

## DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS QUITINASAS: ChiA74, ChiABtt y ChiA Nima

M.C. Bravo-Rivas, L.E. Casados-Vázquez, J.E. Barboza-Corona \*

División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca.  
\*josebar@ugto.mx

### RESUMEN:

Las quitinasas son enzimas que rompen enlaces glicosídicos y ayudan así a degradar la quitina para formar quitooligosacáridos, quitobiosa, o N-acetilglucosamina, generalmente son encontradas en organismos que necesiten disolver su propia quitina. Las quitinasas con las que estamos trabajando en este proyecto ya se han caracterizado bioquímicamente pero aún no se ha determinado su estabilidad y sus condiciones de almacenamiento. Es por eso que el objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad de las quitinasas ChiA74, ChiABtt y ChiA Nima a diferentes condiciones y temperaturas de almacenamiento. Se realizó la purificación de cada una de las quitinasas y su respectiva cuantificación, posteriormente se almacenó a diferentes condiciones que son: -20°C con 10% y 50% de glicerol, -80°C con 10% y 50% de glicerol, 4°C con azida de sodio al 0.1%, 4°C sin aditivos y temperatura ambiente; después se realizaron los ensayos de actividad. Hasta el momento las muestras de ChiA74 y ChiABtt se han almacenado por tres meses y se han mantenido estables en las condiciones de 4°C con azida de sodio al 0.1%, 4°C sin aditivo y temperatura ambiente. Sin embargo estas últimas dos condiciones son más propensas a la contaminación.

### ABSTRACT:

The chitinases are enzymes that break glycosidic bonds and thus help to degrade chitin to form chito-oligosaccharides, chitobiose, or N-acetylglucosamine, generally they are found in organisms that need their own dissolve chitin. The chitinases with which we are working on this project have already been characterized biochemically but has not yet determined its stability and storage conditions. That's why the objective of this work was to determine the stability of chitinases ChiA74, ChiABtt and chiA Nima to different conditions and storage temperatures. purification of each chitinase and their respective quantification is performed, subsequently stored at different conditions are: -20°C with 10% and 50% glycerol, 20°C with 10% and 50% glycerol, 4°C with sodium azide 0.1%, 4°C without additives and ambient temperature; after activity assays were made. So far samples ChiA74 and ChiABtt have been stored for three months and remained stable under the conditions of 4°C with sodium azide 0.1%, 4°C without additive and ambient temperature. But these last two conditions are more prone to contamination.

**Palabras clave:** Ensayo de actividad, quitina, quitinasas.

**Keywords:** activity assay, chitinase, chitin

**Área:** Microbiología y Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las quitinasas son enzimas que rompen enlaces glicosídicos y ayudan así a degradar la quitina para formar quitooligosacáridos, quitobiosa, o N-acetilglucosamina, generalmente son encontradas en organismos que necesiten

remodelar su propia quitina o disolver y digerir la quitina de hongos o animales. Las quitinasas tienen una gran variedad de aplicaciones en diferentes áreas como en el campo de la biotecnología, agricultura, medicina y en la industria alimentaria. Como ya se mencionó las Quitinasas son principalmente usadas para producir quitoooligosacáridos; por otro lado una problemática comúnmente manifestada en los alimentos perecederos es la reducción de su vida de anaquel y este deterioro se atribuye principalmente a factores que promueven la presencia de microorganismos patógenos y a las reacciones oxidativas de un producto alimenticio. Una alternativa para la solución de esta problemática representa un novedoso campo de aplicación para los quitoooligosacáridos a través de la innovación en el desarrollo de películas comestibles que actúan como agentes antioxidantes y agentes antimicrobianos. En este proyecto se trabajaron con tres distintas quitinasas que son ChiA74, ChiABtt y ChiA Nima, para así conocer su estabilidad a diferentes condiciones de almacenamiento tales como: -20°C con 10-50% de glicerol, -80°C con 10-50% de glicerol, 4°C azida de sodio, 4°C sin aditivo y a temperatura ambiente.

El uso de las enzimas aún es limitado ya que son generalmente moléculas grandes, con una arquitectura muy compleja y por lo tanto muy sensibles a las condiciones operacionales (las afectan variaciones de temperatura, pH, concentración de sales) en las que se requiere su funcionalidad. Las enzimas constituyen un sistema modelo adecuado para estudiar los distintos factores que afectan la estabilidad en sistemas de baja humedad. El entendimiento de los mecanismos de inactivación involucrados sería de gran utilidad en el desarrollo de nuevas estrategias para la estabilización de proteínas. Las enzimas pueden perder su funcionalidad por efecto de procesos tanto químicos como físicos que pueden afectar la estructura durante la purificación, análisis, distribución o almacenamiento. La estabilidad física se refiere a los procesos de desnaturalización, agregación, precipitación y adsorción a superficies, que son modificaciones que no implican cambios en la naturaleza química de la proteína. En particular, la desnaturalización ha sido considerada como el paso inicial y esencial en la inactivación de enzimas.

Algunas de las estrategias para la estabilización enzimática son las siguientes:

- Obtención de enzimas a partir de microorganismos termófilos, los cuales producen enzimas termorresistentes.
- Modificación de la secuencia de aminoácidos por técnicas de ingeniería genética.
- Estabilización por inmovilización, modificación química o modificación del medio de reacción por inclusión de aditivos.

Con las quitinasas que se trabajaron en este proyecto se ha hecho su caracterización pero aún no se ha determinado su estabilidad y sus condiciones de almacenamiento.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Inducción de proteína**

Se dejó crecer un precultivo en LB suplementado con Ampicilina 100 µg/ml y Cloranfenicol 34 µg/ml por 16 horas a 37°C, usando 5ml de precultivo para inocular en 500 ml de LB usando mismos antibióticos. Dejando crecer a O.D=0.5,

posteriormente se hizo un choque térmico por 15 minutos y se induce con IPTG. La inducción se lleva a cabo por 16 horas a temperatura ambiente. Se formó un botón y se centrifugando a 13000 RPM/15 minutos, una vez obtenido el botón se almaceno a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Purificación**

Se pasó el sobrenadante en una columna de níquel posteriormente se hizo un lavado con Buffer A (500mM NaCl, 100mM Tris HCl) después se pasa el buffer de elución Buffer A (500mM NaCl, 100mM Tris HCl) para obtener la proteína ya purificada, una vez obtenida se pone a dializar (Buffer D 150mM NaCl, Tris 100mM) por una noche.

### **Cuantificación de proteína**

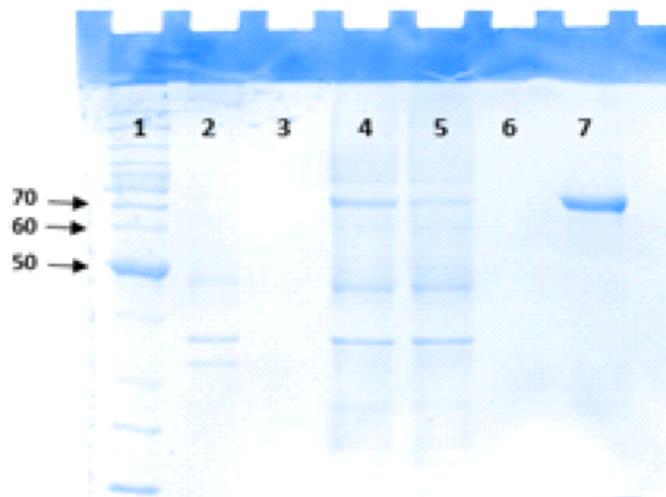
La Cuantificación se realizó por el método de Bradford por microplaca transparente, obteniendo las lecturas en el equipo Sinergy HTX por un lapso de 10 minutos.

### **Ensayo enzimático**

El ensayo de actividad se realizó por fluorescencia utilizando el sustrato 4-metil Umbeliferona, haciendo la lectura en el equipo Sinergy HTX por un lapso de 10 minutos.

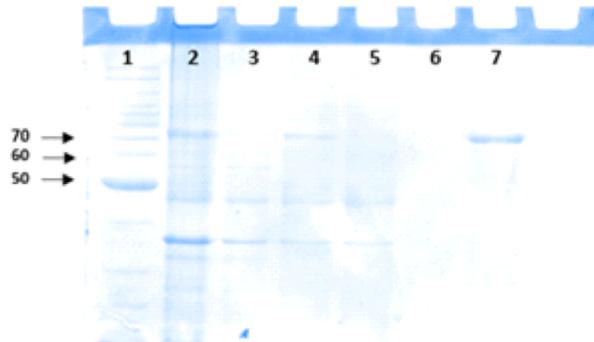
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se purificaron las quitinasas Chia74, ChiABtt y ChiA Nima mediante una columna de níquel pasando el sobrenadante por ella, haciendo sus respectivos lavados y por último pasando un buffer de elución. Se dializo la muestra obtenida para quitar el exceso de sales. Posteriormente se hizo la verificación de la purificación mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%.



**Figura 1.** Purificación ChiABtt carril(1) marcador de proteína, carril (2) muestra inducida, carril(3) muestra no inducida, carril(4) sobrenadante del sonicado, carril (5) paso por columna, carril

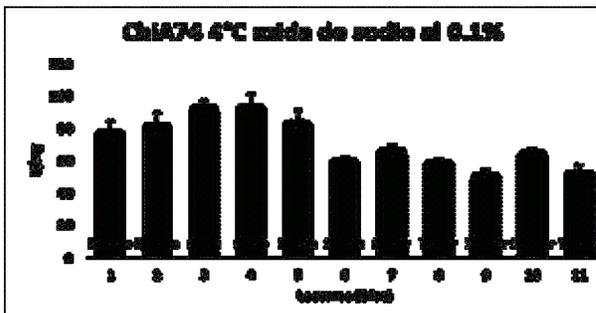
Más tarde se realizó la cuantificación por el método de Bradford de cada una de las enzimas purificadas para así obtener la concentración de proteína en  $\mu\text{g/ml}$ .



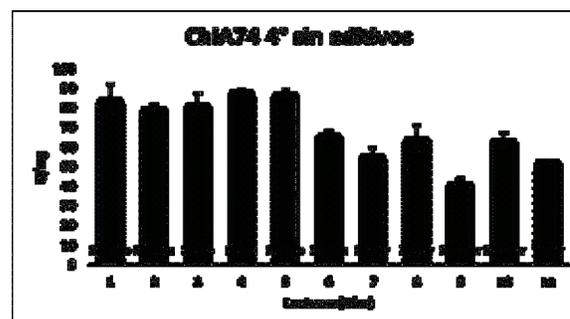
**Figura 2.** Purificación ChiA74 carril(1) marcador de proteína, carril(2) muestra inducida, carril (3) muestra no inducida, carril (4) sobrenadante del sonicado, carril(6) paso por columna, carril(6) lavado, carril(7) elución.

1. Para ChiA74 se obtuvo una concentración de  $745\mu\text{g/ml}$ .
2. Para ChiABtt se obtuvo una concentración de  $844\mu\text{g/ml}$ .

Una vez que se obtuvieron los resultados de la cuantificación se hicieron las diluciones para almacenar a las siguientes condiciones de almacenamiento:  $-20^{\circ}\text{C}$  con 10%-50% de glicerol,  $-80^{\circ}\text{C}$  con 10%-50% de glicerol,  $4^{\circ}\text{C}$  con azida de sodio,  $4^{\circ}\text{C}$  sin aditivo y a temperatura ambiente. Ya teniendo las diluciones se procedió a realizar el ensayo enzimático por medio de fluorescencia en microplaca negra. Se evaluaron los datos derivados de las lecturas por el equipo SYNERGY HTX, obteniendo los resultados en U/mg. Se realizaron gráficas para cada una de las condiciones durante un periodo de tres meses, mostrando los siguientes resultados para Chia74.



**Figura 4.** Gráfica de ensayos de actividad ChiA74 a  $4^{\circ}\text{C}$  con azida de sodio al 0.1%.



**Figura 3.** Gráfica de ensayos de actividad ChiA74 a  $4^{\circ}\text{C}$  sin aditivo.

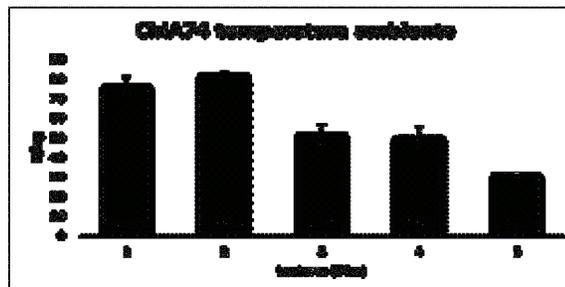


Figura 5. Grafica de ensayo de actividad ChiA74 temperatura ambiente.

Las observaciones que se hicieron con respecto a las lecturas de ChiA74 a las condiciones ya mencionadas fueron las siguientes:

1. A las condiciones de  $-20^{\circ}\text{C}$  con 10% y 50% de glicerol,  $-80^{\circ}\text{C}$  con 10% y 50% de glicerol nos indica que la enzima disminuye su actividad, esto puede ser a causa del glicerol.
2. A  $4^{\circ}\text{C}$  con azida de sodio a 0.1% nos señala que la enzima tiene una actividad optima de las lecturas 1-5 que corresponden a los periodos del 22 de enero al 16 de febrero, posteriormente de las lecturas 6-11 se nota una disminución de la actividad quedando 55 U/mg en la última lectura. Esto nos indica que esta condición se puede considerar estable para el almacenamiento de la enzima.
3. A  $4^{\circ}\text{C}$  sin aditivos nos revela la misma situación que a la condición de  $4^{\circ}\text{C}$  con azida de sodio a 0.1%; es decir esta condición también es apta para almacenar la enzima.
4. A Temperatura ambiente nos mostró que la enzima tiene una actividad estable de la lectura 1 y 2 que corresponden a las fechas del 22 de enero al 25 de enero; de la lectura 3 y 4 que son del 3 de febrero al 9 de febrero hay una disminución del 25% en la actividad, y la última lectura que fue el 16 de febrero hay una disminución de la actividad hasta de un 50%, a partir del 22 de febrero las muestras se contaminaron; esto nos indica que esta condición es apta para tiempos cortos de almacenamiento.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la actividad de ChiABtt en las diferentes condiciones.

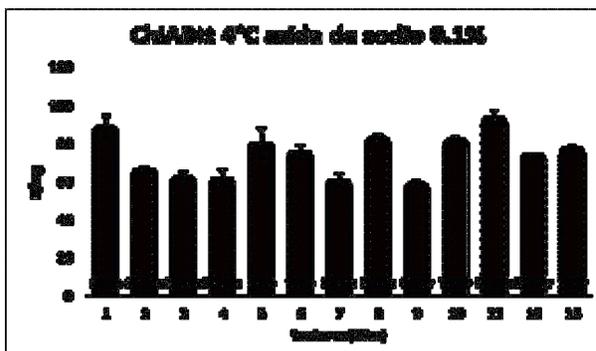


Figura 6. Grafica de ensayo de actividad ChiABtt, ol. 2 (2017) 174-180  $4^{\circ}\text{C}$  con azida de sodio a 0.1%.

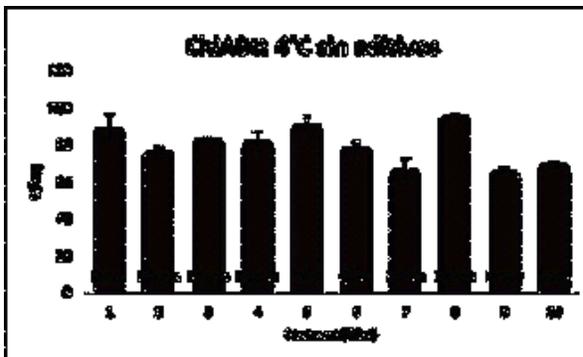


Figura 7. Grafica de ensayo de actividad ChiABtt a 4°C sin aditivos.

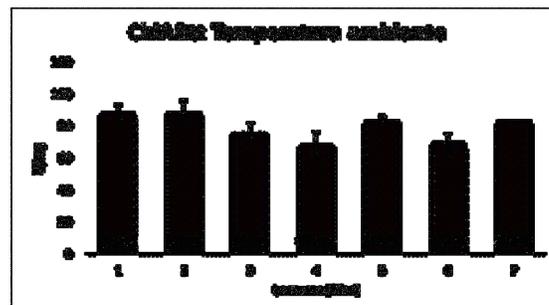


Figura 8. Grafica de ensayo de actividad ChiABtt temperatura ambiente.

Las observaciones que se hicieron con respecto a las lecturas de ChiABtt con las condiciones correspondientes fueron:

1. A las condiciones de -20°C con 10% y 50% de glicerol, -80°C con 10% y 50% de glicerol nos indica que la enzima disminuye su actividad, esto puede ser a causa del glicerol.
2. A la condición de 4°C con azida de sodio al 0.1% nos muestra que la enzima es estable a esta condición mostrando que en las últimas lecturas que corresponden al periodo del 28 de marzo al 7 de abril solo hay una disminución del 10% en su actividad.
3. A la condición de 4°C sin aditivos la enzima es estable mostrándonos en las últimas dos lecturas que corresponden del periodo del 3 de marzo al 7 de marzo una disminución del 10%, sin embargo la muestra mostro contaminación a partir del 14 de marzo.
4. A temperatura ambiente la enzima es estable, no mostrando disminución del 8 de enero hasta el 22 de febrero sin embargo encontrándose contaminada para la fecha 3 de febrero.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Castañeda C.R, De la fuente N.M, Pacheco R.U, Ortiz T.O, Eleazar J.E. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. Revista Acta Universitaria. Sep. 2011;21(3): 14-21.
- Majeti N.V. A review of chitin and chitosan applications. Review Reactive & Functional Polymers. Jun 2000;46: 3-27.
- Shahidi FE, Vidana JA, Jeon YO. Food applications of chitin and chitosans. Review Trends in Food Science & Technology. Oct 1999;37-42.
- Santagapita P. Estabilidad de enzimas en medios de distinta movilidad molecular. Impacto de interacciones con azúcares y biopolímeros y de la encapsulación [Tesis Doctoral]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2010.