteria aislada de un lepidóptero hallado en los alrededores de la Facultad de Ciencias de la ULA, Municipio Libertador del estado Mérida.	1	213701,
22	Conchas de camarón	Bacteria aislada de conchas de camarón provenientes de una camaronera del estado Zulia y donadas por el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la ULA, Municipio Libertador del estado Mérida.	3	223701, 223702, 223703.
29	Caldos de quitina pulverizada	Bacteria aislada de caldos de quitina pulverizada e insoluble, con inóculos de microorganismos provenientes de un jardín urbano del sector El Arenal, del estado Mérida.	9	293701, 293702, 293703, 293704, 293705, 293706, 293707, 293708, 293709,
32, 33	Trampas de quitina colonizadas	Bacteria aislada a partir de 3 g de quitina procesada y donada por el Lic. Carlos Carbonell Arreaza, del área de piscicultura del CIEPE. Las muestras fueron colocadas durante 23 días como trampas para microorganismos quitinolíticos, bajo hojarasca, en la zona boscosa de Santa Rosa, Municipio Libertador del Edo. Mérida.	8	322501, 322502, 322503, 322504, 322505, 332501, 332502, 332503 ⁺ ,

Continúa en la siguiente página

Tabla 4. Continuación de la página anterior

Número	Tipo de muestra	Procedencia	Cantidad de aislados	Códigos de las cepas en la colección
34	Trampas de quitina colonizadas	Bacteria aislada a partir de 3 g de quitina procesada y donada por el Lic. Carbonel del área de piscicultura del CIEPE. Las muestras fueron colocadas durante 23 días como trampas para microorganismos quitinolíticos, bajo hojarasca, en la zona boscosa de Santa Rosa, Municipio Libertador del estado Mérida.	2	342501, 342502 ,
40	Medio de hidrocarburo	Bacteria aislada por el profesor Julio Otoniel Rojas de un medio de hidrocarburo colonizado por contaminantes en los ambientes de BIOMI y perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología «SIXTO DAVID ROJO», de la ULA, Municipio Libertador del estado Mérida. Se utilizó como cepa de control +.	1	SM-BIOMI ,
41 ^e , 42 ^e , 43 ^f	^e Rizósfera de las plantas <i>Ageratum</i> sp. ^f Rizósfera de las plantas <i>Baccharis</i> sp.	Cepa aislada de plantas de <i>Ageratum</i> sp., recolectadas en las minas de roca fosfórica de Monte Fresco, en la zona alta de San Pedro del Río, Municipio Ayacucho, del Edo. Táchira. Perteneció a la colección de cepas del Laboratorio de Biofertilizantes de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Municipio San Cristóbal del Edo. Táchira.	3	MF4 ₁ , MF4 ₂ , MF11 .

: 38 cepas presentaron halos de hidrólisis alrededor de la colonia luego de 4 días de observación. Cada resultado es la medida de tres repeticiones con tres réplicas.

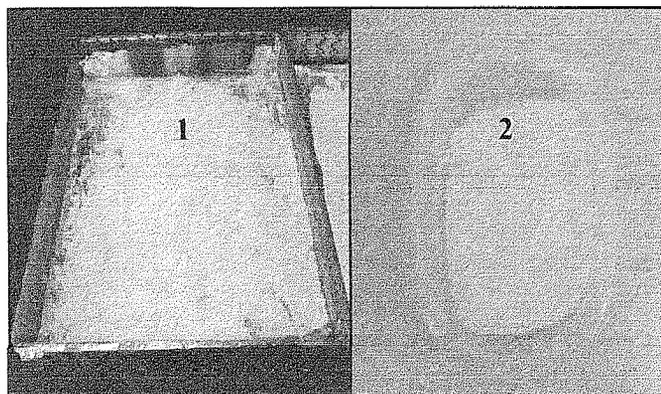


Figura 12. Aspecto físico de la quitina en hojuelas secas (1) y polvo de quitina seca de un tamaño de partícula igual o inferior a 1 mm de diámetro (2).

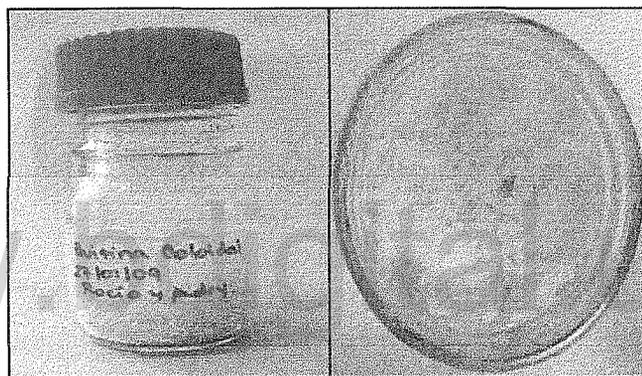


Figura 13. Aspecto físico de la quitina coloidal desmineralizada y desproteínizada con 91 % de humedad y pH mayor a 2.

Con respecto al espectro infrarrojo, la muestra analizada de quitina en hojuelas y QC, se observó que hay correspondencia entre los espectros de ambas quitinas, indicando que no hubo un cambio notable en la estructura de la QC después de ser tratada con HCl a 37 % durante 12 horas. Hubo una disminución en los picos que se encuentran a 3600 , 2800 y 2300 cm^{-1} (Anexo 7).

El empleo, como método de selección, de medios basados en la QC ha sido recomendado por diversos autores, que han verificado una producción notable de quitinasas en ellos, lo cual coincide con lo reportado por Rodas *y col.*, (2009) quienes realizaron una selección rápida de cepas nativas —con actividad quitino-proteolítica— de *Bacillus* sp. en diferentes tipos de suelos tropicales; de igual manera, el estudio realizado por Felse y Panda (1999) y Sakai *y col.*, (1998)

quienes aislaron microorganismos productores de quitinasas a partir de pilas de compost utilizando QC como fuente de carbono. Asimismo, Gómez y col., (2002) mediante el uso de sustratos coloidales coloreados con Remazol Azul Brillante R[®] (CC-RBB), seleccionaron organismos quitinolíticos y evaluaron quitinasas extracelulares.

6.2.- Evaluación de la producción de quitinasa en placa

6.2.1.- Selección de las cepas quitinolíticas

Para realizar la selección primaria y evaluar cualitativamente la actividad quitinolítica de los aislamientos microbianos que habrían de utilizarse en la investigación, se incluyó la evaluación mediante técnica en placa, que permitió observar diferentes morfologías del halo (Figura 14).

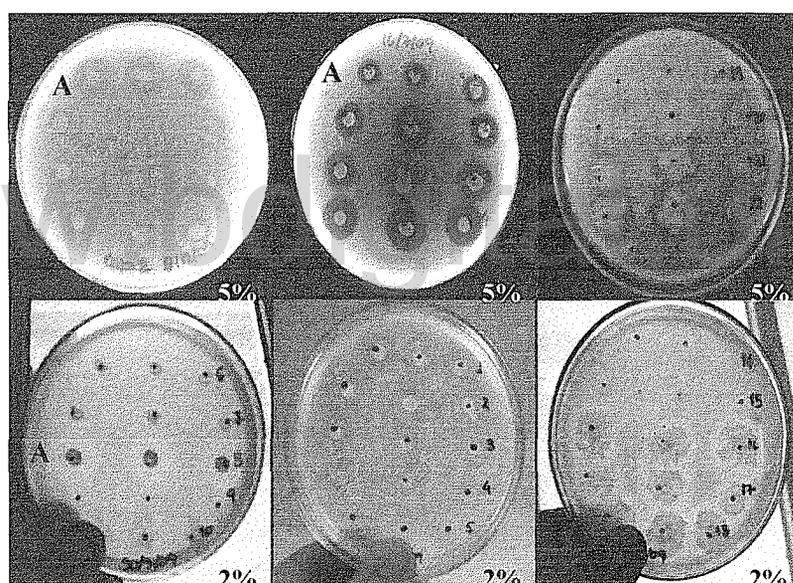


Figura 14. Visualización de la actividad quitinolítica extracelular semicuantitativa, y la diferencia en el diámetro de las colonias, y el crecimiento en placas con agar quitina coloidal al 2- 5 % y sales minerales. Las colonias señaladas con A corresponden a la cepa patrón SM-BIOMI; las no señaladas, a las cepas en estudio. Todas se incubaron a 37 °C durante 96 h.

A partir de 38 diferentes muestras colectadas en los estados Mérida y Táchira, se aislaron y evaluaron un total de 188 cepas, de las cuales 38 fueron capaces de manifestar la actividad extracelular de quitinasa cuando se formaron los halos de hidrólisis (Tabla 4); 92 cepas no generaron halos translúcidos alrededor de las colonias, aunque sí presentaron crecimiento; y 58

cepas no crecieron. En la Figura 14, se muestran los resultados obtenidos con algunas cepas productoras con actividad degradadora de QC. Se puede observar, en este caso, que algunas de ellas resultaron quitinasa-positivas y otras, negativas. Es importante mencionar que en todas las placas se inoculó la cepa SM-BIOMI como testigo positivo para validar los ensayos, por lo que podemos pensar que, al incorporar al medio QC de degradación biológica, los microorganismos degradadores de quitina presentes en las diferentes muestras recolectadas podrían tener una actividad lítica sobre este polisacárido al liberar las unidades de N-acetilglucosamina.

Para delimitar aún más las poblaciones de potenciales productores de enzimas quitinolíticas, se realizaron subcultivos en un medio que contenía únicamente QC, como se observa en la Figura 15. En este medio, sólo crecieron 17 de 38 cepas del banco, por lo que inicialmente se usó este criterio para seleccionar aquellas que tenían un crecimiento satisfactorio, expresado en el diámetro de los halos de degradación —mayor que 1 mm— alrededor de las colonias positivas luego de 7 días de incubación, y continuar con la inspección secundaria.

En consecuencia, el cambio estableció las condiciones que favorecieron el desarrollo de los microorganismos más adecuados, que mostraron un crecimiento abundante en el medio que contenía sólo QC, lo que confirmaba su idoneidad. En contraste, las cepas que presentaron crecimiento, pero no halo de hidrólisis (por lo cual no fueron capaces de degradar la QC y utilizarla como única fuente de carbono para su crecimiento), fueron eliminadas del estudio. Probablemente, trazas de azúcar del medio AN ocasionaron que alcanzaran un crecimiento muy leve en este medio de cultivo; incluso, pudieron perder su capacidad de crecimiento por el déficit de algún microelemento o aminoácido esencial que no fue aportado por la QC y se encontraba en el medio AN (Sastoque *y col.*, 2007).

Del total de cepas analizadas, sólo el 9 % mostró actividad quitinolítica al desarrollar halos translúcidos alrededor de la colonia, con un diámetro promedio total de 1,5 mm; estos resultados confirmarían que las enzimas quitinolíticas desempeñan un papel nutricional secundario, y que la QC no es una fuente importante de carbono y nitrógeno (Barboza-Corona *y col.*, 2003). Se obtuvo un total de 17 colonias con diferente morfología macroscópica: colonias de colores amarillo, blanco, rosado; y texturas cremosas, rugosas; de apariencia circular, puntiforme e

irregular. Estas colonias —se presume— fueron capaces de degradar quitina y utilizarla como única fuente de carbono para su crecimiento; consecuentemente, se sugieren como candidatas para proseguir los estudios en la siguiente fase cuantitativa de selección. Por otro lado, con el fin de establecer una identificación morfológica más acertada, se procedió a realizar la coloración de Gram con los diferentes microorganismos aislados. En la Tabla 5 se indica el diámetro del halo de hidrólisis de las 17 cepas estudiadas. Se observa que la cepa 084505 alcanzó el mayor diámetro de los halos de hidrólisis (2,1 mm), mientras que las cepas 124501 y 194503 presentaron el menor diámetro de los halos en el medio QC (1,0 mm).

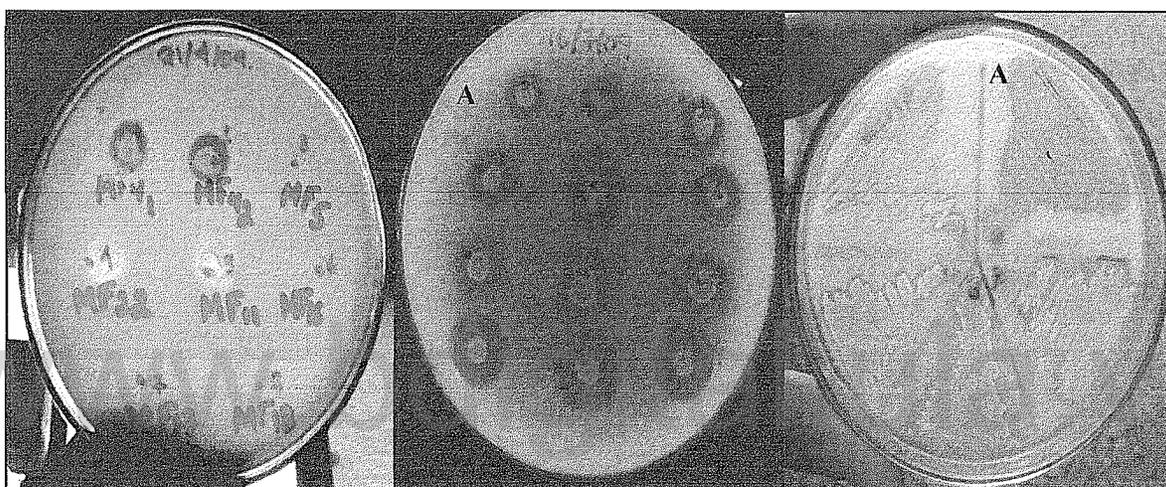


Figura 15. Visualización del crecimiento en placas que contienen sólo quitina coloidal al 5 %, la hidrólisis de quitina coloidal y la diferencia en el diámetro de las colonias. Las colonias señaladas con A corresponden a la cepa patrón SM-BIOMI; las no señaladas, a las cepas en estudio. Todas se incubaron a 37 °C durante 168 h.

Tabla 5. Selección primaria, características macromorfológicas y morfología microscópica de las cepas en estudio por su actividad quitinolítica extracelular semicuantitativa, sembradas con 3 µL en un medio sólido con QC al 5 % (peso húmedo/volumen) e incubadas a 30 °C durante 168 h, tras lo cual se formaron halos de hidrólisis alrededor de las colonias.

Cepas Codificadas	Diámetro de halos de hidrólisis (mm)	Tamaño (mm)	Características macromorfológicas y morfología microscópica de las cepas en estudio										
			Forma	Elevación	Superficie	Densidad	Consistencia	Color	Margen	Crecimiento	Gram	Forma	Motilidad
S.M-BIOMI	1,8	≥2	C	E	Br	O	Cr	Ro	En	Ae	–	Bm	–
014501	1,1	≥2	C	E	L	T	V	Be	En	Ae	–	Cb	+
084501	1,6*	1	I	E	Br	O	V	Be	En	Ae	–	Bg	–

Tabla 5. Continuación de la página anterior

Características macromorfológicas y morfología microscópica de las cepas en estudio													
Cepas Codificadas	Diámetro de halos de hidrólisis (mm)	Tamaño (mm)	Forma	Elevación	Superficie	Densidad	Consistencia	Color	Margen	Crecimiento aeróbico	Gram	Forma	Motilidad
084504	1,4 [*]	1	I	Se	R	O	F	B	On	Ae	-	Bm	+
084505	2,1 [*]	≤1	C	E	L	T	V	A	En	Ae	-	Bg	-
094503	2,0	≥2	I	E	Br	O	V	Be	En	Ae	-	Bp	-
104502	1,6	≤1	I	E	Br	O	Cr	B	On	Ae	-	Bm	-
104503	2,0	1	I	E	Br	O	Cr	B	On	Ae	-	Bg	+
124501	1,0 [*]	≥2	I	E	L	T	V	Be	En	Ae	-	Bp	+
174502	1,1 [*]	≤1	I	Se	L	T	Cr	A	En	+	-	Bp	-
194502	1,1 [*]	≥2	I	E	R	O	V	Be	F	+	-	Bp	+
194503	1,0 [*]	1	I	E	R	O	V	Be	E	+	-	Bg	-
253706	1,2 [*]	1	I	Se	L	O	V	Be	On	+	-	Bm	-
363706	1,4	≥2	C	E	Br	O	V	A	En	+	-	Bm	-
MF4 ₁	1,4	1	C	E	Br	O	V	A	En	+	-	Bm	-
MF4 ₂	1,8	1	C	E	Br	O	V	A	En	+	-	Bm	-
MF11	1,4	≥2	C	E	Br	O	Cr	Be	En	+	-	Bm	+

mm: milímetro de halo de hidrólisis. Estos resultados son el promedio de 7 observaciones.

*Halo luego de 7 días.

C: circular; P: puntiforme; I: irregular; Br: brillante; R: rugosa; L: lisa; E: elevada; Se: sin elevación; O: opaca; T: translúcida; V: viscosa; Cr: cremosa; F: friable; A: amarillo; B: blanco; Bo: blanco opaco; Ro: rosado; Be: beige; En: entero; On: ondulado; F: filamentosos; Bg: bacilos grandes; Bm: bacilos medianos; Bp: bacilos pequeños; Cb: cocobacilo; Crecimiento aeróbico: +: positivo; -: negativo; Motilidad: +: positivo; -: negativo.

En la segunda selección de microorganismos, se determinaron colorimétricamente las actividades extracelulares de quitinasa de los extractos crudos (Figuras 16 y 17). De acuerdo con los resultados, se observó que la mayoría de las 17 cepas promisorias no manifestó actividad en los sobrenadantes. Estos resultados pueden ser explicados como consecuencia de la concentración empleada del inóculo, ya que pudo no haber sido suficiente para lograr observar un efecto hidrolítico en el medio de cultivo, si se consideran los estudios de Patidar *y col.*, (2005) quienes observaron un incremento lineal en la producción de quitinasas cuando la concentración del inóculo aumentaba. Por otro lado, es posible que se haya presentado una pérdida de actividad por parte de estas cepas debido a una unión inespecífica del centro activo de la enzima quitinasa con el sustrato quitina (Álvarez y Del Barrio, 2007): teniendo en cuenta que esta unión no se

efectúa por una simple adsorción inespecífica, sino que tiene lugar a través de una localización concreta de la enzima, llamada centro activo, en que se establecen múltiples interacciones no covalentes entre los aminoácidos que forman el centro activo y el sustrato, puede, de esta manera, no generarse la hidrólisis enzimática de la quitina (Franco, 2007). De igual forma, como se ha señalado previamente, es posible que estas cepas hayan perdido su actividad quitinolítica porque los subcultivos continuos pueden tener efectos negativos en la producción de metabolitos secundarios por parte de los microorganismos. Es así como se supone que esto mismo haya ocurrido con estas cepas en relación con la producción de quitinasas (Taddei *y col.*, 1999).

Asimismo, en este ensayo se evidenció un cambio de color y textura del medio de cultivo (Figura 18); además, el cambio físico de la quitina coloidal indicaba que era probable que estuviera siendo atacada enzimáticamente y las concentraciones de NAG total registradas en los microorganismos aislados podían estar asociadas a la incorporación del producto de la degradación, debido a que la única fuente de carbono que proporcionaba el medio era la QC. Los resultados determinaron que la mayoría de los microorganismos podían crecer en el medio de cultivo, en tanto que no se encontró quitinasa en el sobrenadante de los cultivos, de ahí que no parecían liberar azúcares y, en otros casos, no presentaban crecimiento, a excepción de las cepas SM-BIOMI, BIOMI-363706, MF4₁ y MF4₂. Por tanto, este parámetro fue considerado para la eliminación de cepas que, al parecer, no tenían la capacidad de degradar el polímero muy eficientemente y, en consecuencia, no estaban liberando N-acetilglucosamina, lo cual era el objetivo planteado en este estudio preliminar. En conclusión, de todas las estudiadas, la cepa BIOMI-363706 se consideró idónea para ser empleada como cepa de trabajo en el desarrollo de la investigación por las siguientes razones: fue la que relativamente produjo los más altos niveles de quitinasa, con una actividad específica de 0,46 U mg⁻¹, en comparación con las cepas MF4₁ y MF4₂, en cuyo extracto se observó más proteína y una disminución de la actividad específica. De la misma manera, su actividad específica resultó ser mayor que la presentada por la cepa control (SM-BIOMI). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

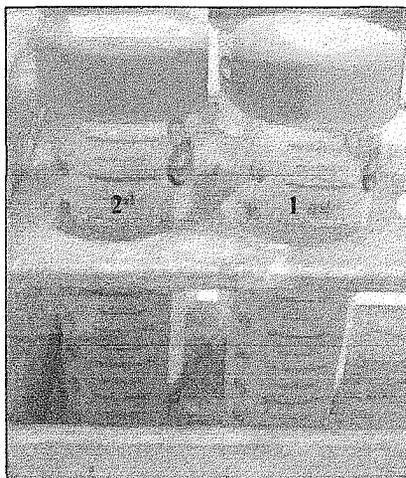


Figura 16. Aspecto macroscópico del extracto crudo enzimático de las cepas MF4₂ (1) y control SM-BIOMI (2), después de centrifugar el cultivo durante 15 min a 3.200 g, y a 4 °C, con inhibidor de proteasas.

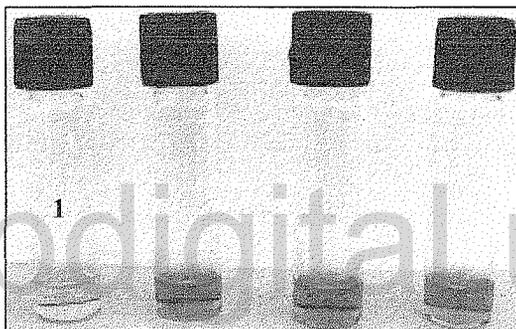


Figura 17. Cuantificación de la actividad enzimática extracelular en el extracto crudo, ensayada de acuerdo con el método colorimétrico señalado en la sección 6.2, en un intervalo de incubación de 1 h. Control negativo (1)

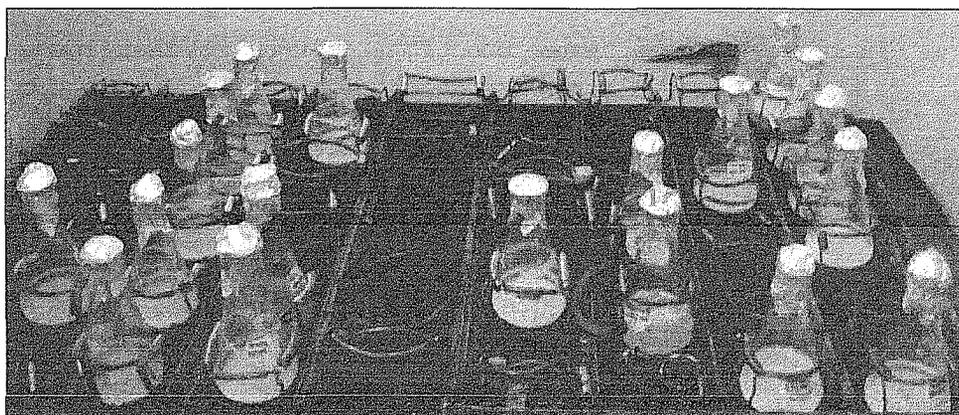


Figura 18. Fermentación de las 19 cepas para determinar de manera cuantitativa la capacidad quitinolítica. Se emplearon medio líquido modificado QC al 2 % (peso húmedo/volumen); 0,1 % K₂HPO₄; 0,05 % MgSO₄. 7H₂O: con pH 7.2. Aspecto y cambio en el color del medio de cultivo de las cepas: BIOMI-363706 (1), MF4₁ (2), MF4₂ (3) y SM- BIOMI (4) como control +. Las condiciones de incubación fueron en todos los casos 30 °C y 180 rpm durante 120 h.

Tabla 6. Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática y específica, tras 60 minutos, secretada por los extractos crudos de las cepas en estudio, cultivadas en 45 ml de medio líquido modificado con adición de quitina coloidal al 2 % (peso húmedo/volumen), con pH 7,2 y como única fuente de carbono, e incubadas a 37 °C durante 120 h, y a 120 rpm.

Cepa	Actividad Extracelular		
	50 °C		
	Proteína Extracelular (µg/ml) ^b	Actividad Quitinasa (U ^a ml ⁻¹)	Actividad específica (Umg ⁻¹)
SM-BIOMI ^b	372,86	108,02	0,29
014501	ND	ND	ND
084501	ND	ND	ND
084504	ND	ND	ND
084505	ND	ND	ND
094503	ND	ND	ND
104502	ND	ND	ND
104503	ND	ND	ND
124501	ND	ND	ND
174502	ND	ND	ND
194502	ND	ND	ND
194503	ND	ND	ND
253706	ND	ND	ND
BIOMI-363706	60,71	27,73	0,46
MF4 ₁	94,64	15,07	0,16
MF4 ₂	63,93	115,25	0,29
MF11	ND	ND	ND

ND = No detectada.

^a Se tomó como 1 unidad (U) quitinolítica la cantidad de enzima que produce un µmol de N-acetil-D-glucosamina en un minuto, bajo las condiciones antes descritas.

^b La concentración de proteínas se midió con el método de Bradford.

^c Control positivo (+). Cada resultado es la media de tres medidas.

En los experimentos realizados por Guo *y col.*, (2004), que consistieron en cultivar una cepa de *Aeromonas schubertii* en presencia de quitina coloidal al 0,2 % p/v, el sobrenadante del medio de cultivo presentó una actividad quitinolítica extracelular de 0,16 U ml⁻¹ al cuarto día de crecimiento, mayor que la del control, que fue de 0,04 U ml⁻¹. Ellos demostraron que varios factores, como la concentración de quitina, el carbono adicional y las fuentes de nitrógeno, pueden influir en la producción de quitinasas. Esto permite sugerir que las cepas en estudio producen altos niveles de quitinasas en un medio que contiene 2 % de QC; en efecto, se ha demostrado una producción más significativa de la enzima al usarse dicha concentración.

6.3.- Caracterización parcial de la enzima quitinasa producida por las cepas BIOMI-363706 y SM-BIOMI

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para un procedimiento de evaluación de la actividad enzimática de quitinasas, se realizó la caracterización parcial de las muestras del extracto crudo enzimático, lo que permitiría estimar los posibles efectos de las variaciones de pH, temperatura, estabilidad térmica, diferentes iones metálicos y EDTA en la actividad de las cepas, y empleando siempre como sustrato la quitina coloidal.

Ya que la función fisiológica de la quitinasa difiere entre los diversos organismos, también sus propiedades físico-químicas y comportamientos enzimáticos son diferentes. En las Figuras 19 y 20 se muestra el efecto de los diferentes valores de pH, que iban desde 2 hasta 11, sobre la actividad quitinolítica de la enzima BIOMI-363706, y se puede observar que el valor óptimo del pH estaba comprendido entre 6,0 y 6,5, para las dos cepas, cuando la reacción se incubó durante 30 min a 50 °C y 37 °C, respectivamente. El comportamiento de cada curva es distinto, especialmente en el rango alcalino.

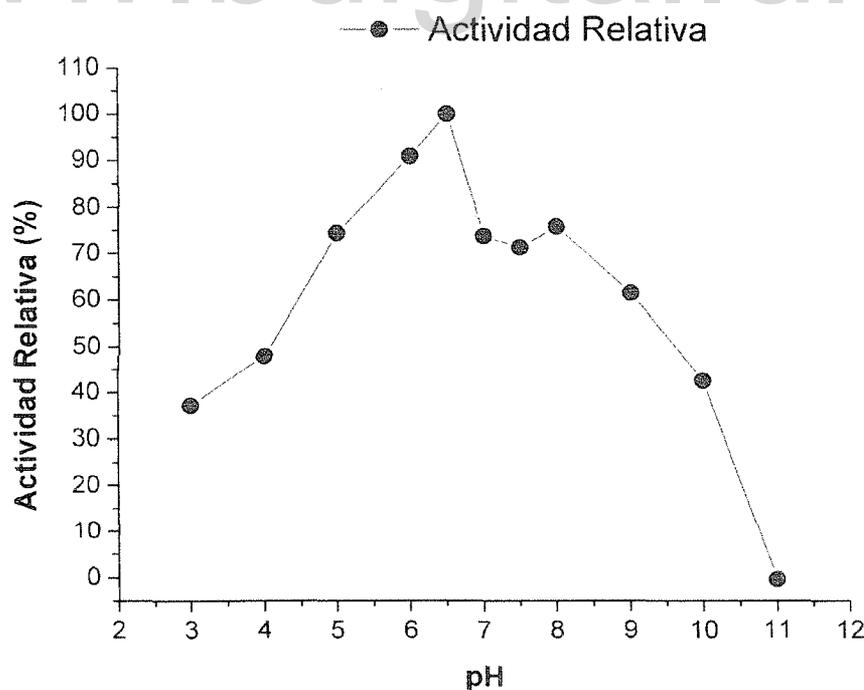


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de BIOMI-363706. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos.

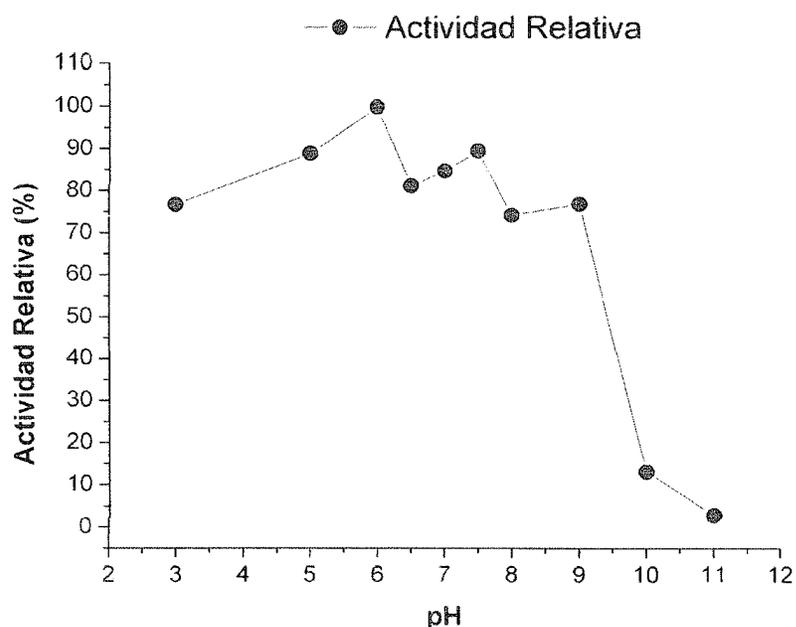


Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de BIOMI-363706. La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 30 minutos.

En las Figuras 21 y 22 se muestra el efecto del pH sobre la actividad de la enzima SM-BIOMI, y se indica que presentaba valores óptimos de pH comprendidos entre 3,0 y 6,5 cuando la reacción se incubó durante 30 min a 37 °C y 50 °C, respectivamente.

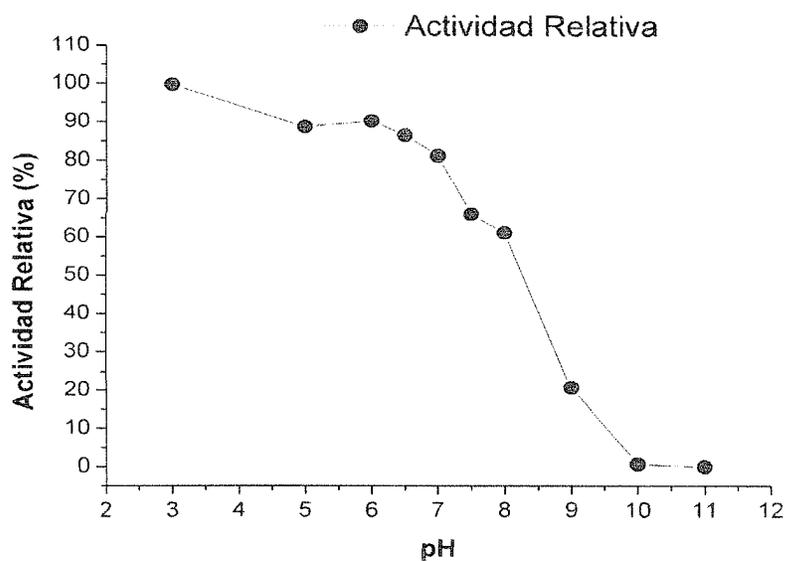


Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 30 minutos.

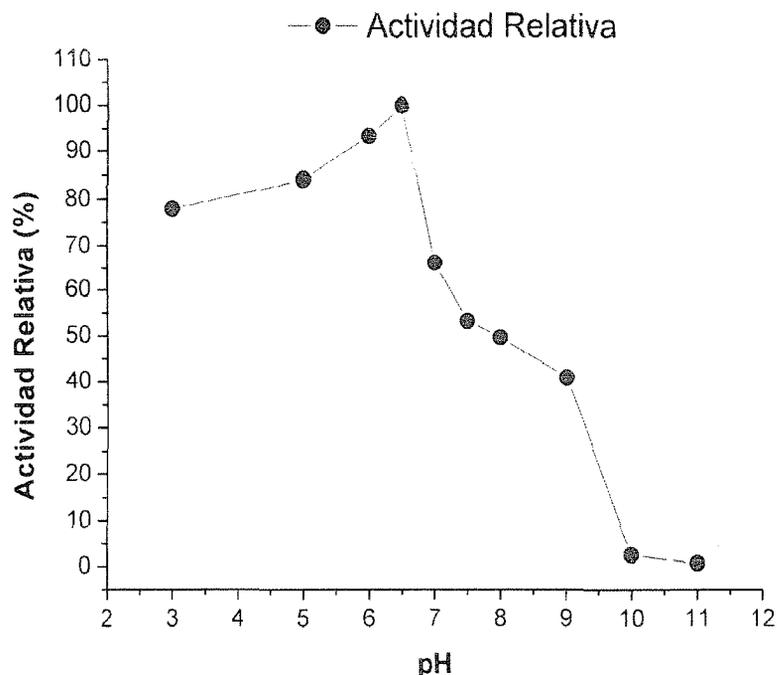


Figura 22. Efecto del pH sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI. La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 30 minutos.

www.bdigital.ula.ve

En cuanto al pH, un factor importante en la producción de exoquitinasas, va a depender de las características del microorganismo utilizado (Matsumoto, 2001). Frente a lo reportado por otras investigaciones, el pH varía dependiendo del lugar de donde se extrajeron los microorganismos, pero el rango para los microorganismos capaces de inducir las enzimas quitinolíticas fluctúa entre 5,5 y 9,0, con un valor óptimo de pH 7,65 (Felse y Panda, 1999). Los resultados se muestran en las Figuras 19, 20, 21 y 22, en las que se puede observar que, con los pH ligeramente neutros (5, 6, 7), las quitinasas se sintetizan mejor que con los pH ácidos (3, 4, 5) o básicos (8, 9), con los cuales la actividad exoquitinasa era mínima. Estos resultados son similares a los reportados con la enzima purificada de la línea TKU015 de *Pseudomonas* sp. (Wang y col., 2008), que usa concha de camarón como sustrato, y la caracterización de dos isoformas de quitinasa de *Vibrio alginolyticus* (Suginta, 2007). Incluso la quitinasa purificada de *Bacillus* sp. 13.26 fue óptima con un pH cercano al neutro (7) (Yuli y col., 2004).

Diversos estudios han probado condiciones de pH distintos, que iban de ligeramente ácidos a alcalinos. En el caso de la quitinasa extracelular termófila de *Bacillus* sp. Hu1, el pH óptimo para

la actividad de la enzima se estableció en 6,5, lo que sugiere que la quitinasa es una enzima casi neutral. Un pH óptimo similar fue reportado para la quitinasa de la *Enterobacter* sp. G-1 (Park y col., (1997) y la de la *P. aeruginosa* K-187 (Wang y Chang, 1997); asimismo, un pH 6 para las de *Bacillus subtilis* W-118 y *Clostridium paraputrificum* (Morimoto y col., 1997). Las quitinasas de *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens* tienen un pH óptimo entre 5,0 y 6,0 (Brurberg y col., 1996).

Algunas quitinasas bacterianas también funcionan mejor con un pH ácido: el *Bacillus cereus* 6E1 con un pH 5,8 (Wang y col., 2001) y el *Bacillus thuringiensis* chiA74 con un pH 6 (Barboza-Corona y col., 2003), mientras que la quitinasa de *Thermomyces lanuginosus* SY2 presentó la mayor actividad con un pH 4,5 (Guo y col., 2008); a su vez, *Aeromonas* sp. DYU-Too7 (Lien y col., 2007) y la bacteria *Ralstonia* sp. A-471 (Mitsuhiro y col., 2005) presentaron un pH óptimo de 5,0; la *Microbispora* sp. V2 (Nawani y col., 2002) un pH 3,0; entretanto, el *Bacillus cereus* presentó un pH óptimo de 5,8 (Wang y col., 2001). En otro experimento realizado por Yong y col., (2005), en el cual purificaron y caracterizaron una quitinasa extracelular producida por la bacteria C4 del género *Sanguibacter*, la enzima mostró una actividad óptima con un pH 4,6 después de la incubación a una temperatura óptima de 37 °C durante 30 minutos, y usando quitina coloidal como sustrato.

Por lo anterior y por nuestros resultados, se puede afirmar que el pH es un parámetro que ejerce influencia sobre la síntesis de quitinasas y cuyo control es importante para evitar pérdidas apreciables de la actividad enzimática. En efecto, la actividad quitinolítica de la cepa BIOMI-363706 decayó 74-81 % de la actividad máxima cuando la reacción se incubó a 37-50 °C, respectivamente. Así mismo la actividad de la SM-BIOMI disminuyó 89-66 % de la actividad máxima cuando la reacción se incubó a 37-50 °C, respectivamente.

De acuerdo con las comprobaciones, se evidenció que la temperatura en la cual los extractos crudos de BIOMI-363706 y SM-BIOMI presentaban mayor actividad era de 50 °C con un pH óptimo de 6 y 6,5, respectivamente, cuando la reacción se incubó durante 30 min (Figuras 23 y 24). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la estabilidad con diferentes temperaturas (Figuras 25 y 26), se determinó que:

- Para valores de temperatura entre 60 °C y 70 °C, la actividad quitinolítica de la enzima de BIOMI-363706 y SM-BIOMI disminuía entre 14 % y 97 %, y entre 50 % y 96 %, respectivamente.
- Para un valor de temperatura de 50 °C, la actividad quitinolítica de la enzima de BIOMI-363706 y SM-BIOMI era de 98 % y 99 %, respectivamente.
- Para valores de temperatura entre 10 °C y 20 °C, la actividad quitinolítica de la enzima de BIOMI-363706 y SM-BIOMI disminuía entre 1 % y 3 %, y entre 1 % y 5 %, respectivamente.
- De acuerdo con lo anterior, se pudo observar que la enzima, por un lado, perdía su estabilidad en más de 97 % al permanecer durante 5 min a 70 °C; y, por otro, se mantiene más activa y alcanzaba su mayor estabilidad entre los 10 °C y 50 °C.

Como puede apreciarse, tal rango de estabilidad les confiere a las cepas cualidades para diversos procesos industriales, por ser comparables con las de la quitinasa de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* K-187, la cual tiene una temperatura óptima para la catálisis de 50 °C, incubada durante 30 min, y su termoestabilidad es menor que 50 °C (Thompson y col., 2001); asimismo, su temperatura óptima oscila entre 40-60 °C, dependiendo de la fuente (Mane y Deshmukh, 2009).

Entretanto, la temperatura óptima de *Streptomyces lividans* es de 50 °C y la quitinasa de *Streptomyces erythraceus* tiene una actividad óptima a 60-70 °C, pero la enzima no es estable por encima de 60 °C (Hara y col., 1989). Según otro estudio, *Streptomyces canus* y *Micromonospora brevicatiana* mostraron una actividad máxima a 40-60 °C. Además, la concentración de sustrato de *Streptomyces pseudogriseolus* mostró una actividad máxima a 40-50 °C. En el caso de la quitinasa purificada de *Bacillus* sp. 13.26, la temperatura óptima fue de 60-65 °C, y su termoestabilidad se mantuvo a 80 °C (Yuli y col., 2004). Por otra parte, la temperatura óptima para la quitinasa de *Planococcus rifitoensis* cepa M2-26 fue de 70 °C, y la estabilidad de la enzima mantuvo más del 88,5 % de la actividad original en el rango de temperatura de 40-70 °C y el 82 % de su actividad original a 80 °C (Essghaier y col., 2010). De acuerdo con los resultados de caracterización de una quitinasa extracelular producida por la bacteria C4, usando quitina coloidal como sustrato, la enzima presentó una temperatura óptima de 37 °C y mantuvo la estabilidad en el rango de temperatura de 25-50 °C; más del 75 % de actividad a 50 °C y cerca

del 50 % de actividad a 60 °C después de 1 h; y la quitinasa se volvía inactiva completamente a 80 °C (Yong *y col.*, 2005). De forma parecida, la enzima quitinolítica de *Serratia plymuthica* HRO-C48 presentó una actividad óptima a una temperatura de 55 °C con pH 5,4, mostrando al menos el 50 % de actividad en un rango de 16 °C con pH 4,6, y 68 °C con pH 7,2 (Mane *y Deshmukh*, 2009).

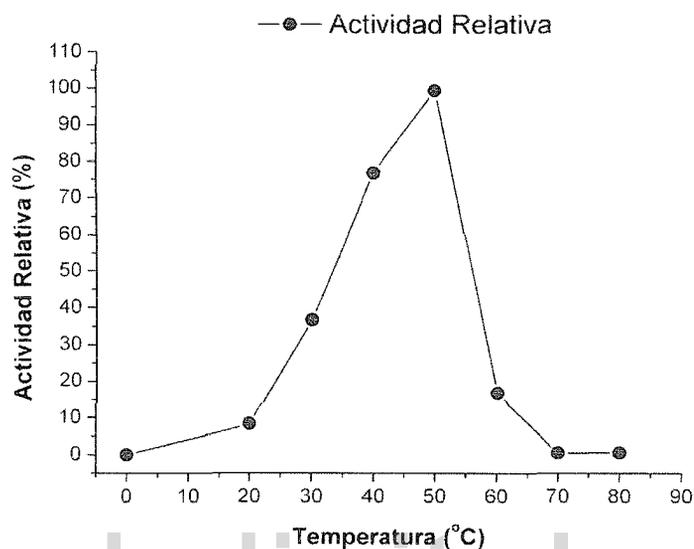


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI. La reacción se llevó a cabo con pH 6,5 durante 30 min.

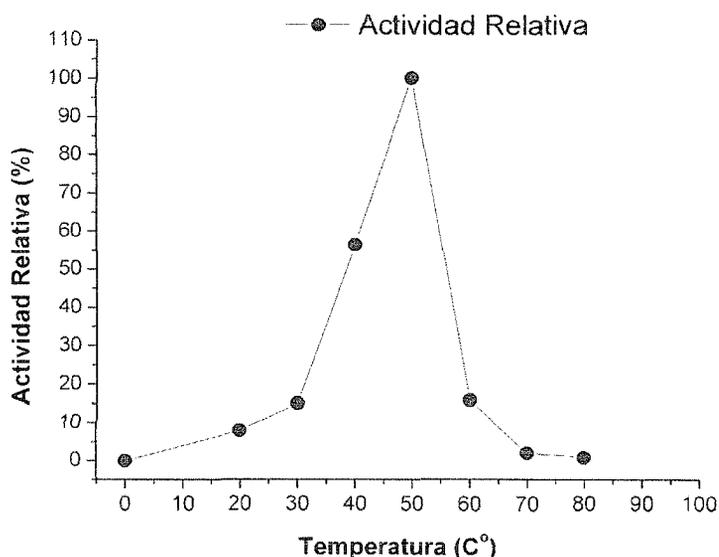


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto crudo de BIOMI-50.5/06. La reacción se llevó a cabo con pH 6 durante 30 min.

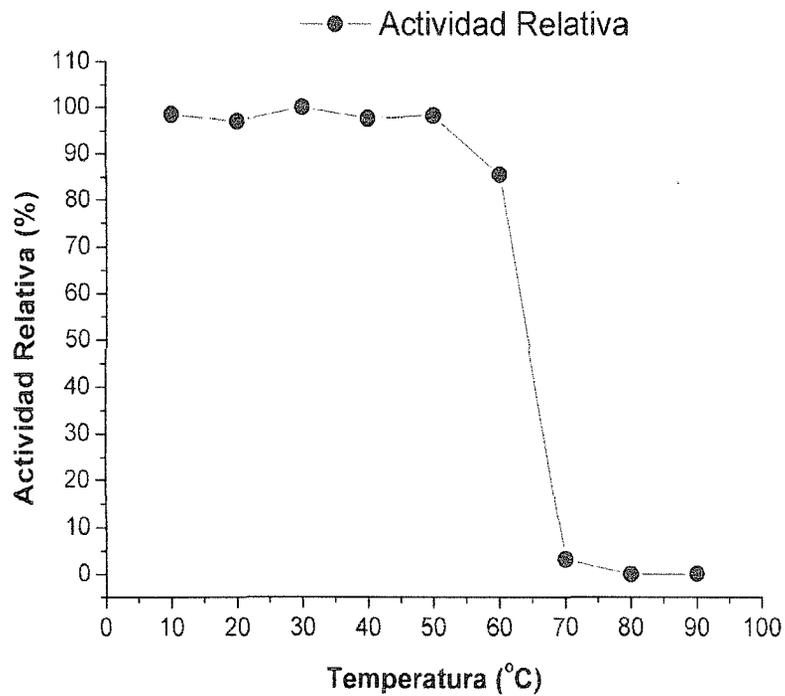


Figura 25. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica del extracto crudo de BIOMI-363706 a diferentes gradientes de temperatura y con un pH 6,0 durante 5 min.

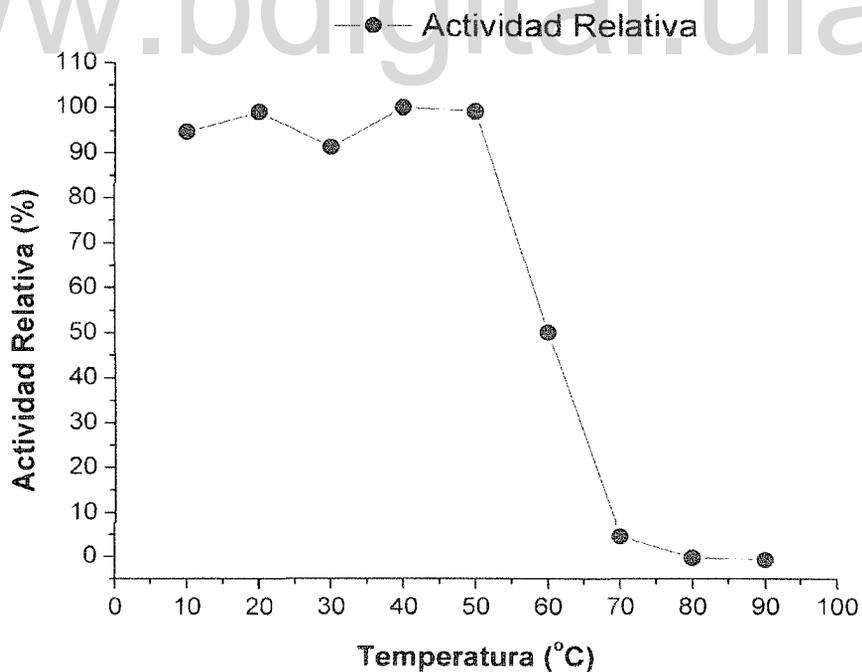


Figura 26. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica del extracto crudo de SM-BIOMI a diferentes gradientes de temperatura y con un pH 6,5 durante 5 min.

6.4.- Evaluación del efecto de los iones metálicos y EDTA sobre la actividad enzimática

Cuando se evaluó el efecto de varios cationes divalentes sobre la actividad de la quitinasa, se pudo comprobar que ésta fue ligeramente activada, respecto al control EDTA al 100 %, por Mn^{+2} y Ca^{+2} , tanto en el caso de SM-BIOMI como de BIOMI-363706. Incluso, no se observaron pérdidas significativas de la actividad cuando las enzimas se ensayaron en presencia de Mg^{+2} , Zn^{+2} y Co^{+2} (Tabla 7). Estos datos indican que, probablemente, los iones pueden actuar como activadores de la quitinasa o, posiblemente, que mejoran la estabilidad molecular de la enzima (Bhushan y Hoondal, 1998). Asimismo, sugieren una regulación de las quitinasas por la concentración fisiológica de cationes divalentes in vivo (Park y col., 2000).

Tabla 7. Efecto de varios compuestos químicos sobre la actividad del extracto crudo de SM-BIOMI y BIOMI-363706. La reacción se llevó a cabo por preincubación de las enzimas en 50 mM de un buffer fosfato en presencia de cationes (sales de cloruro) y EDTA como control referencia, a temperatura óptima y con pH 6,0 y 6,5 durante 30 min.

Químicos	Concentración	Actividad Relativa (%) ^a	
		SM-BIOMI	BIOMI-363706
EDTA	0.1 mM ^b	98	109
Mg^{+2}	2 mM	90	83
Ca^{+2}	2 mM	100	84
Mn^{+2}	2 mM	97	100
Zn^{+2}	2 mM	90	85
Co^{+2}	2 mM	84	87

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

^a Los resultados son la media de tres valores.

^b Se utilizó una concentración menor debido a que posee baja solubilidad.

Reportes del efecto de los iones metálicos sobre la quitinasa purificada de *Bacillus* sp. 13.26 señalan que es activada por Mg^{+2} y Ni^{+2} en 131 % y 116 %, respectivamente (Yuli y col., 2004), mientras que es completamente inhibida por Mn^{+2} y Co^{+2} , y casi en un 50 % inhibida por la adición de Ca^{+2} , en una concentración de 2 mM. Por otra parte, en un experimento realizado por Wang y col., (2008) la actividad de la enzima purificada de la línea TKU015 de *Pseudomonas* sp. fue inhibida completamente por Fe^{+2} y Mn^{+2} , usando concha de camarón como sustrato. Asimismo, en un trabajo realizado por Patil y col., (2000) en el cual utilizaron una cepa de *C.*

lindermuthianum, se encontró que Ni^{+2} y Mn^{+2} son inhibidores de quitinasa; mientras que la quitinasa de *Bacillus* MH-1 es activada por Ca^{+2} y Mn^{+2} (Sakai y col., 1998). De acuerdo con los resultados obtenidos por Kim y col., (1992) del efecto de varios iones inorgánicos sobre una quitinasa purificada de los tejidos maduros de la cebolla verde, se observó que la mayoría de los iones metálicos (Mn^{+2} , Na^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2}) no afectó significativamente la actividad enzimática, salvo dos de ellos (Ag^{+2} y Hg^{+2}), que sí la inhibieron en una concentración de 10 mM; mientras que Fe^{+2} , Ca^{+2} y Ba^{+2} activaron la enzima en un 20 %. Se ha mostrado que los aminoácidos se unen a ciertos cationes bivalentes en los sitios activos de las quitinasas, lo que posiblemente las inhibe (Milewski y col., 1992). Por su parte, Morales de la Vega y col., (2006) para estudiar el efecto de los iones metálicos en la actividad de la quitinasa del *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai, incubaron la mezcla durante 60 min a 50 °C; mostraron que la actividad enzimática fue completamente inhibida por Hg^{+2} , y sólo con Co^{+2} y Mg^{+2} hubo un ligero incremento de ella. Por lo tanto, un efecto de la inactivación de Hg^{+2} sugiere que hay grupos tiol en el centro activo enzimático; esto puede indicar el posible papel de la cisteína u otro tiol-aminoácido implicados en el sitio catalítico de la enzima.

Park y col., (2000) reportaron un aumento de 106 % de la actividad quitinasa de una bacteria marina, *Vibrio* sp. 98CJ11027, en 5 mM de EDTA, con respecto a otra muestra que no los tenía. Tales resultados apoyan los que obtuvimos en esta experiencia. De igual forma, experimentos realizados por Molinari y col., (2007) —en los cuales se analizó la actividad quitinasa en extractos de estómago, intestino y en el suero de la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*— indicaron que, al utilizar 0,1 mM de EDTA, se conseguía un fuerte efecto inhibitorio de 21,42 % sobre la quitinasa en el sustrato artificial 4-methylumbelliferil β -D-N,N'-diacetylchitobioside (4MU[GlcNAc]₂); mientras que, en 4-methylumbelliferil β -D-N, N', N''-triacetylchitotrioside (4MU[GlcNAc]₃), la actividad fue totalmente inhibida. En el caso de una quitinasa procedente de la nueva línea TKU015 de la especie *Pseudomonas* sp., y usando conchas de camarón como sustrato, se determinó que una concentración de 10 mM de EDTA producía un efecto inhibitorio sobre la quitinasa de 25 % en relación con el control (Wang y col., 2008). De igual manera con el efecto del agente quelante en la exoquitinasa del *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai, en una concentración de 0,1 %, ya que los resultados indicaron que la actividad fue significativamente

inhibida en casi el 26 % por EDTA, lo que sugiere que el efecto podría implicar una metaloenzima (Morales de la Vega y *col.*, 2006).

6.5.- Evaluación de la actividad quitinolítica con el empleo de diferentes sustratos, como quitina en polvo, quitina coloidal y glicol quitina

Para evaluar la influencia generada por el sustrato sobre la actividad quitinolítica, se emplearon los extractos enzimáticos de BIOMI-363706 y SM-BIOMI. En los resultados obtenidos, en términos de velocidad relativa sobre diferentes sustratos siguió este orden: quitina coloidal > polvo de quitina (<1mm) > glicol quitina, como puede verse en las Figuras 27 y 28.

La actividad de las enzimas sobre diferentes sustratos se encuentra relacionada con la naturaleza de cada uno de éstos. La QP es insoluble en soluciones acuosas, la QC es más hidrosoluble que la QP, mientras que la modificación química del GQ (*O*-2-hidroxietil-quitina) la convierte en un sustrato de alta hidrosolubilidad en relación con la QC y la QP. La baja actividad de las enzimas sobre la QP se debe, muy probablemente, a la baja accesibilidad del sustrato como producto de su escasa hidrosolubilidad. Por otro lado, es posible que la modificación química del GQ haya podido afectar el reconocimiento de los sitios de corte de las quitinasas en estudio.

Basándonos en los resultados, la alta preferencia de ambas enzimas por el sustrato QC se debe, en gran medida, a la separación previa de las moléculas del polisacárido mediante el hinchamiento inducida por ácido clorhídrico concentrado, en comparación con la estructura cristalina de la quitina en polvo, que produce una reacción más lenta, y con la glicol quitina, que es prácticamente inactiva como sustrato. La mejor acción sobre materiales coloidales ha sido explicada suponiendo que, en este caso, las moléculas del sustrato son más accesibles a la enzima que la más densa y cerrada organización molecular presente en la estructura nativa cristalina de los sustratos sólidos, en que las fuerzas intermoleculares, es decir, los puentes de hidrógeno que pueden formarse entre dos grupos hidroxilos (HO — HO), el hidrógeno del grupo amida y los oxígenos de los grupos hidroxilos (HO — HN), y los hidrógenos de los hidroxilos y el grupo carbonilo (C=O — HO), otorgan una mayor estabilidad a la estructura. Además, el mayor tamaño de la molécula de quitina podría constituir un impedimento estérico que evite, en cierta forma,

alcanzar el sitio receptor y, por tanto, el reconocimiento (Cowling y Brown, 1969; González y col., 2002). No obstante, para explicar mejor estos resultados es necesario tener en cuenta otros factores; por ejemplo, el tipo de quitina que está utilizando el microorganismo como sustrato durante las fermentaciones, de las cuales fueron obtenidos los extractos enzimáticos; es necesario considerar el efecto de otras enzimas hidrolíticas que, probablemente, pueden estar presentes en tales preparaciones, ya que se ha descrito que estos polímeros complejos requieren de la participación de diferentes actividades enzimáticas para su hidrólisis (Manucharova y col., 2004); así como también los diferentes tratamientos físicos realizados a la quitina (la molienda), los cuales desempeñan un papel importante en la especificidad del sustrato.

Según Sastoque (2005), la diferencia entre los sustratos quitina coloidal y cutícula de coleóptero molida va a depender del tamaño y la forma de sus partículas, la concentración de quitina, la facilidad de contacto y el reconocimiento por parte de la enzima, lo cual cumple un papel fundamental en la rapidez y las diferencias de la degradación que se manifiestan en la disparidad de los tiempos de concentración de N-acetilglucosamina liberada. Por otra parte, en un trabajo realizado por Llina y col., (2004), se señala que, aparentemente, el tratamiento de la quitina con ácido ortofosfórico genera una pérdida de la disposición regular de las cadenas de N-acetilglucosamina, lo que provoca un aumento del número de regiones amorfas y, por ende, afecta la estructura cristalina al no presentar un ordenamiento regular y deja estos puntos más accesibles a la acción de las hidrolasas.

El empleo de medios basados en la quitina coloidal ha sido analizado por Gómez y col., (2002): la actividad de la quitinasa sobre sustratos sólidos y coloidales coloreados con Remazol Azul Brillante (RBB) muestra mejores resultados, ya que las moléculas del sustrato son más accesibles a la enzima que cuando poseen el ordenamiento conformacional regular, presente en la estructura de los sustratos estrictamente sólidos, como la quitina molida. Asimismo, en experimentos realizados por Dai y col. (2011), en los cuales la especificidad de la quitinasa extracelular de *Bacillus* sp. Hu1 termófilo fue estudiada en siete sustratos. Se evidenció que la actividad relativa de la quitinasa sólo alcanzó un porcentaje de 49,8 % con la quitina en polvo y 3,9 % con el quitosano (80 % grado de desacetilación), en comparación con QC, con la cual alcanzó 100 % bajo las mismas condiciones de ensayo. Sin embargo, no hubo actividad cuando

se utilizaron, como sustratos, quitosano (95 % grado de desacetilación), carboximetilcelulosa, celulosa y almidón soluble. Por tanto, concluyeron que la quitinasa de este estudio tenía una alta especificidad sólo para hidrolizar enlaces glicosídicos entre GlcNAc-GlcNAc.

Por su parte, Mitsuhiro y Motoo (1992), al observar la especificidad, descubrieron que la quitina coloidal y el etilenglicol quitina eran los mejores sustratos ensayados, ya que fueron efectivamente hidrolizados por las quitinasas I y II purificadas de *Aeromonas* sp. Por el contrario, la actividad fue significativamente menor con la quitina y el quitosano, y no hubo actividad en los sustratos pNPGlcNAc y N,N'-diacetylquitobiosa.

Lee y col., (2007) reportaron que la quitinasa de *Bacillus* sp. DAU101 mostró la mayor especificidad sobre los sustratos de quitina purificada (100 % de actividad relativa) entre todos los sustratos ensayados —en una concentración de 0,25 %—, tales como la quitina coloidal (28 %), el glicol quitina (no detectado), el quitosano soluble (19 %), el glicol quitosano (no detectado) y la carboximetilcelulosa (CMC, no detectada). Estos resultados indicaron que la enzima no podía hidrolizar los sustratos glicol quitina, glicol quitosano y CMC, pero sí QC y el quitosano.

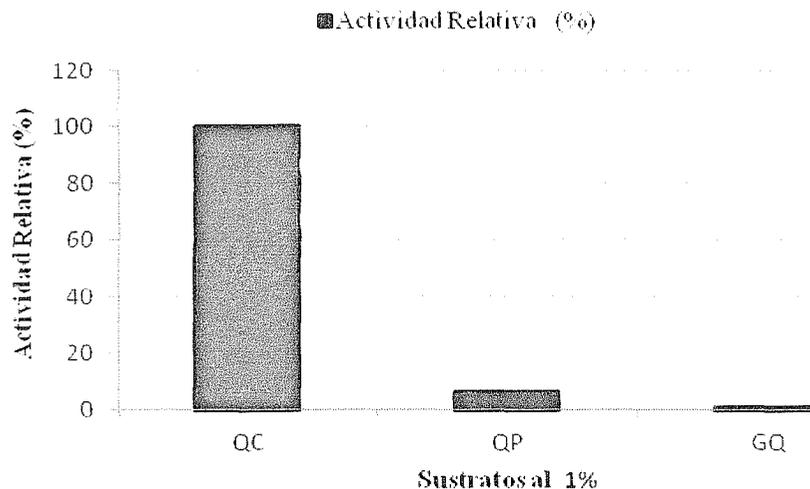


Figura 27. Especificidad en diversos sustratos de la quitinasa de BIOMI-363706.

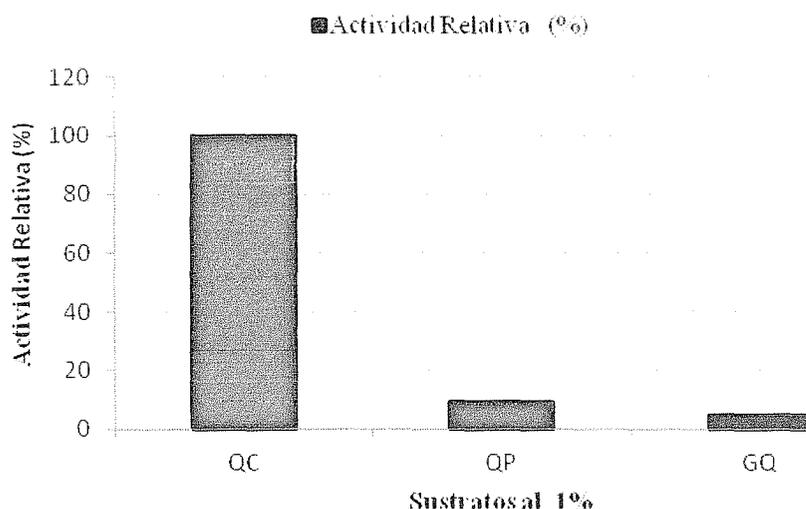


Figura 28. Especificidad en diversos sustratos de la quitinasa de SM-BIOMI.

6.6.- Estudio del K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ de las quitinasas en la preparaci3n cruda con la utilizaci3n de la quitina coloidal como sustrato

El efecto de la concentraci3n del sustrato sobre las actividades de las quitinasas BIOMI-363706 y SM-BIOMI se estudi3 mediante el uso de al menos 5 diferentes concentraciones de sustrato. La velocidad inicial se determin3 a partir del aumento de la concentraci3n de QC como sustrato polim3rico insoluble. Los valores de los par3metros cin3ticos que definen a una enzima se calcularon a partir de la representaci3n de los dobles r3ciprocos o m3todo de Lineweaver-Burk ($1/v_0$ versus $1/[S]$), para la representaci3n lineal, en que v_0 y S son la velocidad inicial de hidr3lisis y la concentraci3n de sustrato, respectivamente; de manera que muestran su m3xima actividad bajo condiciones 3ptimas de pH y temperatura. La actividad extracelular BIOMI-363706 y SM-BIOMI, siguen una cin3tica de Michaelis-Menten. (anexo 11) Los resultados obtenidos de las Constantes de Michaelis (K_m) y Velocidades m3ximas ($V_{m\acute{a}x}$) aparentes en este ensayo est3n representados en la Tabla 8. Ambas enzimas tienen valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ claramente parecidos, tanto por su especificidad en el sustrato QC como por la velocidad m3xima en la que son capaces de trabajar. Estos valores son aparentes debido a que el sustrato es insoluble y las enzimas no est3n purificadas, lo cual impide aplicar los criterios de una cin3tica Michaeliana estricta.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la quitinasa BIOMI-363706 sobre el sustrato quitina coloidal^a.

Enzima	<i>K_m</i> (mg/ml)	<i>V_{máx}</i> (μ mol/min)
BIOMI-363706	1.278	0,015
SM-BIOMI	1.231	0,045

^a Las concentraciones del sustrato fueron: 2,5, 5, 7, 10 y 15 % (peso húmedo/volumen), y la mezcla de ensayo contenía una concentración enzimática según se describe en el punto 6.2.

En un trabajo realizado por Guo *y col.*, (2004), en el cual compararon los parámetros cinéticos de quitinasas extracelulares de *Aeromonas schubertii* purificadas, se investigó el efecto de la concentración del sustrato quitina coloidal celeste sobre la actividad quitinolítica. Los resultados obtenidos del análisis de datos, en que se utilizaron las representaciones lineales de Lineweaver-Burk, mostraron que las quitinasas correspondientes a 75 kDa (F13) tenían un *K_m* de 2,9 mM y una *V_{máx}* de 0,87 U/mg proteína, mientras que las quitinasas con pesos moleculares de 30, 38 y 75 kDa (F8) alcanzaban un valor *K_m* de 2,6 mM y un valor en la *V_{máx}* de 0,72 U/mg proteína. Curiosamente, después de que estas preparaciones enzimáticas fueron tratadas con etanol al 30 %, su actividad quitinolítica aumentó en forma considerable: si bien mostró un valor de *K_m* que no había cambiado significativamente en la quitinasa de 75 kDa (F13), sí mostró una *V_{máx}* de 1,92 U/mg proteína. Con respecto a la quitinasa de 75 kDa (F8), en la fracción 8, el valor de *K_m* fue de 5,5 mM y el de *V_{máx}* de 1,10 U/mg proteína.

Por otra parte, Arakane *y col.*, (2003) compararon el comportamiento enzimático de formas modificadas de quitinasa de *Manduca sexta* (gusano del tabaco); los análisis cinéticos se realizaron con pH 9, y usando QC como sustrato. Todas las proteínas recombinantes con el dominio catalítico intacto eran activas en relación con el sustrato. Señalaron, además, que los valores de las formas modificadas de quitinasa Chi386 (*V_{máx}*= 13,5 Δ A405/h/ μ M; *K_m*= 29,0 mg/ml), Chi396 (*V_{máx}*= 11,8 Δ A405/h/ μ M; *K_m*= 20,0 mg/ml) y Chi477 (*V_{máx}*= 8,40 Δ A405/h/ μ M; *K_m*= 9,96 mg/ml) eran mucho mayores que el de la proteína recombinante de longitud completa Chi535 (*V_{máx}*= 8,70 Δ A405/h/ μ M; *K_m*= 4,29 mg/ml), lo que indica que dichas enzimas tenían una afinidad disminuida por el sustrato insoluble porque,

presumiblemente, carecían del Dominio de Unión a la Quitina (CBD) quitina. Las actividades catalíticas y de unión a quitina son independientes una de la otra, ya que cada actividad funcional es separada. Los valores de las tres formas extendidas de quitinasa Chi 386(MCBD) ($V_{m\acute{a}x}= 3,49 \Delta A405/h/\mu M$; $K_m= 4,98 \text{ mg/ml}$), Chi 386(MCBD)₂ ($V_{m\acute{a}x}= 4,88 \Delta A405/h/\mu M$; $K_m= 4,67 \text{ mg/ml}$) y Chi 386(RCBD) ($V_{m\acute{a}x}= 3,11 \Delta A405/h/\mu M$; $K_m= 3,18 \text{ mg/ml}$) eran más pequeñas que los de Chi386, y similares a los de Chi535, lo que sugiere que todas tenían una afinidad alta con el sustrato. Concluyeron que la adición de CBD aumentó la afinidad del dominio catalítico de la quitinasa de insectos con el sustrato insoluble porque, posiblemente, la unión de éste en el CBD aumentaba la concentración local del sustrato en los alrededores del sitio catalítico. Sin embargo, la mayor parte de la proteína activa se localizó en la enzima de longitud completa.

Saborowski *y col.*, (1993) realizaron investigaciones del valor de K_m de la quitinasa extraída del estómago y la glándula del intestino medio (hepatopáncreas) del *Euphausia superba* (krill del Antártico). Esta experiencia se llevó a cabo a 35 °C, con pH 6,0 y durante 30 min. El comportamiento cinético de la quitinasa se caracterizó por la curva típica de Michaelis-Menten, la cual mostró un valor de K_m de $0,07 \pm 0,01 \text{ mg Carboximetil quitina-Remazol Violeta Brillante (CM-quitina-RBV)} \cdot \text{ml}^{-1}$. Se observó que, incluso con una concentración de 0,5 mg de CM-quitina-RBV·ml⁻¹, no se detectaba inhibición de la actividad. En comparación con estos resultados, Spindler y Buchholz (1988), tras analizar la quitinasa del *Meganyctiphanes norvegica*, encontraron valores de $K_m= 1,6$ y $5,2 \text{ mg de quitina} \cdot \text{ml}^{-1}$, usando el producto final de detección. La disminuida concentración de saturación media medida aquí puede ser también explicada por las diferentes características del sustrato soluble en comparación con la quitina cristalina, pues aquél es más susceptible del ataque enzimático que ésta, que puede ser atacada desde la superficie. En consecuencia, la afinidad de la enzima al sustrato soluble puede ser aumentada y, así, el valor de K_m aparente disminuido.

Adicionalmente, Yong *y col.*, (2005) purificaron y caracterizaron una quitinasa extracelular producida por la bacteria C4. El experimento se desarrolló mediante la representación de Lineweaver-Burk —la ecuación de Michaelis-Menten en forma de doble recíproco—, y reuniendo las condiciones óptimas para calcular las velocidades de reacción con cada concentración del sustrato (en este caso, QC). Los autores obtuvieron resultados aparentes de K_m

y $V_{m\acute{a}x}$ de 6,95 mg/ml⁻¹ y 10,53 U/min mg⁻¹, respectivamente. Por otro lado, Uria y Chasanah (2005) estudiaron las propiedades cinéticas de una quitinasa proveniente de una cepa bacteriana asociada con una esponja marina. La actividad enzimática fue ensayada con el pH y la temperatura óptimos, y con la concentración final del sustrato en el intervalo de 1 mg/ml a 8,75 mg/ml. Los resultados del efecto de las diferentes concentraciones del sustrato sobre la actividad enzimática sugirieron que las actividades de la enzima obedecían a la curva hiperbólica de Michaelis-Menten, lo que permitió determinar los parámetros cinéticos utilizando las representaciones de Lineweaver-Burk ($1/v:1/[S]$): se encontró que $V_{m\acute{a}x}$ y K_m aparentes de la quitinasa sobre la QC fueron 2,19 U/ml y 16,1 mg/ml, respectivamente.

6.7.- Determinación del peso molecular de los extractos caracterizados mediante electroforesis SDS-PAGE

En la Figura 29 se presenta el gel obtenido, en condiciones desnaturalizantes, de los extractos crudos de BIOMI-363706, sometido uno a ebullición en baño María durante 5 min y otro sin calentar; aquí se observaron, principalmente, 3 bandas proteicas comunes, bien definidas en el perfil de la enzima, las cuales poseían una masa molecular que variaba entre 44, 95 y 117 kDa, siendo éstas las más intensas.

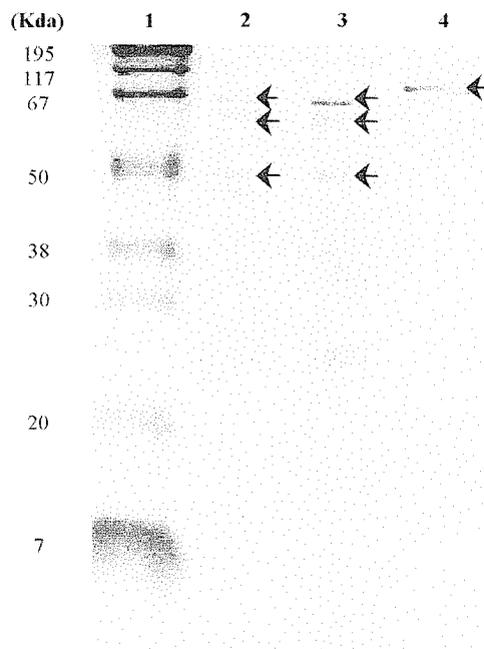


Figura 29. Gel SDS-PAGE al 12 %, bajo condiciones desnaturalizantes, de BIOMI-363706. Las flechas señalan bandas de 44, 95 y 117 kDa Carril 1: Proteínas patrón de peso molecular (3 µL). Carril 2: Extracto crudo de BIOMI-363706 sin calentar (0,73 µg). Carril 3: Extracto crudo de BIOMI-363706 calentado durante 5 min (0,73 µg). Carril 4: Albúmina de suero bovino (0,03 µg). Teñidos con Azul de Comassie.

Los pesos moleculares de las quitinasas bacterianas varían entre 20 y 120 kDa, mientras que los de los actinomicetos fluctúan, en su mayoría, entre 30 kDa y menos, y los de los hongos son superiores a 30 kDa. Es de hacer notar que la mayoría de las quitinasas o quitosanasas de *Serratia* sp. tienen una masa molecular en el intervalo de 35,5-60 kDa (Wang y Chang, 1997; Wang y col., 2010).

Los pesos moleculares de la mayoría de las quitinasas microbianas están en el intervalo de 40 y 65 kDa. En este sentido, Kim y col., (2007), en su experiencia sobre la caracterización de una enzima quitinolítica de *Serratia* sp. KCK, aislada del jugo del kimchi, reportaron que la quitinasa presentó un peso molecular de 57 kDa. Datos similares se han obtenido, mediante electroforesis SDS-PAGE, con una quitinasa de *S. marcescens* QMB1466, la cual presentó un peso molecular de 58 kDa (Green y col., 2005). Asimismo, Brurberg y col., (1994), al analizar una quitinasa de *Serratia* sp. mediante SDS-PAGE, observaron una banda visible de la quitinasa pura de alrededor de 62 kDa.

Por otra parte, el análisis SDS-PAGE de una quitinasa de *Bacillus cereus* reveló cuatro quitinasas diferentes de 35, 47, 58 y 64 kDa en los sobrenadantes del cultivo, el cual creció en un medio que contenía quitina coloidal (Mabuchi *y col.*, 2000). También Ueda y Arai (1992) reportaron la presencia de múltiples formas de quitinasas de *Aeromonas* sp., con pesos moleculares que iban desde 89 kDa hasta 120 kDa. Según ellos, las bacterias pueden producir diferentes formas de enzimas quitinolíticas, probablemente para hidrolizar la diversidad de moléculas de quitina encontradas en la naturaleza. Las diferentes formas de las enzimas se sintetizan en diferentes etapas durante su crecimiento y se expresan de forma diferente en función de los nutrientes de su ambiente.

6.8.- Identificación de las cepas quitinolíticas hasta el nivel del género, según criterios morfológicos y bioquímicos, y mediante el secuenciamiento del ADNr

En la figura 30 se presenta el resultado de la extracción de ADN a partir de las cepas SM-BIOMI y 363706-BIOMI, conforme un protocolo basado en la digestión con proteinasa K (Sección 9.1, Materiales y Métodos). Por tanto, se confirma la presencia de ADN genómico sin fraccionamiento, de alto peso molecular y calidad, para la amplificación mediante PCR.

La amplificación del gen 16S del ADNr generó fragmentos cuyos tamaños llegaron hasta 200 pb, aproximadamente (Figura 31). A continuación, se compararon las secuencias obtenidas (Tabla 9) con las depositadas en 2 bases de datos: National Center for Biotechnology Information (NCBI) y The European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Con estos resultados, se estableció que las secuencias del gen 16S del ADNr de las dos cepas obtenidas a partir de los primers universales (FD₁ y K₂R) tenían un porcentaje de identidad del 100 % para el género *Serratia* sp. Esto demostraba que las cepas SM-BIOMI y BIOMI-363706 pertenecían al género *Serratia*, si nos basábamos en el análisis BLAST de las secuencias obtenidas.



Figura 30. Gel de agarosa al 0,8 % que muestra el ADN genómico de las cepas. Carril 1. SM-BIOMI; 2. 363706-BIOMI

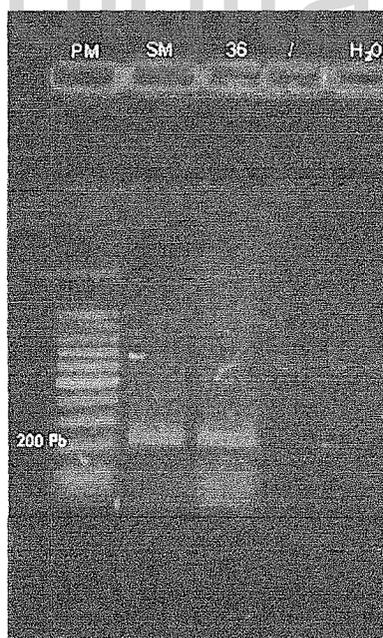


Figura 31. Gel de agarosa al 2 % que muestra los resultados de amplificación del gen 16S del ADNr de las cepas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: ADN genómico concentrado de la cepa SM-BIOMI. Carril 3: ADN genómico concentrado de la cepa BIOMI-363706. Carril 4: Pozo vacío. Carril 5: Agua —control negativo (—).

Tabla 9. Análisis de las secuencias del ADNr 16S e identificación de las cepas.

Cepa	Secuencias del ADNr 16S	Secuencias con alineamientos significativos (BLAST) ^a	% de Identidad	Especie más cercana filogenéticamente
SM-BIOMI ^b	<p>PIF: TGCCGCGTGTGTGAAGAAG GCCTTCGGGTTGTAAGCAC TTTCAGCGAGGAGGAAGGT GGTGAGCTTAATACGTCAT CAATTGACGTTACTCGCAGA AGAAGCACCGGCTAACTCC GTGCCA</p>	Uncultured <i>Serratia</i> sp. 16S rRNA gene, clone H2C-130	100	<i>Serratia</i> sp.
BIOMI-363706 ^b	<p>PIF: CCTGATGCAGCCATGCCGCG TGTGTGAAGAAGGCCTTCGG GTTGTAAAGCACTTTCAGCG AGGAGGAAGGTGGTGAAGT TAATACGTTCAATTGAC GTTACTCGCAGAAGAAGCA CCGGCTAACTCCGTGCCAGC AGCCGCGGTAAT</p>	<i>Serratia</i> sp. YF-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	<i>Serratia</i> sp.

^a Resultados (tomados de la base de datos NCBI) de la técnica de análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del gen que codifica el ARN ribosomal 16S, aplicada a las cepas en estudio.

^b En el caso de estas cepas del género *Serratia* sp., se obtuvo alta similaridad con secuencias de *Serratia marcescens* con identidad de 100 %, (Anexo 8).

Las especies del género *Serratia* son únicas dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae* debido a que segregan muchas enzimas extracelulares, entre las que se incluyen la quitinasa, la lecitinasa, la hemolisina, el sideróforo, la lipasa, la proteasa y la nucleasa (Hines y col., 1988). Esta familia de bacterias está compuesta por un grupo relativamente heterogéneo en cuanto a su ecología y sus huéspedes, lo que agrava su potencial patogénico entre humanos, animales, insectos y plantas. En la actualidad, consta de 30 géneros y se la considera responsable del 50 % de las infecciones nosocomiales, principalmente causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp. y *Serratia marcescens* (Holt y col., 1994). Es importante resaltar que *S. marcescens* produce varias enzimas extracelulares y es uno de los organismos más eficientes para la degradación biológica de la quitina (Hejazi y col., 1997).

En conclusión, tanto los estudios micromorfológicos y macromorfológicos (Tabla 5) como la identificación molecular realizada a las cepas en estudio permitieron obtener una clasificación taxonómica adecuada, que ubicó a las cepas en la familia y el género correctos.

6.9.- Estudio, en una escala de laboratorio, del crecimiento celular y la producción de quitinasa secretada por la cepa BIOMI-363706 en un biorreactor de 6 litros

La producción en escala de laboratorio consideró varios aspectos relacionados al aislamiento del microorganismo elegido: el conocimiento de los principios básicos del funcionamiento celular y del cultivo controlado, la detección de los metabolitos secundarios deseados, la conservación del microorganismo de interés y el diseño del proceso de fermentación microbiana.

En la Figura 32 se puede apreciar que la cepa BIOMI-363706 creció rápidamente sin observarse una fase de adaptación previa al inicio del proceso; debido a que el cultivo estaba adaptado por 3 pases sucesivos en el mismo medio. Se muestra que al comienzo de la incubación, se incrementó; más aún, después de casi 8 h de incubación y hasta las 24 h, aproximadamente, se observó una aceleración en el crecimiento celular (fase exponencial). A continuación, el cultivo entró en la fase de muerte de un modo abrupto (9,64 unidades logarítmicas de UFC), sin que se evidenciase una fase estacionaria clara. Esto puede deberse a la fuente compleja de carbono y nitrógeno, por lo que las células bacterianas tendrían que ajustar su metabolismo para hacer uso del sustrato, así como también a los cambios físicoquímicos en el medio, el agotamiento de los nutrientes o la aparición de metabolitos secundarios que inhibieron el crecimiento. De igual forma, los resultados señalados en la Figura 32 confirman lo obtenido en las experiencias con el Erlenmeyer, en el sentido de que la producción quitinolítica estuvo asociada al crecimiento celular (datos no mostrados).

En cuanto a la enzima, su producción estuvo asociada al crecimiento, es decir, la biomasa y la actividad enzimática se fueron incrementando progresivamente, de modo que se detectó actividad a partir de las 8 h hasta las 48 h, y se mantuvo durante casi 72 h; tras lo cual, se alcanzaron valores máximos de actividad quitinolítica de 2,043 U ml⁻¹ y 10,43 unidades logarítmicas de UFC). Un resultado similar fue publicado por Yuli *y col.*, (2004), quienes demostraron que, al

cultivarse en un medio que contiene quitina coloidal al 0,5 %, y con pH 7, el *Bacillus* sp. 13.26 produce la quitinasa extracelular después de 72 h de incubación.

Así mismo se observó que, durante el tiempo de fermentación, el pH inicial fue 7.22 el cual fue aumentando llegando a un pH de 7,98 a las 120 h. Finalmente, el promedio del pH monitoreado fue de alrededor de 7,8 a los 4 días de fermentación. De acuerdo con estos resultados, se podría pensar que el crecimiento celular y la actividad enzimática afectan de forma sustancial el pH; observándose un incremento del pH en las primera 48 h de fermentación. Sin embargo se requiere realizar más estudios que afirmen esta experiencia.

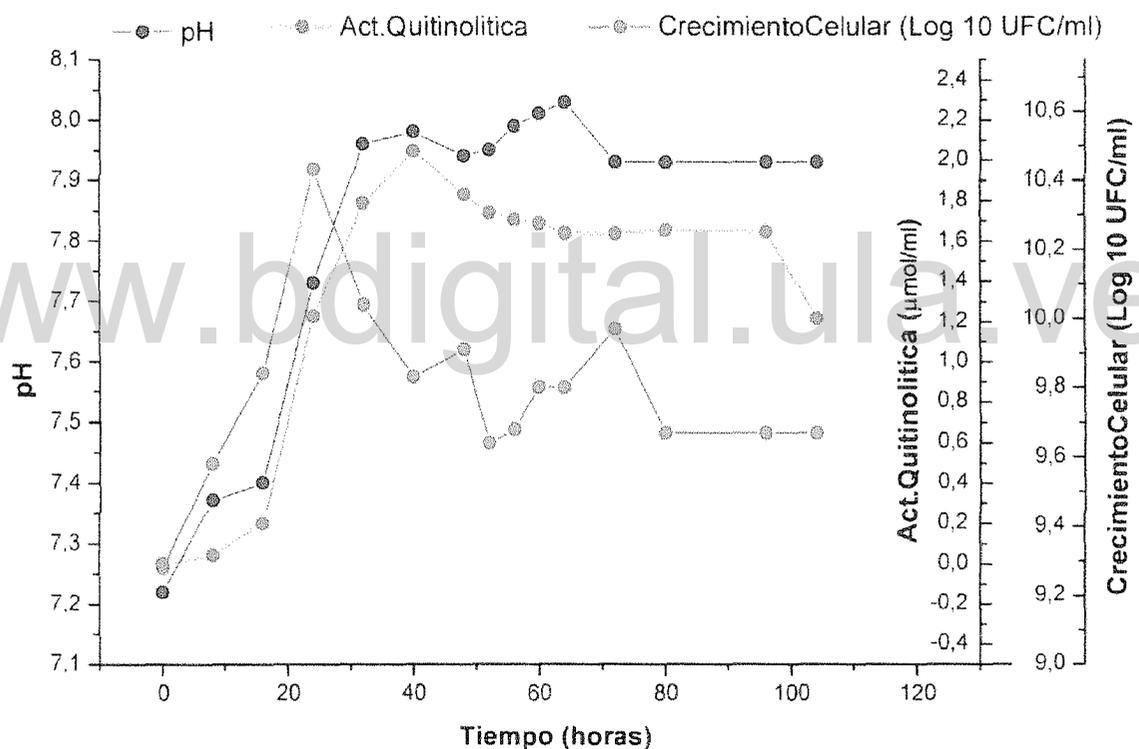


Figura 32. Curva de crecimiento, actividad quitinolítica y producción de enzima quitinasa secretada por BIOMI-363706 en medio mínimo. Las condiciones de operación utilizadas han sido las siguientes: temperatura constante a 37 °C; caudal de aire de 1 L/min; velocidad de agitación constante e igual a 180 rpm; se monitoreó el pH durante el experimento.

En un trabajo reciente realizado por Das (2011), se analizó el desarrollo de la cepa aislada *Serratia* sp., la cual, una vez inoculada, mostró un crecimiento exponencial durante las primeras

18 h, tras las cuales siguió la fase estacionaria. De manera similar, el recuento de células viables se incrementó durante el periodo de cultivo. Por otro lado, si bien no se observó, durante las primeras 14 h, ninguna producción de enzimas, ésta no dejó de aumentar hasta las 92 h (0,25 U/ml); luego, disminuyó progresivamente hasta el final del experimento. El valor mínimo fue observado a las 120 h (0,10 U/ml). De igual forma, experimentos realizados por Singh *y col.*, (2005) demostraron que *S. marcescens* GG5 mantuvo el crecimiento en el cultivo batch durante las primeras 16 h, tras las cuales el conteo de células aumentó a 3×10^9 UFC/ml, de modo que a las 96 h mostró la máxima producción de enzimas (0,2 U/ml); y luego de 120 h la mínima (0,12 U/ml). Además, durante el crecimiento de la bacteria, el pH neutro varió a alcalino. Esto sugiere que cada microorganismo muestra un patrón de crecimiento definido en un cultivo discontinuo debido a que los nutrientes y el oxígeno son el factor limitante para el crecimiento de las bacterias.

6.10.- Acoplamiento de la enzima BIOMI-363706 y una desacetilasa de quitina fúngica para incrementar la desacetilación enzimática de la quitina coloidal

Entre el conjunto evaluado en la sección 5.7.3, referida a la actividad quitinolítica sobre diferentes sustratos, se observó que la QC fue el mejor sustrato para la quitinasa; además, es el más económico después de la quitina en polvo. Se eligió este sustrato para examinar el proceso de su desacetilación al enriquecer los extractos de *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 y *Mucor* sp. BIOMI-00-01 —con actividad CDA— con un extracto de la bacteria *Serratia* sp. BIOMI-363706 —con actividad quitinasa—.

Se realizó un seguimiento de la actividad CDA sobre la QC durante 8 horas, con el enriquecimiento, y sin él, de la actividad quitinasa (Figura 35). Con los extractos de CDA de los dos hongos, se observó que la adición de quitinasa bacteriana incrementaba la pendiente de las curvas y la liberación de acetato. Esto se interpretó como un aumento de la desacetilación del sustrato por efecto del acoplamiento de las actividades CDA fúngicas y la quitinasa bacteriana.

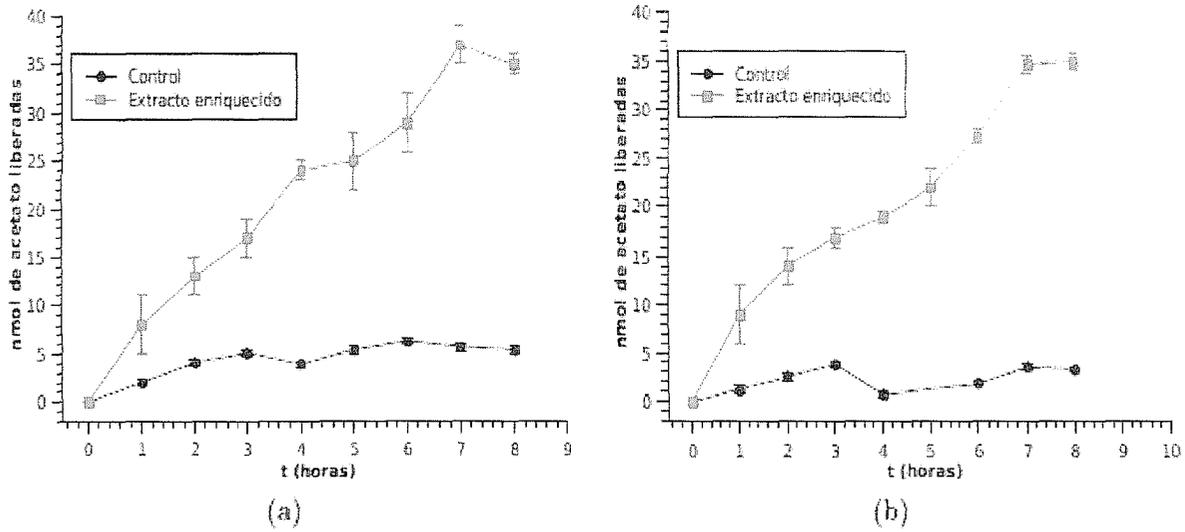


Figura 33. Curvas de actividad de la CDA de *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01 (a) y *Mucor* sp. BIOMI-00-01 (b) en el tiempo, con enriquecimiento, y sin él, de quitinasa de *Serratia* sp. BIOMI-363706. El control es el extracto de CDA sin enriquecimiento.

Cada extracto contenía diferente cantidad de CDA (Tabla 10), y los dos fueron enriquecidos con igual cantidad de quitinasa (76 mU). Se calcularon las velocidades iniciales de la actividad CDA tomando la pendiente de la parte inicial de cada curva (las primeras 3 horas para los controles, y las primeras 2 horas para los extractos enriquecidos). En la Tabla 10 se observa que la adición de quitinasa generó un incremento mayor en la velocidad de la cepa *Mucor* sp. BIOMI-00-01. Por otro lado, al cabo de 8 horas de reacción, los dos extractos fúngicos enriquecidos con quitinasa liberaron 35 μ moles de acetato, y el incremento de las μ moles liberadas por la adición de quitinasa fue más notorio con la cepa *Mucor* sp. BIOMI-CIEPE-01.

Tabla 10. Efectos de la actividad CDA de los extractos, con el acoplamiento de la actividad quitinasa bacteriana y sin él, sobre la desacetilación de QC.

	<i>Mucor sp. BIOMI-CIEPE-01</i>	<i>Mucor sp. BIOMI-00-01</i>
mU de CDA en el extracto	8,5 ± 0,7	4,9 ± 0,2
v sin quitinasa (nmol acetato/min) ^a	1,7 ± 0,2	1,25 ± 0,001
v con quitinasa (nmol acetato/min)	6,7 ± 0,6	6 ± 1
Incremento en v (veces)^a	3,9 ± 0,8	4,8 ± 0,8
µmol acetato liberadas sin quitinasa (8 h)	3,3 ± 0,8	5,4 ± 0,4
µmol acetato liberadas con quitinasa (8 h)	35,0 ± 0,9	35 ± 1
Incremento en µmol acetato liberadas	11 ± 3	6,5 ± 0,6

v: Velocidad inicial.

^aLos incrementos están expresados en número de veces.

El incremento de la actividad CDA sobre la quitina por la presencia de quitinasas ha sido reportado previamente por Alfonso *y col.*, (1992) en estudios sobre la degradación de la pared celular con extractos crudos de *M. rouxii*. En un trabajo similar con *A. nidulans*, también se señaló el incremento de la actividad CDA por la presencia de quitinasa y de β-N-acetilglucosaminidasa, así como la pérdida de actividad CDA en el proceso de purificación, posiblemente por su separación de la endoquitinasa y la subsecuente disminución de la concentración del sustrato. Además, se determinó que la incubación durante 30 horas de una endoquitinasa en presencia de CDA produjo oligómeros de glucosamina (GlcN) de 2 a 6 unidades (Alfonso *y col.*, 1995).

Debido a que en este estudio se detectó cualitativamente actividad quitinolítica en ambas cepas con actividad CDA, ya que se ha reportado la presencia de enzimas hidrolíticas del sistema de degradación de la quitina, como quitinasas y quitosanasas, en extractos miceliales de *M. rouxii* (Pedraza y López, 1989; Alfonso *y col.*, 1992), existe la probabilidad de que los extractos utilizados para la caracterización de la actividad CDA intracelular de las dos cepas de *Mucor sp.* contengan estas enzimas, y de que parte de la actividad CDA determinada pudiese haber sido favorecida por la acción previa de las quitinasas del extracto sobre cada sustrato. Sin embargo, a pesar de la posible presencia de actividad quitinasa en los extractos con actividad CDA, la desacetilación de la QC se vio incrementada de manera notoria por la adición de una actividad quitinolítica de origen bacteriano.

Por otro lado, 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 dentro del polímero y que, por consiguiente, disminuye la longitud de las cadenas, de modo que las vuelve más accesibles a la acción de la CDA.

Sin embargo, Suzuki *y col.*, (2002) reportaron la sinérgica de quitinasas Chi A, Chi B y Chi C1 de *S. marcescens* 2170 en la degradación de la quitina. Ellos propusieron que, a pesar de tener similares dominios catalíticos, había que considerar que la Chi A y la Chi B digieren la cadena de quitina en direcciones opuestas: la Chi A degrada la quitina desde la terminación reductora, mientras que la Chi B lo hace desde la terminación no reductora. La adición de Chi A después de un tratamiento de quitina pulverizada con Chi B, y viceversa, generalmente mejora la eficiencia de la degradación de la quitina.

En la literatura revisada, no se ha reportado el acoplamiento de una actividad CDA intracelular de origen fúngico con una quitinasa bacteriana extracelular. 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.

VII. CONCLUSIONES

El uso del medio agar QC al 2 % (peso húmedo/volumen) permitió la mejor visualización del halo de hidrólisis sobre la superficie durante la recolección inicial.

Las condiciones óptimas encontradas para el crecimiento y la producción de quitinasas fueron: concentración de quitina de 2 % (peso húmedo/volumen); pH de 7,2; incubación a 37 °C durante 120 h y a 180 rpm.

La cepa BIOMI-363706 resultó ser idónea para continuar con el estudio por secretar los más altos niveles de quitinasa.

Se determinó que el pH y la temperatura óptimos, usando extractos crudos de BIOMI-363706 y SM-BIOMI, fueron de 6-6,5, y 50 °C, respectivamente.

Se determinó que el rango de estabilidad presentado por los extractos crudos de BIOMI-363706 y SM-BIOMI se situó entre 10 °C y 50 °C.

Se demostró que la producción de quitinasas pudo ser activada utilizando sustratos químicamente definidos, como la QC al 1 % (peso húmedo/volumen).

Se evidenció que los iones metálicos no ejercen un efecto notorio sobre la actividad quitinasa de las cepas BIOMI-363706 y SM-BIOMI.

El estudio aparente de los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$ de las enzimas, en presencia del sustrato QC en distintas concentraciones, mostró un comportamiento similar en la $V_{máx}$ en la que ambas enzimas son capaces de trabajar y la afinidad por el sustrato.

Se evidencio que el extracto crudo de BIOMI-363706 está compuesto por tres tipos de enzimas.

Mediante la identificación molecular, se confirmó que las cepas SM-BIOMI y BIOMI-363706 pertenecían al género *Serratia* sp.

En los ensayos realizados en el biorreactor, se detectó que la producción de quitinasa de la cepa BIOMI-363706 fue proporcional al crecimiento celular.

Se evidenció que el cambio de pH durante el crecimiento de la bacteria en el biorreactor no ejerció un efecto marcado sobre la actividad quitinolítica.

Se logró el acoplamiento de las actividades quitinasa y CDA provenientes de organismos de especies distintas.

www.bdigital.ula.ve

VIII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Explorar alternativas que involucren la utilización de estas cepas y permitan aprovechar su capacidad quitinodegradante en el tratamiento de los desechos de crustáceos.

Por otro lado, es recomendable evaluar otro tipo de enzimas, como proteasas; y otras quitinasas, como endoquitinasas. La utilización de quitina que aún contiene proteínas y minerales, como la empleada en algunos puntos de este estudio, puede producir mezclas entre las enzimas; esta tesis, por lo demás, se enfocó en determinar la actividad quitinolítica únicamente.

Realizar estudios sobre el efecto de la adición de N-acetil-D-glucosamina u otro tipo de azúcares para potenciar la expresión de las enzimas quitinolíticas, tal como lo establecen las observaciones de muchos otros autores.

En cuanto a la actividad quitinolítica, una diferencia notoria fue el peso molecular de las *bandas observadas mediante electroforesis*, por lo que se recomienda hacer un mejor análisis y una purificación de las enzimas por medio de técnicas cromatográficas, llevar a cabo un seguimiento de su estado de pureza por medio de electroforesis y tener siempre en cuenta la conservación de su nivel de actividad a lo largo de las etapas con el fin de saber su tamaño, peso molecular, estabilidad, pH y temperatura óptimos, todo lo cual generará información para posibles aplicaciones, como la producción de N-acetilglucosaminas y quitooligómeros específicos.

Se recomienda desarrollar un estudio riguroso de los parámetros cinéticos una vez realizada la purificación de las enzimas aquí estudiadas.

Determinar la evolución de las condiciones ambientales de un biorreactor, tales como el flujo de gases, la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la velocidad de agitación o circulación; esto es de gran importancia y debe ser cuidadosamente vigilado y controlado durante la fermentación para maximizar la producción de la enzima en el biorreactor.

Finalmente, se recomienda estudiar los productos de las reacciones del acoplamiento de la enzima BIOMI-363706 y la desacetilasa de quitina, especialmente para verificar la obtención de oligómeros de quitosano y reforzar el planteamiento de este método como alternativa para su obtención y, en un futuro cercano, avanzar hacia la producción industrial por esta vía.

www.bdigital.ula.ve

IX. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo.

1. Medio Nutritivo (AN):

Componentes	Composición
Extracto de malta	3 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Peptona	5 g/L
Glucosa	10 g/L
Agar para medio sólido	18 g/L

Preparación: Mezclar los componentes en un litro de agua destilada y agregar al final el agar; agitar y calentar hasta disolverlos completamente. Esterilizar en el autoclave durante 15 min a 121 °C y 15 lb. de presión.

2. Medio Quitina Coloidal (QC) reportado por Gohel y Naseby (2007):

Componentes	Composición
Extracto de levadura	0,5 g/L
Sulfato de magnesio tetrahidratado ($MgSO_4 \cdot 4H_2O$)	1 g/L
Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4)	1,36 g/L
QC (peso húmedo/volumen)	2-5 %
Agar para medio sólido	18 g/L
Ajustar el pH a 7,2	

3. Medio Quitina Coloidal (QC) reportado por Wang y col. (2008):

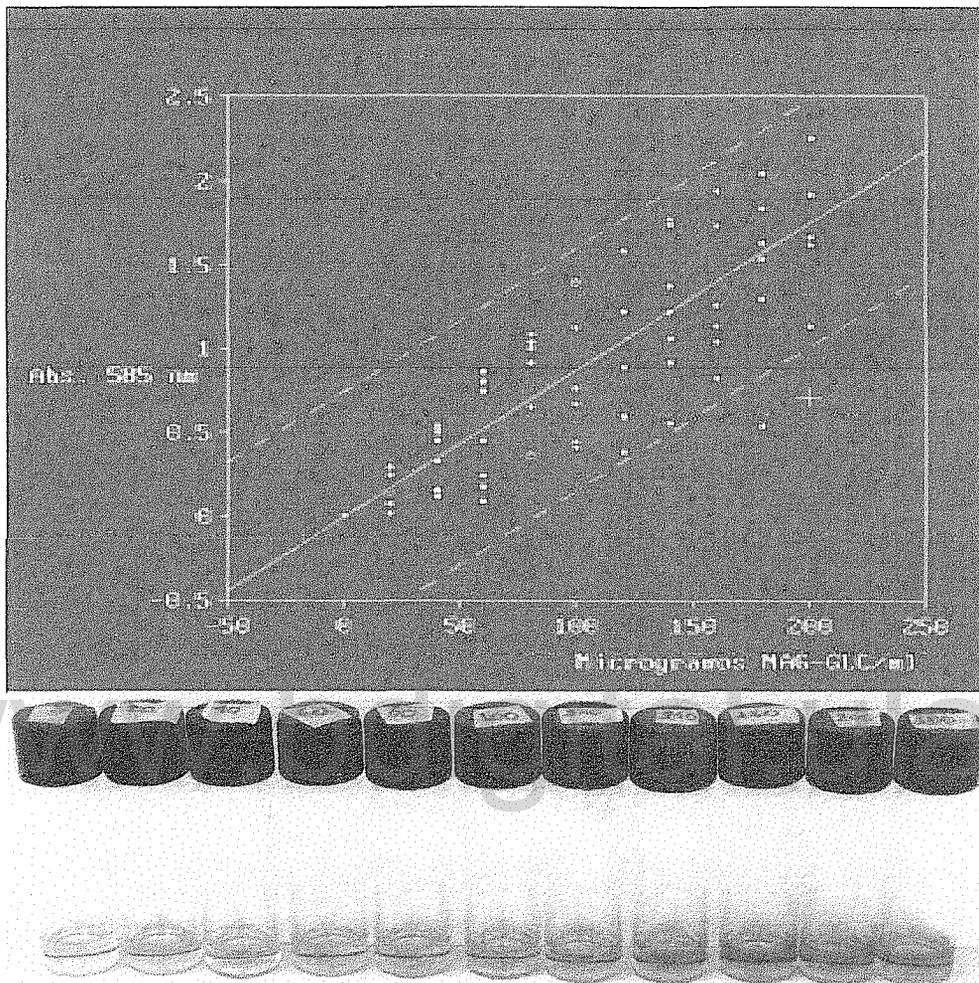
Componentes	Composición
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	0,1 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,05 g/L
QC (peso húmedo/volumen)	2-5 %
Agar para medio sólido	18 g/L
Ajustar el pH a 7,2	

4. Medio Extracto de levadura-Peptona-Glucosa (YPG):

Componentes	Composición (%)
Extracto de levadura	0,3
Peptona	0,5
Glucosa	1

www.bdigital.ula.ve

Anexo 2. Curva de calibración de N-acetilglucosamina obtenida mediante el método colorimétrico de Morgan-Elson, adaptado por Reissig y *col.* (1955).



Ecuación patrón N-acetilglucosamina: $Y = 0,0087x + 0,0066$

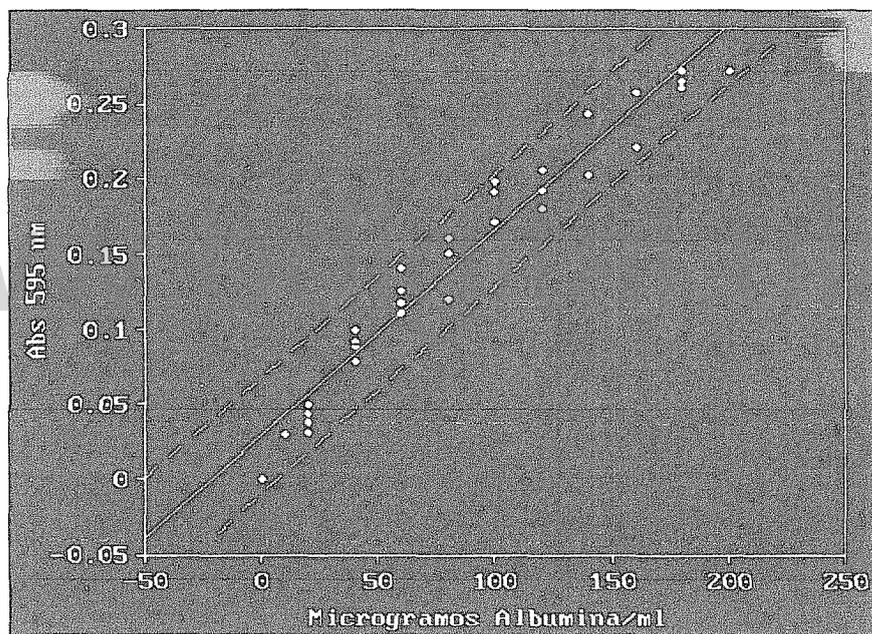
$$R^2 = 0,9972$$

en la que **Y** representa la absorbancia registrada a 585 nm, **x** la concentración de N-acetilglucosamina ($\mu\text{g/ml}$), **b** el punto de corte con el eje **x** y **a** la pendiente.

Procedimiento: Se prepararon 100 ml de solución stock de N-acetyl-D-2-glucosamina ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_6$) con un peso molecular de 221,2 g/mol. y 100 ml de buffer fosfato 0,2 mM. Asimismo, se obtuvieron 11 soluciones de NAG, en concentraciones de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$, agregando primero el buffer en el vial y luego el azúcar con un volumen final de 2 ml. Posteriormente, a 250

μL de cada una de tales soluciones se les adicionaron 40 μL de una solución de borato de potasio 0,8 mM con pH 9,1. La mezcla se sometió a ebullición en baño María durante 3 min. Luego de enfriar, a cada vial se le añadió 1 ml DMAB al 10 % en ácido acético glacial. Finalmente, se procedió a homogeneizar cada vial en un agitador vortex y se llevó a incubar a 37 °C durante 30 min. Las lecturas de las absorbancias fueron realizadas luego de 10 min de desarrollado el color, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de la prueba, el cual se construyó con agua destilada.

Anexo 3. Curva patrón para la cuantificación de proteínas, empleando suero de albúmina de bovino (BSA) como proteína estándar.



Ecuación patrón para la cuantificación de proteínas: $Y = 0,0014 x + 0,0285$

$$R^2 = 0,9765$$

en la que **Y** representa la absorbancia registrada a 595 nm, **x** la concentración de albúmina sérica bovina (μg/ml), **b** el punto de corte con el eje **x** y **a** la pendiente.

Procedimiento: Se elaboró una solución stock de albúmina sérica bovina con concentración de 2 mg/ml. Asimismo, se prepararon 10 soluciones de BSA, en concentraciones de 0-100 μg/ml, agregando en cada vial el Reactivo Comassie Brilliant Blue G-250, y luego la proteína para un

volumen final de 1,1 ml. Finalmente, se procedió a homogeneizar cada vial en un agitador vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente. Las lecturas de las absorbancias fueron realizadas luego de 10 min de desarrollado el color, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de la prueba, el cual se construyó con agua destilada.

Mezcla de Reacción:

Muestra 100 µL

Reactivo Comassie Brilliant Blue G-250 1000 µL

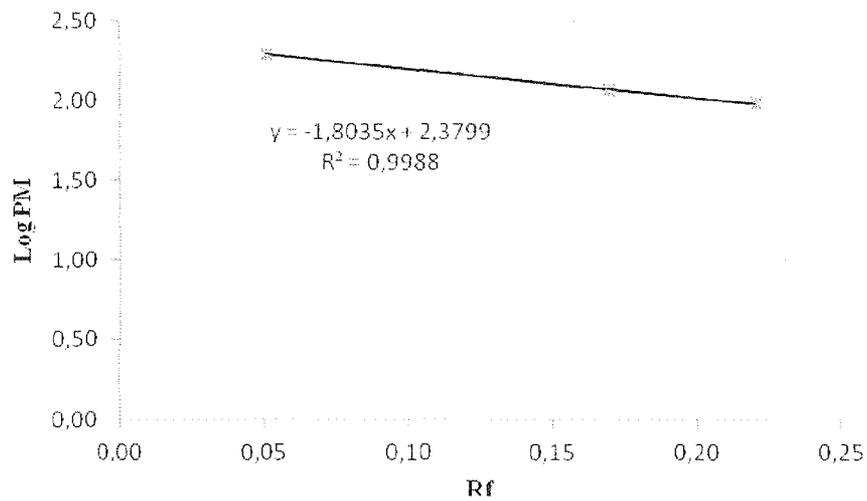
Anexo 4. Representación del marcador de peso molecular de proteínas Bio-Rad Prestained SDS-PAGE standards. Broad range. Cat. No. 161-0318 frente a la movilidad relativa (Rf) en el gel electroforético del ECE, sin calentar durante 5 min.

Proteína	PM (Kda)	Log PM	Longitud en el gel (mm)	Rf
Miosina	195	2,29	10	0,17
B-Galactosidasa	117	2,07	13	0,22
Albúmina de Suero Bovino	67	1,99	15	0,25
Ovoalbúmina	50	1,70	24	0,41
Anhidrasa Carbónica	38	1,58		
Inhibidor de Trypsina de Soja	30	1,48		
Lisozima	20	1,30		
Aprotinina	7	0,85		

Anexo 5. Representación del marcador de peso molecular de proteínas Bio-Rad Prestained SDS-PAGE standards. Broad range. Cat. No. 161-0318 frente a la movilidad relativa (Rf) en el gel electroforético del ECE, calentando durante 5 min.

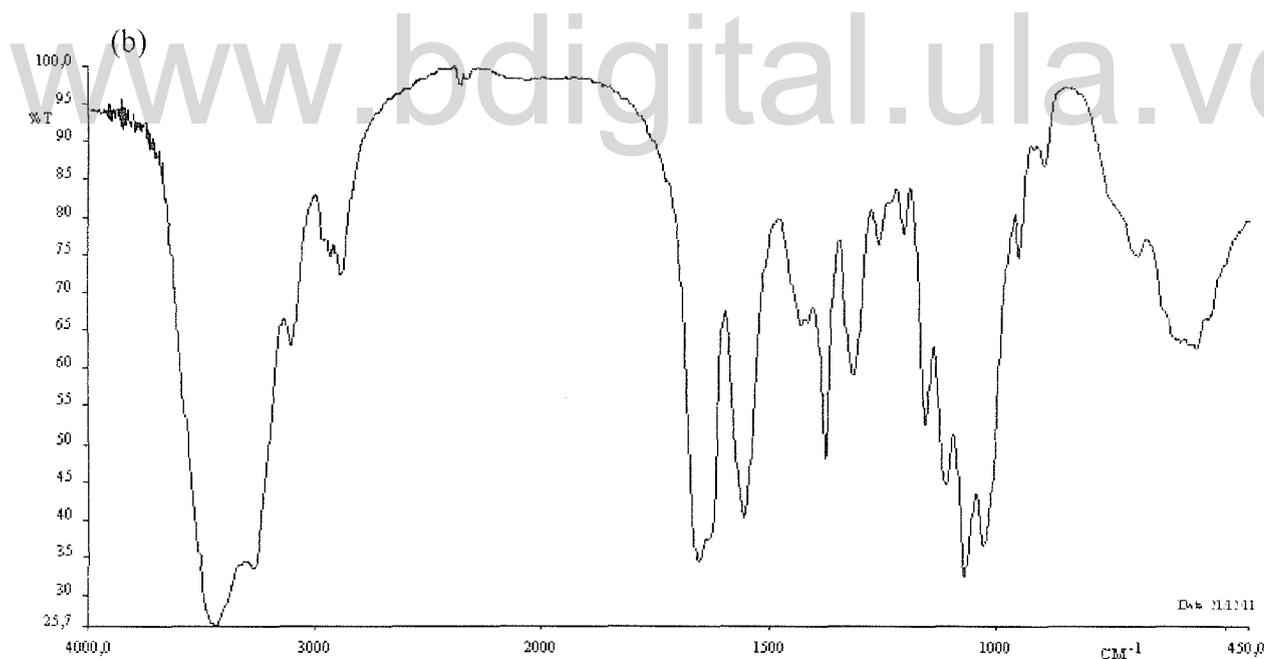
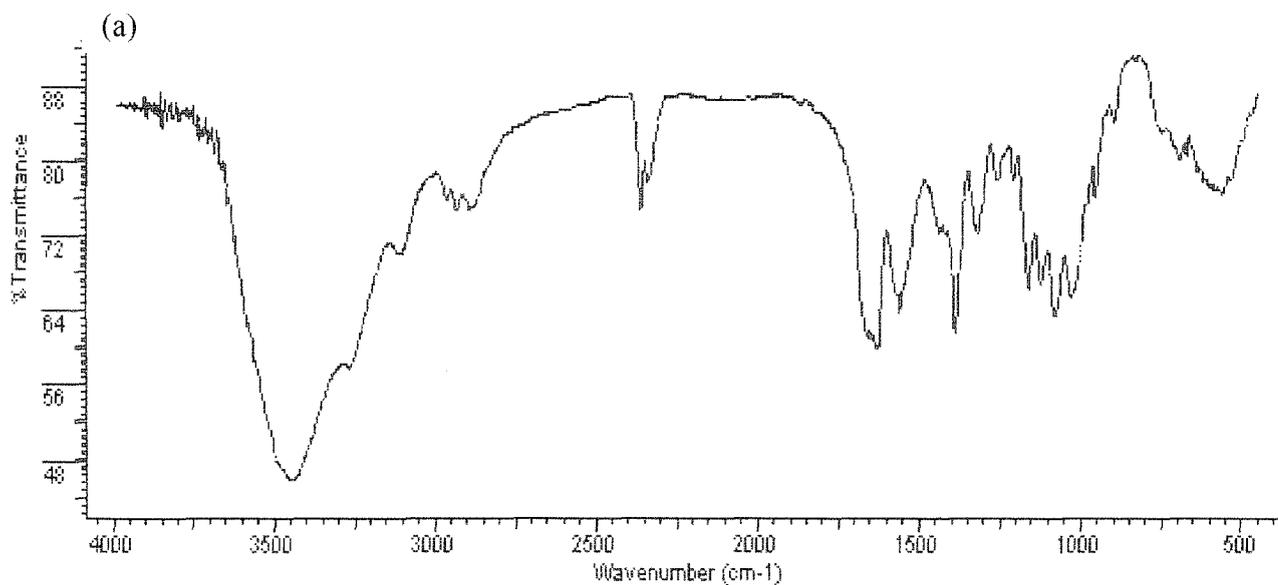
Proteína	PM (Kda)	Log PM	Longitud en el gel (mm)	Rf
Miosina	195	2,29	3	0,05
B-Galactosidasa	117	2,07	10	0,17
Albúmina de Suero Bovino	67	1,99	13	0,22
Ovoalbúmina	50	1,70	24	0,41
Anhidrasa Carbónica	38	1,58	59	1,00
Inhibidor de Trypsina de Soja	30	1,48		
Lisozima	20	1,30		
Aprotinina	7	0,85		

Anexo 6. Determinación del peso molecular (PM) en gel de poliacrilamida al 12 %, mediante la representación del Log PM de las proteínas patrón como función del valor de la movilidad relativa (Rf).



www.bdigital.ula.ve

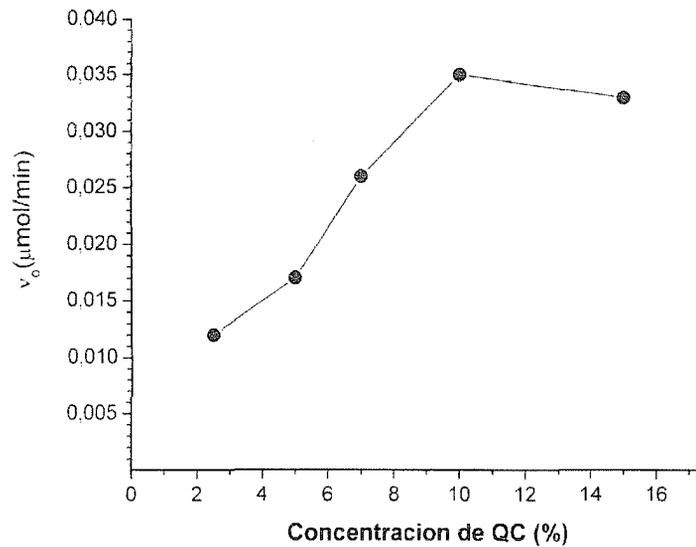
Anexo 7. Espectro infrarrojo comparativo entre: (a) Quitina en hojuelas secas, (b) Quitina coloidal, tratada con HCl a 37 % durante 12 horas y seca a 100°C durante 12 horas.



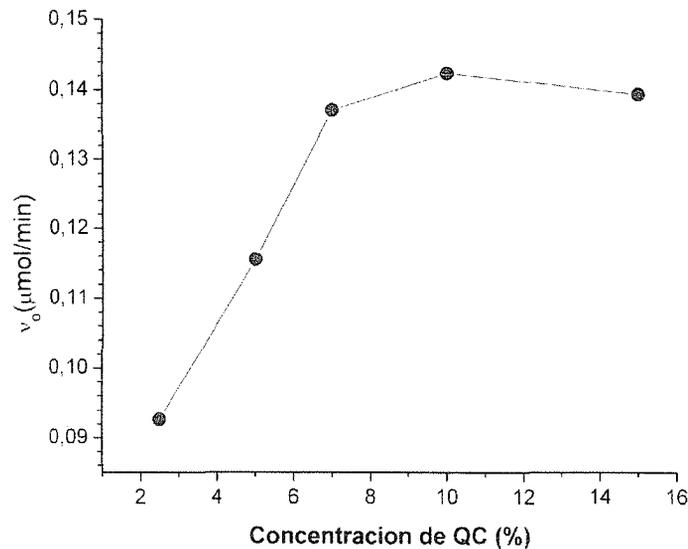
Anexo 8. Identificación molecular de las cepas aisladas a través de secuencias completas en el *GenBank* del NCBI utilizando la herramienta *BLAST*.

N° de acceso	Identificación y Descripción	Máxima puntuación	Puntuación total	Consulta de cobertura	Valor E	Máxima identidad
HM640277.1	<i>Serratia</i> sp. YF-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.	278	278	100%	7e-72	100%
HM590891.1	<i>Serratia marcescens</i> strain SYBCT02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%
HM565988.1	<i>Serratia</i> sp. 08XMSZT-18b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%
HM535665.1	<i>Serratia marcescens</i> strain B4A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%
HM584907.1	<i>Serratia marcescens</i> strain NPLR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%
HM161859.1	<i>Serratia marcescens</i> strain 2BGN4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%
HM074398.1	Uncultured Enterobacteriales bacterium clone DH11_92 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%
HM074391.1	Uncultured Enterobacteriales bacterium clone DH11_84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	278	278	100%	7e-72	100%

Anexo 9. Curva v vs. $[S]$ de la actividad de 363706-BIOMI



Anexo 10. Curva v vs. $[S]$ de la actividad de SM-BIOMI



X. REFERENCIAS

Abdou, E., Nagy, S., Elsabee, M. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*. 99: 1359-1367.

Adams, D. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150: 2029-2035.

Aguilera, B., Ghauharali, V., Helmond, M., Out, J., Donker, W., Groener, J., Boot, R., Renkema, G., Van der Marel, G., Van Boom, J., Overkleeft, H., Aerts, J. (2003). Transglycosidase activity of chitotriosidase: Improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase. *J. Biol. Chem.* 278: 40911-40916.

Agulló, E., Mato, R., Tapia, C., Heras, A., San Román, J., Argüelles, W., Goycoolea, F., Mayorga, A., Nakamatsu, J., Pastor, A. (2004). Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones, Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial 2004. pp. 244-245.

Akimoto-Tomiya, C., Sakata, K., Yazaki, J., Nakamura, K., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sasaki, T., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Shibuya, N., Minami, E. (2003). Rice gene expression in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs. *Plant Molecular Biology*. 52: 537-551.

Alam, M., Nikaidou, N., Tanaka, H., Watanabe, T. (1995). Cloning and sequencing of chiC gene of *Bacillus circulans* WL-12 and relationship of its product to some other chitinases and chitinase-like proteins. *J. Ferment Bioeng.* 80: 454-461.

Alfonso, C., Martínez, M., Fuensanta, R. (1992). Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Lett.* 95: 187-194.

Alfonso, C., Nuero, O., Santamaría, F., Reyes, F. (1995). Purification of Heat-Stable Chitin Deacetylase from *Aspergillus nidulans* and Its Role in Cell Wall Degradation. *Curr. Microbiol.* 30 (1): 49-54.

Álvarez, A. (2010). Selección de hongos productores de desacetilasa de quitina (CDA) y caracterización de la actividad CDA intracelular de dos cepas de *Mucor* sp. Tesis para optar al título de *Magister Scientiae* en Biotecnología de Microorganismos. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología de la Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Álvarez, A. and Del Barrio, G. (2007). Propiedades antivirales del género *Phyllanthus*. Universidad de La Habana. Facultad de Biología. [Página Web en línea.] http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol42_1_08/far11108.htm. [Consulta: 2010, septiembre, 8].

Andersen, O. A., Dixon, M. J., Eggleston, I. M. and Van Aalten, D. M. F. (2005). Natural product family 18 chitinase inhibitors. *Natural Product Reports.* 22: 563-579.

Ano, A., Takayanagi, T., Uchibori, T., Okuda, T., Yokotsuka, K. (2003). Characterization of a Class III Chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 95 (6): 645-647.

Arakane, Y., Zhu, Q., Matsumiya, M., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J. (2003). Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 33: 631-648.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, Á. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology.* 3 (2): 203-230.

Banks, I., Specht, C., Donlin, M., Gerik, K., Levitz, S., Lodge, J. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 4: 1902-1912.

Barboza-Corona, J. E., Nieto-Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, B., Ibarra, J. E. (2003). Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2): 1023-1029.

Becerra-Jiménez, J., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar, C., Martínez-Hernández, J., Contreras-Esquivel, J. y Cuéllar, C. (2011). Quitosán fúngico: fuentes y propiedades. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 3 (5): 24-32.

Bhaskar, N., Suresh, P., Sakhare, P., Sachindra, N. (2006). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology.* 40: 1427-1434.

Bhattacharya, D., Nagpure, A. and Gupta, R. (2007). Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology.* 27: 21-28.

Bhushan, B. and Hoondal, G. S. (1998) Isolation, purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. *Biotechnol. Lett.* 20: 157-159.

Bishop, J., Dean, A. and Mitchell-Olds, T. (2000). Rapid evolution in plant chitinases: *Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97: 5322-5327.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brurberg, M., Eijsink, V., Nes, I. (1994). Characterization of a chitinase gene (*chi A*) from *Serratia marcescens* BJL 200 and one-step purification of the gene product. *FEMS Microbiol. Lett.* 124: 399-404.

Brurberg, M., Nes, I. and Eijsink, V. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. Microbiol. 142: 1581-1589.

Butler, A., O'Donnell, R., Martin, V., Gooday, G., Stark, M. (1991). *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. Eur. J. Biochem. 199: 483-488.

Cardoso, A. (2007). Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para mucorales. Tesis profesional para obtener el grado de Maestro en Desenvolvimento de Processos Ambientais, Núcleo de Pesquisa e Ciências Ambientais. Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, Recife-PE, Brasil.

Carstens, M., Vivier, M., Van Rensburg, P., Pretorius, I. (2003). Overexpression, secretion and antifungal activity of the *Saccharomyces cerevisiae* chitinase. Ann. Microbiol. 53: 15-28.

Castañeda, C., De la Fuente, N., Pacheco, R., Ortiz-Rodríguez, T., Barboza, J. (2011). Potencial de los quitosanos oligosacáridos generados de quitina y quitosana. Acta Universitaria. 21 (3): 14-23.

Chen, W. and Kuo, T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Research Journal. 21: 2260.

Choi, E., Zimmerman, P., Foster, C., Zhu, S., Kumaraswami, V., Nutman, T., Chanock, S. (2001). Genetic polymorphisms in molecules of innate immunity and susceptibility to infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. Genes Immun. 2: 248-253.

Cira, L., Huerta, S., Hall, G., Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. Process Biochemistry. 37: 1359-1366.

Clarke, P. H. and Tracey, M. V. (1956). The Occurrence of Chitinase in some Bacteria. Microbiology. 14 (1): 188-196.

Connell, T. D., Metzger, D. J., Lynch, J., Folster, J. P. (1998). Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 180 (21): 5591-5600.

Cottrell, M., Moore, J. and Kirchman, D. (1999). Chitinases from Uncultured Marine Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology.* pp. 2553-2557.

Cowling, E. B. and Brown, B. (1969). Structural features of cellulosic materials in relation to enzymatic hydrolysis. In: Gould, R. F. (Ed.), *Cellulases and their applications.* Advances in Chemistry Series, vol. 95. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 152-187.

Cruz Camarillo, R. y Rojas, A. (1996). Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, D. F.

Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R. P., Hoondal, G. S. (2005a). Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical experimental design. *Curr. Microbiol.* 51 (4): 222-228.

Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R. P. and Hoondal, G. S. (2005b). Production of an Antifungal Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its Application in Protoplast Production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (8-9): 1611-1616.

Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 773-782.

Dai De-Hui, Hu Wei-Lian, Huang Guang-Rong and Li Wei. (2011). Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. *African Journal of Biotechnology.* 10 (13): 2476-2485.

Daimon, T., Hamada, K., Mita, K., Okano, K., Suzuki, M. G., Kobayashi, M., Shimada, T. (2003). A *Bombyx mori* gene, BmChi-h, encodes a protein homologous to bacterial and baculovirus chitinases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33 (8): 749-759.

Das, M. (2011). Chitinase produced by *Serratia marcescens* SMG isolated from decomposed *Volvariella volvacea*. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (20): 3220-3222.

De Jong, A., Cordewener, J., Schiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, A. and De Vries, S. (1992). A Carrot Somatic Embryo Mutant Is Rescued by Chitinase. *The Plant Cell*. 4: 425-433.

De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J., Benítez, T., Pintor-Toro, J., Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*. 206: 859-867.

Deshpande, M. V. (1986). Enzymatic Degradation of Chitin and Its Biological Applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 45: 273-281.

EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) (2010). [Página Web en línea.] Disponible: <http://www.ebi.ac.uk/Databases/nucleotide.html>. [Consulta: 2010, agosto, 8].

Escott, G., Walters, C., Ingham, E., Adams, D. (1996). Expression of chitinase activity during monocyte differentiation. In: *Chitin Enzymology* (RAA Muzzarelli). pp. 3-10. Volume 2, Atec Edizioni-Grottammare.

Espinosa, R., Abrahantes, M., Valdés, J., Lugo, V., Pupo, M., Aguilar, P., Millares, M., Herrera, I., Arias, D., Musacchio, A. (2009). A fermentation process for the production of P50 from *Serratia marcescens*. *Biotecnología Aplicada*. 26 (3): 214-217.

Essghaier, B., Rouaissi, M., Boudabous, A., Jijakli, H., Sadfi-Zouaoui, N. (2010). Production and partial characterization of chitinase from a halotolerant *Planococcus rifitoensis* strain M2-26. *World J Microbiol Biotechnol.* 26: 977-984.

Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* 10: 2606-2617.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2006). Estadísticas Pesqueras. [Página Web en línea.] Disponible: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es. [Consulta: 2010, octubre, 21].

Felse, P. and Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioproc. Eng.* 20: 505-512.

Felse, P. and Panda, T. (2000). Production of microbial chitinases-A revisit. *Bioproc. Eng.* 23: 127-134.

Fenice, M., Selbmann, L., Di Giambattista, R., Petruccioli, M. and Federici, F. (1996). Production of extracellular chitinolytic activities of the Antarctic entomogenous fungus *Verticillium* cfr. *lecanii* A3. *Chitin Enzymology.* 2: 285-292.

Fernández-Caballero, C., Romero, I., Goñi, O., Escribano, M. I., Merodio, C. and Sánchez-Ballesta, M. T. (2009). Characterization of an Antifungal and Cryoprotective Class I Chitinase from Table Grape Berries (*Vitis vinifera* Cv. Cardinal). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57: 8893-8900.

Flach, J., Pilet, P. and Jollès, P. (1992). What's new in chitinase research? *Cellular And Molecular Life Sciences.* 48: 701-716.

Franco, L. (2007). Enzimas: Qué son y para qué sirven. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad de Valencia.* 101: 399-417.

Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G. and Bahl, H. (2001). Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Arch. Microbiol. 176 (6): 421-426.

Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application. Current Protein and Peptide Science. 1 (1): 105-124.

García, R. S. (1997). Extracción de carotenoproteínas de cefalotórax de camarón empleando una proteasa comercial. Tesis profesional para obtener el grado de Químico de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. México.

García, T. y Roca, J. (2008). Industrialización de los crustáceos para la obtención de quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. Industrial Data. 11 (2): 24-32.

Gianfrancesco, F. and Musumeci, S. (2004). The evolutionary conservation of the human chitotriosidase gene in rodents and primates. Cytogenet Genome Res. 105: 54-56.

Gimeno, M., Ramírez-Hernández, J., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García-Arrazola, R., Bárzana, E., Shirai, K. (2007). One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: 10345-10350.

Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P. and Chhatpar, H. S. (2006). Review: Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology. 5 (2): 54-72.

Gohel, V. and Naseby, D. (2007). Thermalstabilization of chitinolytic enzymes of *Pantoea dispersa*. Biochemical Engineering Journal. 35: 150-157.

Gómez, L., Allona, I., Casado, R. and Aragoncillo, C. (2002). Seed chitinases. Seed Science Research. 12: 217-230.

Gómez-Ramírez, M. (2006). Obtención y caracterización de mutantes de *Bacillus thuringiensis* mejoradas en su producción de quitinasas. Tesis para optar de Doctor en Ciencias Quimicobiológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.

Gómez-Ramírez, M., Rojas-Avelizapa, L. I., Rojas-Avelizapa, N. G., Cruz-Camarillo, R. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *J. Microbiol.* 56: 213-219.

González, V., Guerrero, C., Méndez, U. (2002). Estructura y compatibilidad de mezclas de poliamidas de quitina y quitosán. *Ciencia UANL.* 5 (1): 39-47.

Goñi, O. (2010). Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3- β -glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de *Annona cherimola* Mill. por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO₂. Tesis para optar al grado de Doctor en Química. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Gooday, G. (1996). Aggressive and Defensive Roles for Chitinases. *Chitin enzymology.* 2: 125-133.

Gooday, G. W. (1990). Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation.* 1 (2-3): 177-190.

Gooday, G., Wei-Yun, Z., O'Donnell, R. (1992). What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 387-392.

Goycolea, F., Agulló, E., Mato, R. (2004). Fuentes y procesos de obtención. En: Pastor, A. Editor. *Quitina y Quitosano. Obtención, caracterización y aplicaciones*, Lima, Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú. pp. 105-154.

Green, A., Healy, M., Healy, A. (2005). Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens* QMB1466 using various chitinous substrates. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80: 28-34.

Guo, R. F., Shi, B. S., Li, D. C., Ma, W., Wei, Q. (2008). Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding Gene. Agric. Sci. in China. 7: 1458-1465.

Guo, S. H., Chen, J. K., Lee, W. C. (2004). Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. Enzyme and Microb. Technol. 35: 550-556.

Hahn, M., Hennig, M., Schlesier, B., Höhne, W. (2000). Structure of jack bean chitinase. Acta Crystallographica Section D. 56: 1096-1099.

Haki, G. and Rakshit, S. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology. 89: 17-34.

Hara, S., Yamamura, Y., Fyji, Y., Mega, T., Ikenaka, T. (1989). Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. J. Biochem. 105: 484-489.

Harish, K. V. and Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/Chitosan: Modifications and Their Unlimited Application Potential-An Overview. Trends in Food Science & Technology. 18: 117-131.

Hejazi, A. and Falkiner, F. R. (1997). Review article: *Serratia marcescens*. J. Med. Microbiol., Vol. 46: 903-912.

Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. Biochemical Journal. 293: 781-788.

Herrera-Ruiz, J. (1990) La síntesis de la quitina. Microbiología. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla. pp. 263-270.

Herrera-Ruiz, J. (1993). La quitina. Investigación y Ciencia. 202: 42-49.

Hines, D., Saurugger, P., Ihler, G., Benedik, M. (1988). Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. J Bacteriol. 170: 4141-4146.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth ed, Baltimore (USA); Williams & Wilkins, ed.

Hoster, F., Schmitz, J. E. and Daniel, R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. Applied Microbial and Cell Physiology. 66 (4): 434-442.

Hsu, S. and Lockwood, L. (1975). Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of *Actinomycetes* in Water and Soil. Applied microbiology. 29 (3): 422-426.

Huber, M., Cabib, E. and Miller, L. H. (1991). Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 2807-2810.

Huet, J., Rucktooa, P., Clantin, B., Azarkan, M., Looze, Y., Villeret, V. and Wintjens, R. (2008). X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases. Biochemistry. 47 (32): 8283-8291.

INAPESCA (Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura) (2004). Estadística de captura del subproducto pesquero y acuícola de Venezuela. Datos Oficiales. No publicados. Maracaibo, Venezuela.

Gallur, M. (2010). Presente y futuro de los biopolímero como material de envase. <http://www.easyfairs.com/fileadmin/groups/10/MIRIAM%20GALLUR.pdf>. Instituto Tecnológico del Embalaje Transporte y Logística (ITENE). [Consulta: 2012, noviembre, 15].

Itoh, Y., Takahashi, K., Takizawa, H., Nikaidou, N., Tanaka, H., Nishihashi, H., Watanabe, T., Nishizawa, Y. (2003). Family 19 Chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 Increases Plant Resistance to the Fungal Disease. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 67 (4): 847-855.

Kezuka, Y., Kitazaki, K., Itoh, Y., Watanabe, J., Takaha, O., Watanabe, T., Nishizawa, Y., Nonaka, T. (2004). Crystallization and preliminary X-ray analysis of plant class I chitinase from rice. *Protein and Peptide Letters*. 11 (4): 401-405.

Khoushab, F. and Yamabhai, M. (2010). Review: Chitin Research Revisited. *Mar. Drugs*. 8: 1988-2012.

Kim, H. and An, C. (2002). Differential Expression Patterns of an Acidic Chitinase and a Basic Chitinase in the Root Nodule of *Elaeagnus umbellata*. *MPMI* 15: 209-215.

Kim, H., Timmis, K., Golyshin, P. (2007) Characterization of a chitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 1275-1283.

Kim, Y., Lee, M. and Park, Y. (1992). Purification and characterization of chitinase from green onion. *Korean Biochem. J.* 25 (22): 171-177.

King, M., Valenzuela, H., Prince, D. (2007). Obtención de fibras de Quitosano a partir del exoesqueleto del camarón mediante el proceso a la Sosa. VI Jornadas Científico-Técnicas de la Facultad de Ingeniería. Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela.

Kramer, K., Fukamizo, T. (1985). Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.* 15: 1-7.

Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polymers.* 46 (1): 1-274.

Kuranda, M. and Robbins, P. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266: 19758-19767.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Langer, R. C., Li, F., Popov, V., Kurosky, A., Vinetz, J. M. (2002). Monoclonal antibody against the *Plasmodium falciparum* chitinase, Pf CHT1, recognizes a malaria transmission-blocking epitope in *Plasmodium gallinaceum* Ookinetes unrelated to the chitinase Pg CHT1. *Infect. Immun.* pp: 1581-1590.

Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química. Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela.* 1: 15-21.

Lee, Y. S., Park, I. H., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Lee, Y. C., Cho, Y. S., Ahn, S. C., Kim, C. M., Choi, Y. L. (2007). Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. *Bioresource Technology.* 98 (14): 2734-2741.

Leung, D. (1992). Involvement of plant chitinase in sexual reproduction of higher plants. *Phytochem.* 31: 1899-1900.

Lien, T. S., Yu, S. T., Wu, S. T., Too, J. R. (2007). Induction and purification of a thermophilic chitinase produced by *Aeromonas* sp. DYU-Too7 using glucosamine. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 12: 610-617.

Llina, A., Zueva, O., Lopatin, S., Varlamov, V. (2004). Enzymatic hydrolysis of α -chitin. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 40: 35-38.

Lorito, M., Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F. (1996). Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants. In: Chitin enzymology, Muzzarelli, R.A.A. (eds.), vol 2, Atec edizioni, Italy. pp: 157-164.

Lundblad, G., Lind, J., Steby, M., Hederstedt, B. (1974). Chitinase in Goat Serum. Eur. J. Biochem. 46: 367-376.

Mabuchi, N., Hashizume, I. and Araki, Y. (2000). Characterization of chitinases excreted by *Bacillus cereus* CH. Can. J. Microbiol. 46: 370-375.

Madigan, M., Martinko, J. y Parker J. (2004). *Brock: Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Editorial.Prentice Hall.

Majtán, J., Biliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G., Šimúth, J. (2007). Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). International Journal of Biological Macromolecules. 40 (3): 237-241.

Mane, U. and Deshmukh, A. (2009). Chitin degrading potential of three aquatic *actinomycetes* and its optimization. Afr. J. Biotechnol. 8 (23): 6617-6620.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Publications, New York.

Manucharova, N., Belova, E., Polyanskaya, L. and Zenova, G. (2004). A Chitinolytic *Actinomycete* Complex in Chernozem Soil. Microbiology. 73 (1): 56-59.

Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J. y Rincón, M. (2004). Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. Revista Multiciencias. 4 (2): 1-10.

Martinou, A., Bouriotis V., Stokke B. y Vårum K. (1998). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on partially *N*-acetylated chitosans. Carbohydrate Research 311 (1-2): 71-78.

Martin, J. A., Murphy, R. A., Power, R. F. G. (2006). Purification and physico-chemical characterisation of genetically modified phytases expressed in *Aspergillus awamori*. Bioresource Technology. 97: 1703-1708.

Matsumoto, T., Kawai, M. and Masuda, T. (1991). Heterogeneous molecular aggregation and fractal structure in chitosan/acetic acid systems. Biopolymers. 31: 1721-1726.

Matsumoto, J. (2001). Producción de quitinasas en fermentación en Medio Sólido (FMS) y Líquido (FML) utilizando quitina de desechos de camarón. Tesis para optar al grado de Maestro en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.

Matsumoto, K. (2006). Fungal chitinases. Advances in Agricultural and Food Biotechnology. pp. 289-304.

Mauch, F., Staehelin, A. (1989). Functional implications of the subcellular localization of ethylene induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. The Plant Cell 1: 447-457.

Mellor, K., Nicholas, R., Adams, D., (1994). Purification and characterization of chitinase from *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett. 119: 111-117.

Merzendorfer, H. and Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J. Exp. Biol. 206: 4393-4412.

Meza, R., Monroy, A., Mercado, M., Poutou, R., Rodríguez, P., Pedroza, A. (2004). Study of the Stability in Real Time of Cryopreserved Strain Banks. Universitas Scientiarum. 9 (2): 35-42.

Milewski, S., O'Donnell, R. W., and Gooday, G. W. (1992). Chemical modification studies of the active centre of *Candida albicans* chitinase and its inhibition by allosamidin. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2545-2550.

Mitsuhiro, U. and Motoo, A. (1992). Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. N°. 10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (3): 460-464.

Mitsuhiro, U., Yukiko, K., Aji, S., Masami, N., Kazutaka, M. (2005). Purification and Characterization of Chitinase B from Moderately Thermophilic *Bacterium Ralstonia* sp. A-471. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 842-844.

Mitsutomi, M., Ohtakara, A., Fukamizo, T., Goto, S. (1990). Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric. Biol. Chem.* 54: 871-877.

Molinari, L. M., Pedroso, R. B., Scoaris, D. O., Nakamura, T. U., Nakamura, C. V., Dias, F. B. (2007). Identification and partial characterisation of a chitinase from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 146: 81-87.

Monzingo, A. F., Marcotte, E. M., Hart, P. J. and Robertus, J. D. (1996). Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nature Structural Biology.* 3 (2): 133-140.

Morales de la Vega, L., Barboza-Corona, J., Aguilar-Uscanga, M. and Ramírez-Lepe, M. (2006). Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai and its action against phytopathogenic fungi. *J. Microbiol.* 52: 651-657.

Morillo, M. A. (2007). Análisis del mercado venezolano de enzimas destinadas a la industria alimentaria. División de cereales y oleaginosas. Fundación Centro de Investigación del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial. San Felipe, estado Yaracuy-Venezuela.

Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (1997). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel cadherin-like domains and a chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* 179: 7306-7314.

Mukherjee, G., Sen, S. (2006). Purification, Characterization and Antifungal Activity of Chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. *Current Microbiology.* 53: 265-269.

Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., Oyama, H., Shin, T. (1992). Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus* TK-22. *Biosci., Biotechnol., and Biochem.* 56 (2): 368-369.

Nava-Arenas, I. (2009). Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. Tesis profesional para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico-Biológicas. Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México, D. F. México [<http://hdl.handle.net/123456789/4183>].

Nawani, N. N., Kapadnis, B. P., Das, A. D., Rao, A. S., Mahajan, S. K. (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *J. Appl. Microbiol.* 93: 965-975.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2010). [Página Web en línea.] Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Consulta: 2010, agosto, 8].

Nelson, D. and Cox, M. (1995). Lehninger, Principios de Bioquímica. 2^{da} Edición. Editorial W. H. Freeman. New York. pp. 229-233.

Nishinari, K. and Takahashi, R. (2003). Interaction in polysaccharide solutions and gels. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 8: 396-400.

Nuero, O. (1995). Production of chitinase by *Fusarium* species. *Current Microbiology*. 30: 287-289.

Park, J. K., Morita, K., Fukumoto, I., Yamasaki, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Matsuda, H. (1997). Purification and characterization of the Chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci., Biotechnol., and Biochem.* 61 (4): 684-689.

Park, S. H., Lee, J. H. and Lee, H. K. (2000). Purification and Characterization of Chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *J. Microbiol.* 38 (4): 224-229.

Pastor, A. e Higuera, I. (2004). Generalidades. En: Pastor, A. Editor. Quitina y Quitosano. Obtención, caracterización y aplicaciones, Lima, Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú. pp. 26-72.

Patel, A. K., Singh, V. K., Yadav, R. P., Moir, A. J. G., Jagannadham, M. V. (2010). Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process Biochemistry*. 45: 675-681.

Patidar, P., Agrawal, D., Benerjee, T., Patil, S. (2005). Chitinase production by *Beauveria felina* RD 101: optimization of parameters under solid substrate fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21 (1): 93-95.

Patil, R., Ghormade, V., Deshpande, M. (2000). Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 473-483.

Pedraza, R. and Lopez, R. (1989). Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 211-218.

Peniche, C. (2006). Estudios sobre Quitina y Quitosana. Trabajo presentado para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias. Universidad de La Habana, Facultad de Química. La Habana-Cuba.

Peral, I. y Gartzia, I. (2001). Elementos valiosos en los residuos de industrias transformadoras de productos de la pesca: quitina-quitosano y sus aplicaciones. *Sustrai 58-Revista Agropesquera-Udaberria*. pp. 52-54.

Philipp, G. (1994). *Methods for general and molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

Podile, A. R. and Prakash, A. P. (1996). Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* Af 1. *Can. J. Microbiol.* 42 (6): 533-538.

Purwani, E. Y., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., Pyunb, Y. R. (2004). Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp.13.26. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 147–153.

Ramírez, M., Rodríguez, A., Alfonso, L., Peniche, C. (2010). La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Revista: Biotecnología Aplicada*. 27: 270-276.

Ratner, B. (1996). *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, San Diego. pp 11-35.

Revah-Moiseev, S. and Carroad, P. A. (1981). Conversion of the Enzymatic Hydrolysate of Shellfish Waste Chitin to Single-Cell Protein. *Biotechnology and Bioengineering*. 23: 1067-1078.

Reissig, J. L., Strominger, J. L., Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of n-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* 217:959-966.

Roberts, R. L. and Cabib, E. (1982). *Serratia marcescens* chitinase: One-step purification and use for the determination of chitin. *Anal. Biochem.* 127: 402-412.

Roberts, G. A. F. (2006). Truth or myth?. *European Chitin society Newsletter*. 21: 5-6.

Rodas, J., Bautista, Q., Sevilla, M., Ramírez, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad quitino-proteolítica de *Bacillus* sp. Aisladas de suelos tropicales. Revista Colombiana Biotecnología. 11 (1): 107-113.

Rødde, R., Einbu, A., Vårum, K. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). Carbohydrate Polymers. 71: 388-393.

Saborowski, R., Buchholz, F., Vetter, R., Wirth, S. and Wolf, G. (1993). A soluble, dye-labelled chitin derivative adapted for the assay of krill chitinase. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 105B, Nos 3/4. pp. 673-678.

Safarida, A., Salleh, M., Illias, R. (2006). Production and characterization of crude chitinase from *Trichoderma virens*. Petroleum and Natural Resources Process. pp. 625-630.

Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M. and Moriguchi, M. (1998). Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 64 (9): 3397-3402.

SARPA (Servicio Autónomo de Recursos Pesqueros y Acuícolas) (2001). Producción pesquera crecerá entre 8 % a 10 %. El Nacional, marzo 11: sec E/7.

Sastoque, L. (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Tesis para optar el título de Microbiólogo industrial, agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C.

Sastoque, L., Mercado Reyes, M., Martínez Salgado, M. M., Quevedo Hidalgo, B., Pedroza Rodríguez, A. M. (2007). Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila

halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 6 (2): 137-146.

Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. and Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Lett. Nature. 324: 365-367.

Shaikh, S. and Deshpande, M. (1993). Review: Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 9: 468-475.

Shanmugaiah, V., Mathivanan, N., Balasubramanian, N., Manoharan, P. (2008). Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus litoralis* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology. 7: 2562-2568.

Shirai, K. (1999). Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana. Tesis doctoral. Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F. México.

Shirai, K., Guerrero, I. y Hall, G. M. (1996). La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. Ciencia. 47 (4): 317-328.

Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González, O., Hall, G. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. Enzyme and Microbial Technology. 28: 446-452.

Singh, G., Dahiya, N., Hoondal, G. S. (2005). Optimization of chitinase production by *Serratia marcescens* GG5. Asian. J. Micro. Bio. Env. Sc. 7 (3): 383-385.

Singla, A. and Chawla, M. (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-An update. J. Pharm. Pharmacol. 53: 1047-1067.

Sini, T., Santhosh, S., Mathew, P. (2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. Carbohydrate Research. 342: 2423-2429.

Spindler, K. and Buchholz, F. (1988). Partial characterization of chitin degrading enzymes from two *Euphausiids*, *Euphausia superba* and *Meganytphanes norvegica*. *Polar Biol.* 9: 115-122.

St-Leger, R. J., Joshi, L. and Roberts, D. (1998). Ambient pH Is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 64 (2). 709-713.

Struszczyk, M. (2006). Global Requirements for Medical Applications of Chitin and its Derivatives. In Polish Chitin Society, Monograph XI; Polish Chitin Society: Łódź, Poland. pp. 95-102.

Suginta, W. (2007). Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme and Microbial Technology.* 41: 212-220.

Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1075-1083.

Taddei, A., Tremarias, M., Hartung, G. (1999). Viability studies on *actinomycetes*. *Mycopathologia.* 143 (3): 161-164.

Tang, Y., Zhao, J., Ding, S., Liu, S., Yang, Z. (2001). Purification and properties of chitinase from *Enterobacter aerogenes*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 41 (1): 82-86.

Thompson, S. E., Smith, M., Wilkinson, M. C., Peek, K. (2001). Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4001-4008.

Tokura, S. and Tamura, H. (2007). Chitin and Chitosan. Kansai University, Suita, Japan. Elsevier, Eds. 2: 449-475.

Trudel, J. and Asselin, A. (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide from *Colletorichum lindemuthianum*. J. Biol. Chem. 270: 26286-26291.

Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Trends in Biotechnology. 18: 305-312.

Ubhayasekera, W., Rawat, R., Ho, S. W., Wiweger, M., Von Arnold, S., Chye, M. L., Mowbray, S. L. (2009). The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: the enzyme from Norway spruce. Plant Molecular Biology. 71 (3): 277-289.

Uchida, Y. and Ohtakara, A. (1988). Chitosanase from *Bacillus* species. Meth. Enzymol. 161: 501-505.

Ueda, M. and Arai, M. (1992). Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 (3): 460-4.

Ueda, M., Kojima, M., Yoshikawa, T., Mitsuda, N., Araki, K., Kawaguchi, T., Miyatake, K., Arai, M., Fukamizo, T. (2003). A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties. European Journal of Biochemistry. 270 (11): 2513-2520.

Uria, A. R. and Chasanah, E. (2005). Properties of Chitinase from a Bacterial Strain Associated with Marine Sponge. Presented in ASEAN Biochemistry Seminar and Workshop on Enzymes: Industrial and Medical Prospects, on the 6-7th of February at Airlangga University, Surabaya.

Vaidya, R., Roy, S., Macmil, S., Gandhi, S., Vyas, P., Chhatpar, H. S. (2003). Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*. Biotechnol. Lett. 25 (9): 715-717.

Van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M. G. and Eijsink, V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98 (16): 8979-8984.

Wang, S. and Hwang, J. (2001). Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. *Enzyme and Microbial Technology.* 28 (4-5): 376-382.

Wang, S. L. and Chang, W. T. (1997). Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2): 380-386.

Wang, S. L., Chang, T. J., Liang, T. W. (2010). Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. *Biodegradation.* 21: 321-333.

Wang, S. L., Chen, S. J., Wang, C. L. (2008). Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydrate Research.* 343: 1171-1179.

Wang, S. Y., Moyne, A., Thottappilly, G., Wu, S., Locy, R. D., Singh, N. K. (2001). Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 492-498.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology.* 173 (2): 697-703.

Wen, C. M., Tseng, C. S., Cheng, C. Y., Li, Y. K. (2002) Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35: 213-219.

Win, N. and Stevens, W. (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 334-341.

Wiwat, C., Lertcanawanichakul, M., Siwayapram, P., Pantuwatana, S. and Bhumiratana, A. (1996). Expression of chitinase-encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene*. 179 (1): 119-126.

Wubben, J., Joosten, M., Kan, J., Wit, P. (1992). Subcellular localization of plant chitinases and 1,3- β -glucanases in *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*)-infected tomato leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 41: 23-32.

Xu, F., Fan, C., He, Y. (2007). Chitinases in *Oryza sativa* ssp. *japonica* and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics and Genomics*. 34 (2): 138-150.

Xu, Y., Gallert, C. and Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79: 687-697.

Yong, T., Hong, J., Zhangfu, L., Li, Z., Xiuqiong, D., Ke, T., Shaorong, G., Shigui, L. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase produced by bacterium C4. *Ann. Microbiol.* 55 (3): 213-218.

Yuli, P. E., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., Pyun, Y. R. (2004). Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian *Bacillus* sp. 13.26. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 147-153.

Yun, D., D'Urzo, M., Abad, L., Takeda, S., Salzman, R., Chen, Z., Lee, H., Hasegawa, P. and Bressan, R. (1996). Novel Osmotically Induced Antifungal Chitinases and Bacterial Expression of an Active Recombinant Isoform. *Plant Physiology*. 111: 1219-1225.