

PURIFICACIÓN PARCIAL DE QUITINA DESACETILASAS DE *Colletotrichum gloeosporoides* Y SU ACCIÓN EN LA DESACETILACION DE QUITINAS

N. PACHECO¹, F. MUÑIZ-PAREDES¹, S.
TROMBOTTO², L. DAVID² Y K. SHIRAI¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Dpto. de
Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros,
México, D.F. C.P. 09340 E-mail
smk@xanum.uam.mx ²LMPB, UMR CNRS
5223,UCBL1, Bâtiment ISTIL, 15 Bd André
Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex

La producción de quitosano enzimáticamente
representa una alternativa al método químico, ya
que además de reducir el impacto ambiental,
favorece el control disminuyendo la degradación
del producto durante el proceso [1]. El objetivo de
este trabajo fue la purificación parcial de extracto
enzimático de quitina desacetilasa de *C.
gloeosporoides* y su evaluación sobre diferentes
quitinas. Extracto enzimático de *C.
gloeosporoides* fue producido en medio líquido.
Posteriormente ultrafiltrado, precipitado y
fraccionado por cromatografía [2]. La actividad
desacetilasa se determinó por espectrofotometría
y cromatografía de gases. El extracto
semipurificado fue aplicado en quitinas con 60%
de grado de acetilación (DA) (quitosano
reacetilado) en buffer de tetraboratos a pH 8.5 a
45°C. Las quitinas antes y después de ser
desacetiladas por método enzimático fueron
caracterizadas en cuanto a su peso molecular y
DA. La precipitación produjo la mayor
concentración de actividad de la enzima
desacetilasa con recuperación del 80% (Tabla 1).

Tabla 1. Purificación parcial de quitina desacetilasas de
C. gloeosporoides.

Inicial	Etapas	Proteína (mg/ml)	UA /ml	Actividad Específica	R (%)
Extracto		0.107	0.014	0.13	100
Ultrafiltrado ^a	1	0.383	0.042	0.109	75
Q sefarosa ^b	2	0.002	0.017	8.5	10
Precipitado	1	0.185	0.113	0.618	80
Q sefarosa	2	0.002	0.024	12.0	3.6

UA unidades de actividad, R rendimiento ^amembrana de corte de
5µm, ^bFPLC Q sefarosa [2]

La aplicación de las enzimas semipurificadas
mostró la máxima producción de acetato (medida
indirecta de la desacetilación) utilizando una
concentración de enzima del 0.145mg/ml y 5mg de
quitina /ml con un tiempo de reacción de 12h (Fig.
1a). La cinética de desacetilación a diferentes
concentraciones de quitina mostró mayor
producción de acetato 12.59 µmol y 12.9 µmol de
acetato a 5mg/mL y 7.5mg/mL de quitina,
respectivamente. Las tasas de velocidad más

elevadas fueron de 0.024 y 0.026 (min⁻¹)
correspondientes a 7.5 y 10 mg/ml de quitina (Fig.
1b tabla 2).

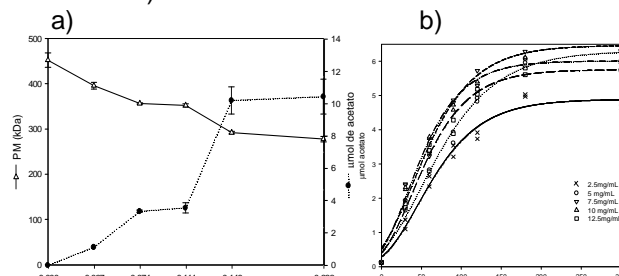


Figura 1. (a) Producción de acetato (●) y reducción del
PM (Δ) en quitina (DA 60%) desacetilada a diferentes
concentraciones de enzima. (b) Producción de acetato a
diferentes concentraciones de quitina (DA 60%) durante
300 min de reacción, puntos ajustados al modelo de
Gompertz.

Tabla 2. Parámetros de velocidad de desacetilación a
diferentes concentraciones de quitina (DA 60%).

Quitina(mg/ml)	P _{max}	K (min ⁻¹)	V _{max}	R ²
2.5	8.81 ± 1.22	0.02 ± 0.003	0.424	0.98
5.0	12.59 ± 0.39	0.019 ± 0.002	0.355	0.99
7.5	12.9 ± 0.37	0.024 ± 0.002	0.334	0.98
10.0	12.0 ± 0.27	0.026 ± 0.002	0.324	0.99
12.5	11.49 ± 0.27	0.025 ± 0.002	0.364	0.99

Valores obtenidos por ajustes realizados con el modelo de Gompertz.

Los resultados de la reacción en diferentes
quitinas, indicaron presencia de desacetilación en
muestras modificadas, alcanzando el menor valor
de DA para la quitina hidrolizada, 20% de
desacetilación con 18% de pérdida de PM (Tabla
3).

Tabla 3. PM y DA de muestras antes y después de la
desacetilación enzimática a 300min de reacción.

Muestra	PM (kDa) Inicial	PM(kDa) final	DA inicial	DA final
QB ^a	1200±72.5	1198±92.6	95.5±1	95.3 ±1
QB polvo	963±93.2	909±38.8	93±1.8	90.6 ± 1.7
QQ ^b	851±95.8	839±82.3	94.5±1.4	94.41 ± 2.5
β quitina	831±2.3	799±12.0	89.2±1.01	83.7 ± 1.3
DQBpolvo ^c	783±23.6	713±23.6	72.8±1.1	60.8 ± 1.38
MW QB ^d	413±12.2	371 5.8	91±1.5	88.38 ± 1.2
EQ ^e	334±26.2	329±8.3	92.4±0.7	86.29 ± 1.7
EQ-P ^f	267±6.5	275±2.3	89.4±1.5	81.55 ± 1.7
QH ^g	102±8.9	86±7.4	79.9±2.9	55.3 ± 2.6

^aQuitina biológica, ^bquitina química, ^cpolvo de quitina biológica desacetilado,
^dmicroondas, ^eesponja de quitina, ^fprecipitado de esponja de quitina, ^gquitina
hidrolizada.

El extracto crudo enzimático semipurificado de *C.
gloeosporoides* fue capaz de desacetilar muestras
de quitina (DA 60%) y quitinas modificadas.

AGRADECIMIENTOS. CONAPESCA (Vinculación
Productiva en su componente de Desarrollo Tecnológico),
CONACYT (Proyecto No. 105628) y PCP (NP).

REFERENCIAS

¹Kafetzopoulos, D. Martinou, A. Bouriotis, V.(1993). Applied
biological sciences. 90:2564-2568.

²Tsigos, I., Bouriotis, V. (1995). The journal of Biological
chemistry. 44(3):26286-26291