

## Potencial de los quitosano-oligosacáridos generados de quitina y quitosano

Cristóbal Castañeda Ramírez\*, Norma M. de la Fuente Salcido\*\*\*, Rubén Darío Pacheco Cano\*, Tomás Ortiz-Rodríguez\*, José Eleazar Barboza Corona\*

### RESUMEN

Las quitinasas sintetizadas por plantas, hongos, insectos y bacterias tienen un gran potencial debido a su amplio espectro de aplicaciones. En este trabajo revisamos generalidades sobre las quitinasas y quitosanas bacterianas y su uso en la producción de quitosano-oligosacáridos. Este tipo de biomoléculas han creado un mercado biotecnológico diversificado e ilimitado que incluye aplicaciones en alimentos como aditivos y bioconservadores, asimismo en múltiples aplicaciones biomédicas enfocadas a la actividad anti-tumoral, a la capacidad como agentes antioxidantes y como anti-diabéticos. Además, en la agricultura se han aplicado como factores de nodulación, como agentes osmoprotectores y antioxidantes para beneficiar el crecimiento de cultivos. Es importante destacar el potencial de las quitinasas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*, el bioinsecticida más importante mundialmente. Las quitinasas de *B. thuringiensis* se han empleado recientemente para generar quitosano-oligosacáridos que tienen actividad antimicrobiana, particularmente contra diversas bacterias patógenas de importancia en salud pública transmitidas por alimentos.

### ABSTRACT

Chitinases synthesized by plants, fungi, insects and bacteria have a huge potential owing to its wide range of applications. In this work we review generalities about chitin, chitosane, chitinases and chitosanases from bacteria and their use in the production of chitin-oligosaccharides. This kind of biomolecules has created a diversified biotechnology market, including unlimited applications such as food additives and biopreservative, in biomedical applications focused mainly on anti-tumor activities, as antioxidants and anti-diabetics. In agriculture chitin-oligosaccharides has been applied as nodulation factors, osmoprotectors agents and antioxidants to benefit crop growth. It is important to note the potential use of chitinases biosynthesized by *Bacillus thuringiensis*, the most important biopesticide worldwide. Chitinases from *B. thuringiensis* been used recently to generate chitin-oligosaccharides with antimicrobial activity, in particular against food-borne pathogenic bacteria of importance in public health.

Recibido: 4 de mayo de 2011  
Aceptado: 16 de septiembre de 2011

### INTRODUCCIÓN

La quitina se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. Es el segundo polímero natural más abundante solamente superado por la celulosa. Su gran distribución se debe a que es el principal componente estructural del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejo, camarón, langosta, calamar y camarón) y de la cutícula de insectos, también se encuentra en las algas, diatomeas marinas, y en la pared celular de hongos. Estructuralmente la quitina es un mucopolisacárido, insoluble en solución acuosa, que presenta una estructura lineal compuesta de unidades repetitivas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidas por enlace glicosídico del tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). La estructura de la quitina está altamente relacionada con la estructura de la celulosa, ya que esta presenta en la posición C-2 un grupo hidroxilo (-OH) mientras que la quitina presenta un grupo acetamida (-NHCOCH<sub>3</sub>) en el mismo carbono [1] (figura 1). Cuando la quitina es desacetilada se produce la quitosano, la cual al igual que la forma acetilada presenta múltiples aplicaciones. En este trabajo presentamos diversos usos de la quitina, la quitosano, las enzimas que las hidrolizan, generalidades sobre el sistema quitonolítico de una bacteria insecticida y como se puede emplear para generar quitosano-oligosacáridos con actividad antimicrobiana.

#### Palabras clave:

quitina; quitosano; quitinasas; quitosanasas; quitosano-oligosacáridos.

#### Keywords:

chitin; chitosan; chitinases; chitosanases; chitin-oligosaccharides.

\* Departamento de Alimentos, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Ex-Hacienda El Copal, carretera Irapuato-Silao km 9. Irapuato, Guanajuato, México. C.P. 36500. Teléfono: (+52) 462 6241889, ext.1532; Fax: (+52) 462 6241889, ext. 1513. Correo electrónico: josebar@ugto.mx

\*\* Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. Torreón-Matamoros km 7.5 Ciudad Universitaria Campus Torreón. Torreón, Coahuila, México. C.P. 27104.

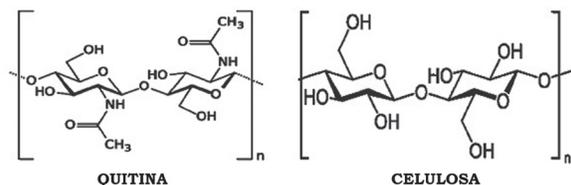


Figura 1: Estructura tipo silla de la quitina y celulosa. (Modificado de [2]).

### OBTENCIÓN DE QUITINA

La quitina puede ser obtenida por el procesamiento de conchas de crustáceos y de hongos miceliales, sin embargo, su producción comercial suele asociarse solamente con los productos de la industria marina, tales como caparacho (exoesqueleto) de camarón [3]. Los caparazones contienen gran cantidad de proteínas y de carbonato de calcio, estos compuestos envuelven a las microfibrillas de quitina [4]. El tratamiento de los caparazones de crustáceos, consiste principalmente en la eliminación de proteínas por una “desproteínización”, que se realiza con una solución alcalina caliente al 10 %, por lo general, de hidróxido de sodio o potasio; acompañado por una eliminación de minerales o “desmineralización” con lo que se elimina el carbonato de calcio, esto se lleva a cabo con ácidos diluidos. La quitina ha despertado gran interés no sólo como un recurso subutilizado, sino también como un nuevo material funcional de alto potencial en diversos campos. Varios derivados se han preparado a partir de la quitina, entre los que se encuentran la quitosana y los quitoligosacáridos [5, 6]. Uno de los principales derivados de la quitina es la quitosana, descubierta por Rouget en 1859. La quitosana se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina y está compuesta por dos tipos de unidades estructurales (N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina) distribuidas aleatoriamente a lo largo de la cadena, unidas entre sí por enlaces del tipo  $\beta$  (1→4) (figura 2).

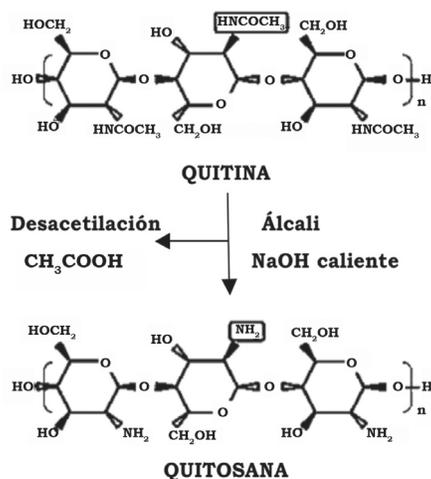


Figura 2. Estructura química de la quitosana y su producción a partir de quitina (Modificado de [5]).

### QUITOSANA, PRODUCTO DESACETILADO DE QUITINA

La quitosana se produce generalmente por la desacetilación de la quitina mediante un método alcalino. La quitina se trata con solución alcalina concentrada (40 % - 45 % de hidróxido de sodio) y temperatura de 120 °C/1-3 horas [4], sin embargo esta *N*-desacetilación casi nunca es completa y la quitosana es considerada como un derivado de la quitina parcialmente *N*-desacetilado. La consecuencia de lo anterior es una clara distinción entre la quitina y quitosana proporcionada precisamente por el grado de *N*-desacetilación [7]. No obstante, la *N*-desacetilación también puede realizarse por un método alternativo a través de la acción de las enzimas, y además con una ventaja respecto al método químico, que es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas que le confiere características primordiales para posteriores aplicaciones, principalmente en biomedicina. Las enzimas involucradas en este proceso son las quitina desacetilasas clasificadas por la comisión de enzima (EC) como hidrolasas 3.5.1.4, que catalizan la conversión de quitina a quitosana por la desacetilación de los residuos *N*-acetil-D-glucosamina. Sin embargo este método no presenta la eficiencia de los métodos químicos, pues a pesar de que la actividad que presenta esta enzima es alta, solo un pequeño porcentaje de (aproximadamente el 50 %) del sustrato es desacetilado, debido a la alta cristalinidad del sustrato natural. Como resultado, sólo los grupos de acetilo externos de la partícula son accesibles y por lo tanto modificados. Sin embargo se sigue investigando en este aspecto para mejorar la actividad enzimática, lo cual requiere disminuir la cristalinidad de la quitina para transformarla en un sustrato más accesible para las quitina desacetilasa a través de algún pre-tratamiento. A este respecto se pueden mencionar los métodos físicos como opciones, por ejemplo, se han probado el calentamiento y el tratamiento con ultrasonido con bajos resultados pues no han logrado mejorar la disponibilidad de la quitina como sustrato vulnerable para la acción de la quitina desacetilasa. También se ha probado la explosión de vapor limitado, lo que lleva a un calentamiento de hasta 120 °C a alta presión seguida de una liberación repentina de presión, sin alterar las propiedades de la quitina. Además, el tratamiento químico con ácidos fuertes ha permitido la obtención de la quitina con una estructura más abierta, pero el problema de disponibilidad del sustrato aún no se ha resuelto al 100 % [8].

Por otro lado, la cantidad relativa de los dos monosacáridos en la quitosana puede variar, proporcionando una molécula con diferentes grados de desacetilación

entre 75 % a 95 % lo que origina compuestos con características muy distintas y pesos moleculares que oscilan entre 50 kDa - 2,000 kDa. Además, la viscosidad y los valores de pKa también se alteran dependiendo del grado de desacetilación que presenta el compuesto. Por lo tanto, el compuesto quitosana no se refiere a un compuesto químicamente definido como único, sino que se limita a referirse a una familia de copolímeros con diversos grados de acetilación [5].

### QUITOSANA EN LA NATURALEZA

La quitosana también se encuentra abundantemente en la naturaleza, formando parte de las paredes celulares de los hongos de la clase Zigomicetos [9], en el alga verde *Chlorella* sp., en levaduras y protozoarios, así como en cutículas de insectos [10]. Los recientes avances en la tecnología de fermentación sugieren que el cultivo de hongos (*Aspergillus niger*) puede proporcionar una fuente alternativa de quitosana [7]. Sin embargo es importante considerar que la quitosana de crustáceos y hongos es ligeramente diferente: mientras que los grupos acetilo presentes en la quitosana producida a partir de la quitina de crustáceos se distribuyen uniformemente a lo largo de la cadena polimérica, la quitosana aislada de paredes celulares de los hongos contiene los residuos acetilo concentrados en ciertos puntos del polímero. En contraste con la mayoría de los polisacáridos de origen natural, por ejemplo, la celulosa, el dextrano, la pectina, el ácido alginico, el agar, la agarosa y las carrageninas, que son neutros o de naturaleza ácida, la quitosana es un ejemplo de un polisacárido con alta basicidad. Su contenido de nitrógeno varía de 5 % a 8 % en función del grado de desacetilación sobre todo en la forma de grupos amino primarios alifáticos o de cadena abierta [8].

### PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA QUITOSANA Y SU DIFERENCIA CON LA QUITINA

La desacetilación transforma a la quitina insoluble en quitosana soluble en soluciones ligeramente ácidas, por lo cual la principal diferencia entre la quitina y la quitosana se encuentra en su solubilidad. La quitosana es por lo tanto quitina que ha sido N-desacetilada hasta tal punto que es soluble en solución acuosa ligeramente ácida (por ejemplo: 0,1 M de ácido acético). La quitosana nativa presenta un pKa ~ 6,3, es insoluble en agua, en medio alcalino e incluso en solventes orgánicos. Sin embargo, las sales de quitosana formadas por neutralización con ácidos orgánicos (por ejemplo, 1 % - 10 % ácido acético, fórmico, succínico,

láctico, ácidos glutámico y málico) o ácidos inorgánicos (ácido clorhídrico) son solubles en agua. La solubilidad de la quitosana se le atribuye a los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) que contiene, los cuales al ser protonados después de su disolución a pH 6 o inferior forma grupos catiónicos de amina (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), lo que aumenta la repulsión eléctrica y da como resultado un polisacárido soluble policatiónico, con un gran número de grupos cargados. Por otra parte, la quitosana tiende a perder su carga a pH más altos, por lo que puede ser precipitada debido a la pérdida de protones (desprotonación) de los grupos amino [10].

### APLICACIONES DE LA QUITOSANA

La quitosana presenta un conjunto de propiedades que resultan ventajosas para su aplicación en diversos campos. Por ejemplo, su capacidad de secuestrar iones metálicos de transición y post-transición es de utilidad en la descontaminación de desechos industriales, debido a su naturaleza policatiónica la cual le confiere una acción floculante que puede ser utilizada en numerosas aplicaciones industriales [11]. Otras aplicaciones es el uso como soporte para inmovilización de enzimas, formación de películas biodegradables, como agente antimicrobiano y como aditivo alimentario [12]. La capacidad antifúngica está ampliamente documentada y ha tenido aplicaciones dentro del área de la agricultura para el control de hongos fitopatógenos [13]. Además la quitosana es una excelente generadora de fibras, películas y membranas, que se pueden preparar en forma de microesferas y microcápsulas, lo que unido a su biocompatibilidad y su biodegradabilidad promueven su empleo en diversas áreas principalmente en las industrias biomédica y farmacéutica como agentes [14] y antitumorales [15].

### PRODUCCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE QUITOSANA

Los oligosacáridos de quitosana han despertado mucho interés debido a su alta estabilidad y a las propiedades biológicas que presentan, lo cual ha generado el desarrollo de diferentes métodos para producirlos en cantidades adecuadas que permitan caracterizarlos. Entre éstos protocolos destacan los métodos físicos como la radiación y la ultrasonificación, los métodos químicos (hidrólisis ácida) y los métodos biológicos de los que se prefiere la degradación enzimática, ya que esta puede ser controlada por medio de pH, temperatura y tiempo de reacción. La quitosana es susceptible a la degradación enzimática por proteínas de diferentes fuentes [16], incluidas enzimas no específicas, tales como la

lisozima presente en las lágrimas, saliva, sangre y leche [17], quitinasas [18], celulasas, hemicelulasas, proteasas (papaina y pronasa) [19], lipasas, glucanasas, y por enzimas específicas como son las quitosanasas [20]. Las quitosanasas (Quitosano N-acetil-glucosamino-hidrolasa, EC 3.2.1.132) son enzimas que atacan la parte desacetilada de la quitina, catalizando la endohidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre los residuos de D-glucosamina (GlcN-GlcN) produciéndose oligosacáridos de diferentes grados de polimerización, entre ellos de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 unidades de D-glucosamina [21].

### LAS QUITOSANASAS

Recientemente se ha reportado la producción de diferentes enzimas con actividad quitosanólítica, producidas por una gran cantidad de organismos, incluyendo, hongos, plantas y bacterias. Estas enzimas igual que las quitinasas mantienen un balance ecológico en la naturaleza [22]. Una gran cantidad quitosanasas han sido identificadas y secuenciadas, agrupándose en cinco familias de glicosil hidrolasas 5, 8, 46, 75 y 80. Como ejemplos de las quitosanasas se encuentran las producidas por bacterias gram positivas como *Streptomyces* sp. N174 188 y *Bacillus circulans* MH-K1 268. Fukamizo y colaboradores (1994 y 1995) [23, 24] propusieron la clasificación de las quitosanasas en tres distintas clases de acuerdo con su especificidad hacia determinado sustrato: (i) **Clase I**. En esta se encuentran quitosanasas que rompen el enlace GlcN-GlcN y GlcNAc-GlcN del quitosano, por ejemplo quitosanasas obtenidas de *Bacillus pumilus* BN262, *Penicillium slandicum* 84 y *Streptomyces* sp. N174 [23]. (ii) **Clase II**. Estas quitosanasas rompen solamente los enlaces específicos entre las fracciones GlcN-GlcN. Este tipo de enzimas han sido aisladas de *Bacillus* sp. No.7-M. (iii). **Clase III**. Las quitosanasas hidrolizan enlaces GlcN-GlcN y GlcN-GlcNAc. Ejemplo de enzimas quitosanasas clase III son las obtenidas de *Streptomyces griseus* HUT 6037, *Bacillus circulans* MH-K1, *Nocardia orientalis* y *Bacillus circulans* WL-126 [25, 26].

### PRODUCCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE QUITINA

Los oligosacáridos son polímeros formados a base de monosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos, con un número de unidades monoméricas en promedio entre 2 y 10, y la gran variedad existente de estos oligosacáridos se debe al diferente número de monómeros, a las distintas ramificaciones, el tipo de mo-

nosacáridos que se presentan y la forma de enlazarse para formar las cadenas de los polisacáridos. La degradación de la quitina típicamente produce una mezcla de quito-oligosacáridos de diferente tamaño que pueden obtenerse a través de tratamientos químicos, físicos o enzimáticos [27]. Estos compuestos son biodegradables, no tóxicos y presentan una gran cantidad de propiedades biológicas, (bactericidas, antifúngicas, antivirales, antitumorales, antioxidantes, estimulantes del sistema inmune, disminuyen la presión sanguínea como hipertensivos y reducen los efectos hipocolesterolemicos) [28].

Los quito-oligosacáridos con bajo peso molecular son solubles a pH neutro lo cual les confiere una alta conveniencia para diversas aplicaciones en la industria [27]. La hidrólisis ácida de la quitina genera fragmentos de bajo peso molecular y con un grado bajo de desacetilación, por lo que este método representa una ventaja con respecto a otros métodos para generar compuestos con mayor actividad biológica, sin embargo, los ácidos utilizados pueden causar desacetilación e hidrólisis del polímero. Los tratamientos químicos también pueden generar un problema del tipo ambiental, ya que es necesario tratar el agua residual a través de procesos como la neutralización y la detoxificación [29]. Por otro lado, uno de los métodos físicos más comúnmente utilizado para obtener quito-oligosacáridos emplea el ultrasonido pues presenta la ventaja de no generar residuos peligrosos como otros métodos, además se pueden evitar etapas en el proceso como la purificación de las proteínas y no se producen oligómeros de alto peso molecular. Otro método considerado como una buena alternativa es la ultrasonificación y su principal ventaja es que se producen solamente polímeros de bajo peso molecular. De igual manera los quito-oligosacáridos pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática con lisozimas, quitosanasas, glucosaminidasas y quitinasas [27, 29].

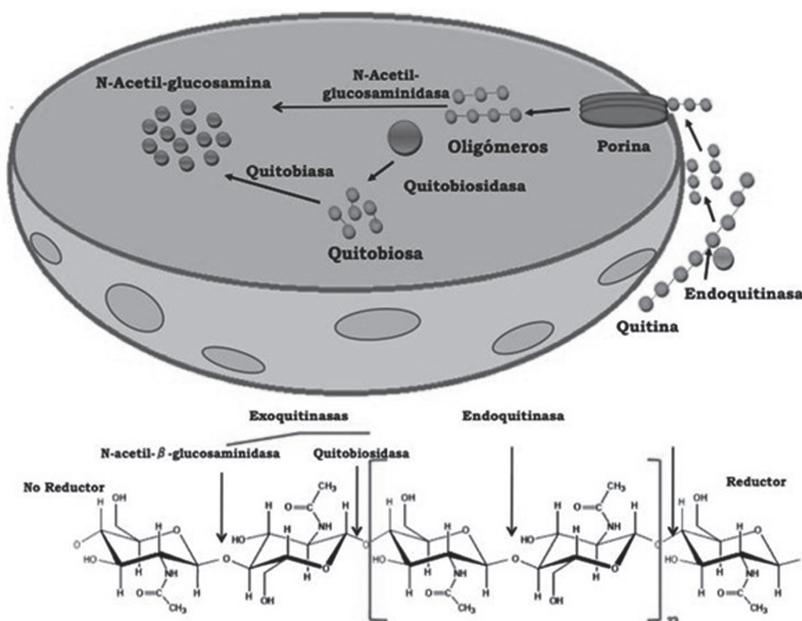
### QUITINASAS

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) presentes en los polímeros de N-acetil-glucosamina, es decir la quitina [30]. Las quitinasas son biosintetizadas por un amplio grupo de microorganismos entre los que se encuentran bacterias [26, 31], hongos [32], plantas, algunos virus [33] y el humano [34]. Dependiendo del organismo de origen, las quitinasas presentan diferentes funciones, por ejemplo, las bacterias producen quitinasas probablemente para hidrolizar quitina presente en la naturaleza como fuente de

carbono y nitrógeno [35]. Las quitinasas de hongos presentan homología en cuanto a la función que desempeñan en nutrición, pero también presentan cierta actividad en el desarrollo de los procesos de morfogénesis ya que la quitina constituye el principal componente de su pared celular. En los animales y en las plantas las quitinasas juegan un papel muy importante en los mecanismos de defensa contra el ataque de muchos patógenos. En términos generales las enzimas quitinolíticas pueden ser clasificadas en dos tipos:

- (i) Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14), hidrolizan la quitina de manera aleatoria en los enlaces glicosídicos internos  $\beta$ -1-4, liberando oligosacáridos de diferentes tamaños.
- (ii) Las exoquitinasas actúan de manera progresiva por el extremo reductor de la quitina, liberando quitobiosa y N-acetilglucosamina, las cuales son posteriormente hidrolizadas por las quitobiosidasas (EC 3.2.1.29) y las 1,4  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30), respectivamente [36].

La acción específica de las quitinasas para degradar a la quitina en sitios particulares se observa en la figura 3.



**Figura 3.** Acción hidrolítica de las endoquitinasas y exoquitinasas de *Serratia marcescens*. Las endoquitinasas actúan en los enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) internos de la quitina liberando quito-oligosacáridos de diferente grado de polimerización (GP). Las exoquitinasas actúan por el extremo no reductor de la quitina liberando unidades de quitobiosa (GP=2) (quitobiosidasas) o N-Acetil-glucosamina (GlcNAc, GP=1) (1,4  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas). Las quitobiosas actúan de manera específica sobre dímeros de GlcNAc, liberando el monómero (Modificado de [37]).

### SISTEMA QUITINOLÍTICO DE UNA CÉLULA MICROBIANA

El estudio de las quitinasas se ha incrementado en los últimos años caracterizándose una gran variedad de estas enzimas con respecto a su

peso molecular que oscila en un rango de 20 kDa a 90 kDa, o bien a la actividad en un amplio rango de valores de pH y temperaturas.

Existen una gran variedad de quitinasas que han sido aisladas y caracterizadas de diferentes microorganismos, por ejemplo las endoquitinasas de *Streptomyces violaceusniger* y las quitinasas termoestables de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, las cuales muestran temperaturas óptimas de actividad entre 28 °C y ~80 °C, respectivamente. Asimismo algunas enzimas presentan un rango de pH óptimo que oscila entre 8,0 y 10,0, sin embargo, algunas quitinasas como las aisladas de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 presentan un rango de pH óptimo comprendido de 4,5 a 5,0. Debido a que las quitinasas presentan un espectro de actividad amplio a diferentes valores de pH y temperatura, es muy probable su aplicación en diferentes procesos sujetos a múltiples condiciones biofísicas [6].

En los últimos años se han aislado y caracterizado especies bacterianas que presentan actividad quitinolítica, misma que se ha combinado en diferentes aplicaciones como potenciar el efecto insecticida de las proteínas Cry (cristales insecticidas producidos por *Bacillus thuringiensis*) [38], actividad antifúngica [39] y en la producción de quito-oligosacáridos [40, 41]. Las bacterias son los organismos quitinolíticos más prometedoras, son las más ampliamente estudiadas y además son consideradas como los organismos con mayor producción de enzimas degradadoras de quitina [26]. Adicionalmente existen otras bacterias altamente quitinolíticas que pertenecen a los géneros *Serratia* [35], *Enterobacter* [42] y *Aeromonas* [6].

## GENERALIDADES SOBRE LAS QUITINASAS DE CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram-positiva que sintetiza millones de proteínas llamadas Cry las cuales forman cuerpos de oclusión o cristales que constituyen el principio activo de los bioinsecticidas comerciales a base de esta bacteria. Adicional a las proteínas Cry, se ha reportado la síntesis de una gran cantidad de biomoléculas que son usadas de manera natural por la bacteria con diferentes propósitos entre los que se incluyen las defensas contra otras bacterias y el aprovechamiento de diferentes sustratos como la quitina [43]. Con relación a este último punto Smirnov y Valero, (1977) [44] reportaron por primera vez la actividad quitinolítica de nueve subespecies de *B. thuringiensis* aisladas en medio de quitina coloidal. De manera particular en México, existen grupos de investigación que han enfocado la mayoría de sus actividades al estudio y conocimiento de las quitinasas y quitosanas procedentes de cepas mexicanas de *B. thuringiensis*. Por ejemplo Rojas-Avelizapa y colaboradores (1999) [3] realizaron un escrutinio de 152 cepas mexicanas de *B. thuringiensis* y seleccionaron particularmente una cepa perteneciente a la serovariedad *tolworthi* la cual presentaba alta actividad quitinolítica, proteolítica y moderada actividad hacia el gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*). Adicionalmente Barboza-Corona y colaboradores (1999) [43] identificaron tres cepas de *B. thuringiensis* nativas de México que producen endoquitinasas, quitobiosidasas y *N*-acetil- $\beta$ -glucosaminidasas en medio que contiene quitina coloidal como única fuente de carbono. Posteriormente este mismo grupo clonó la endoquitinasa chiA74 de *B. thuringiensis* serovar *kenyae* cepa LBIT-82 en una cepa recombinante de *Escherichia coli* DHaF<sup>r</sup>. La expresión de la enzima ChiA74 presentó una actividad óptima en un amplio rango de pH (4,0-9,0), con una temperatura de 57.2 °C [45]. En el 2004, Cruz-Camarillo y colaboradores realizaron un análisis en 77 cepas reportando por primera vez la producción de quitosanas en cepas de *B. thuringiensis* [46].

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS QUITO-OLIGOSACÁRIDOS

En los últimos años los estudios sobre quitosana, quitina y la generación de diferentes derivados, y en particular, los quito-oligosacáridos originados de ambos compuestos (quitina, quitosana) han generado una inusitada y especial atención originada por la gran cantidad y diversidad de productos obtenidos. Sobre sale la potencial aplicación en áreas tan heterogéneas

como la industria de los alimentos ya sea como aditivos, prebióticos o bioconservadores; en la industria farmacéutica y de la biomedicina para el tratamiento de enfermedades, y en la agricultura incluidos en nuevas formulaciones que promueven el desarrollo de las plantas y optimizan la fijación de nitrógeno [1]. Es particularmente especial la atención centrada sobre la producción a gran escala de los quito-oligosacáridos y sus derivados debido al amplio potencial y la eventual aplicación biotecnológica para inhibir, controlar y/o eliminar microorganismos identificados como patógenos que pudieran representar un riesgo a la salud humana, y que también representan un riesgo microbiológico en el sector industrial por el deterioro que causan durante alguna etapa del proceso productivo de los alimentos [1, 41].

La aplicación biológica más importante de estos quito-oligosacáridos bioactivos se debe principalmente al efecto antimicrobiano que ejercen contra diversos microorganismos como bacterias y hongos, esta actividad inhibitoria que muestran se ha reportado como significativamente superior a la de quitosana. Se ha documentado ampliamente que la actividad antibacteriana de los quito-oligosacáridos puede variar de acuerdo al grado de desacetilación (GD) o al grado de polimerización (GP) que presenten. Por ejemplo, la actividad aumenta cuando el grado de desacetilación es mayor pero disminuyen con el aumento del grado de polimerización, sin embargo también es conocido que quito-oligosacáridos con alto GP pueden exhibir un efecto bactericida hacia determinadas bacterias representativas del grupo de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) como son *Bacillus cereus* (Gram-positiva) y *Escherichia coli* (Gram-negativa) [47]. De acuerdo a Shih-Bin y colaboradores (2009) [47] la función biológica y especialmente la actividad antimicrobiana de los quito-oligosacáridos se encuentra íntimamente relacionada con su tamaño y se requiere de métodos de hidrólisis específicos para prepararlos a partir del ajuste del grado de desacetilación de la  $\beta$ -quitosana utilizando quitinasas de *Trichoderma harzianum*, lo cual puede generar quito-oligosacáridos de tamaños específicos con funciones biológicas muy versátiles, como por ejemplo la relevancia en la mayor inhibición del crecimiento en bacterias Gram-negativas con respecto a las Gram-positivas, demostrando que es posible una menor sensibilidad a las moléculas más pequeñas de quitosana. Yang (2003) [48] al trabajar con los derivados hidrosolubles del disacárido *N*-alquilado de quitosana demostraron que la actividad antibacteriana se ve afectada por el grado de sustitución (GS) y tipo de disacárido presente en la molécula, además del valor

de pH en el medio. De acuerdo a lo anterior establecen que independientemente del disacárido unido, al tener un grado de sustitución del 30 % a 40 % tiene una actividad antibacteriana mayor contra los organismos de prueba *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, mismos que son más susceptibles a la celobiosa-quitosano derivado con GS de 30 % a 40 % y la maltosa-quitosano derivado incluso si presentan el mismo GS. Sin embargo también demuestran que a valores de pH 6,0 los derivados de los disacáridos exhiben menor actividad que el quitosano, pero resulta muy interesante el hecho de que estos resultados se invierten a pH 7,0

Con respecto a los efectos que pueden ocasionar algunas modificaciones en el grado GD y el GP de los quito-oligosacáridos, también se ha investigado el efecto antimicrobiano de la quitosana, la quitosanasa de *Pseudomonas* CUY8 y principalmente las implicaciones en la actividad de los quito-oligosacáridos generados con la misma quitinasa o quitosanasa obtenidos a una concentración de 1 % y con diferentes grados de polimerización (4 a 9) y con amplios grados de desacetilación (50 % a 90 %). En el mencionado ensayo de la actividad inhibitoria no solo contra bacterias sino además contra hongos [49], muestra sin lugar a dudas que al incrementarse el GD de los quito-oligosacáridos se observa un aumento en la actividad antimicrobiana, sin embargo disminuye conforme se incrementa el GP. Además es relevante mencionar que las bacterias probadas (*S. aureus*, *Streptococcus lactis*, *B. subtilis*) son más susceptibles al efecto inhibitorio de los quito-oligosacáridos que los hongos (*Rhodotorula bacarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus sapiculatus*, *Penicillium charlesii*, *Aspergillus niger*) utilizados en la misma investigación. Los anteriores resultados obtenidos concuerdan con los reportados al ensayar el efecto de estas moléculas con un GP de 2 a 8 contra hongos fitopatógenos como son *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushiy*, *Allernaria alternata* [50].

Ji y colaboradores (2009) [51] en un estudio utilizaron dos tipos de bacterias patógenas, unas que se transmiten por los alimentos las cuales ocasionan problemas gastrointestinales (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25293, *E. coli* ATCC 25922, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844) y otras que atacan la piel (*Propionibacterium acnes* ATCC 6919, *Propionibacterium granulosum* ATCC 25564, *Malassezia furfur* ATCC 14521, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228). Analizaron el efecto antimicrobiano de quito-oligosacáridos con tres diferentes pesos moleculares [QOS-A (n=56), QOS-B (n=16-55), QOS-H (n=10-16)], encontrando que la mayoría de los patógenos analizados fueron susceptibles a los quito-oligosacáridos (tabla 1).

Tabla 1.  
Actividad antimicrobiana\* de quito-oligosacáridos contra bacterias patógenas

Microorganismo	COS-A	COS-B	COS-H
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	12	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	10
<i>Escherichia coli</i>	10	10	9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11	11	9
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	-
<i>Propionibacterium granulosum</i>	-	-	-
<i>Malassezia furfur</i>	13	15	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-

\*La actividad fue medida en mm de halo de inhibición. El signo negativo indica que carece de actividad (modificado de [51]).

Adicionalmente se han reportado quito-oligosacáridos generados con quitinasas heterólogas expresadas en *E. coli* clonadas a partir de microorganismos como *B. thuringiensis* sub sp *kurstaki* (LBIT-287) y *Serratia marcescens* Nima. Estos derivados han probado su efectividad contra el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. xylosum*; además no se observó ninguna actividad inhibitoria contra el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *B. cereus* [40]. En estudios posteriores estos quito-oligosacáridos se probaron efectivamente contra *Listeria innocua*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* y *Proteus vulgaris* mostrando una amplia inhibición de su crecimiento, sin embargo no se determinó un efecto que altere el desarrollo de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae* [41].

Una problemática comúnmente manifestada en los alimentos perecederos es la reducción de su vida útil o vida de anaquel, y este deterioro se atribuye principalmente a factores que promueven la presencia de microorganismos patógenos y a las reacciones oxidativas en un producto alimenticio [52]. Una alternativa para la solución de esta problemática representa un novedoso campo de aplicación para los quito-oligosacáridos a través de la innovación en el desarrollo de películas comestibles elaboradas con quitosano y derivados tetrahidrocurcuminoides (tetrahydrocurcuminoid Derivatives: THCs) que despliegan un efecto doble como antioxidantes y además actúan como agentes antimicrobianos [53]. Estas películas se desarrollan utilizando el polímero quitosano en el que se impregnan los derivados THC1 (5-hidroxi-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) hept-4-en-3-ona) y THC2 (5-hidroxi-1, 7-bis(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) hept-4-en-3-ona) preparados a partir de curcumina natural extraída de las raíces de la planta herbácea *Curcuma longa* L. Se demostraron

interacciones entre los TCHs y la quitosana utilizando estudios de espectrometría de absorción visible-ultravioleta, sin embargo se desconoce la naturaleza exacta del complejo formado, lo cual impide comprobar la actividad antibacteriana contra la cepa *Listeria innocua*. Lo anterior indica que los THC's por si solos no son lo suficientemente bioactivos, pero al asociarse al biopolímero evidentemente representan una práctica novedosa y alternativa para desarrollar productos de alto rendimiento para el embalaje y empaque de alimentos perecederos, con la finalidad de mantener y/o extender su tiempo de vida útil en el mercado y a la vez preservar la calidad del alimento y por ende la salud de los consumidores. Otras alternativas que involucran a los quito-oligosacáridos como auxiliares en la extensión de la vida de anaquel se realizó en carne molida al tratar de incrementar el espectro antimicrobiano de la lisozima sobre microorganismos contaminantes por la adición de quito-oligosacáridos producidos por la radiación de la quitosana con rayos  $\gamma$  que produce derivados de diferentes pesos moleculares [54]. La exposición a las radiaciones generó derivados con un peso molecular hasta 8,3 kDa, sin embargo, al disminuir el peso molecular de los oligosacáridos se disminuye también su actividad antibacteriana y contrariamente se incrementa su poder antioxidante. Lo anterior logró demostrar que la combinación entre la lisozima y los oligosacáridos generan un efecto sinérgico contra las bacterias logrando eliminar a *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *B. cereus* y además, reduce significativamente la carga de *S. aureus*. Es conveniente mencionar que el efecto sinérgico demostrado es mucho mayor que cuando actúan la enzima y los oligosacáridos por separado, y gracias a esta sinergia se puede extender hasta por 15 días la vida de anaquel de la carne molida, mejorar su calidad microbiológica y al mismo tiempo mantener su calidad sensorial y su aceptación por los consumidores. Se ha demostrado que la quitosana de bajo peso molecular (5-27 kDa) inhibe el crecimiento de *Aureofaciens* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, causando la muerte entre 80 % -100 % de las células [55]. Asimismo, inhiben a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *L. bulgaricus* [56].

Por otro lado, Rhoades y Roller, (2000) [57] encontraron que al agregar 0.3 g de quitosana por litro de jugo de manzana se inhibe por completo el desarrollo de levaduras hasta por un periodo de 13 días. Adicionalmente, Roller y Covill (1999) [58], probaron el

efecto antibacteriano de la quitosana contra diferentes levaduras que se desarrollan en medios de cultivo y en el jugo de manzana, observando que *Mucor racemosus*, *Byssoschlamys* spp. y *Zygosaccharomyces bailii* son sensibles a la acción de la quitosana, mientras que *Saccharomyces ludwigii* es resistente. Se ha observado que los oligosacáridos generados por una celulosa tienen efecto inhibitorio contra *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*; asimismo cuando la mezcla de oligosacáridos se agregó a la leche cruda se redujo el crecimiento de mesófilos y de *Salmonella* sp., prolongándose su vida útil [59]. Lo anterior pone en manifiesto la viabilidad del uso de quito-oligosacáridos como bioconservadores en alimentos debido a su origen natural y a su efecto antibacteriano.

## CONCLUSIONES

El uso biotecnológico de las quitinasas no solamente se reducen al enfoque tradicional en biocontrol a través de fungicidas y/o bioinsecticidas pues las investigaciones actuales las ubican con un espectro más amplio de aplicación, multifacético y multidisciplinario gracias a la actividad quitinolítica que ejercen sobre la quitina para generar quito-oligosacáridos. Las actividades biológicas de los quito-oligosacáridos revelan un creciente interés por desarrollar estudios que hagan patente su aplicación como aditivos y agentes de biocontrol en alimentos, aplicaciones clínicas y agrícolas. Actualmente se están desarrollando investigaciones innovadoras para lograr optimizar la producción y purificación de quito-oligosacáridos a gran escala para incrementar su potencial aplicación como bioconservadores en alimentos debido a que estos quito-oligosacáridos generados por quitinasas y quitinasas tienen actividad inhibitoria contra bacterias patógenas de importancia en salud pública, muchas de ellas transmitidas por alimentos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Guanajuato por el apoyo financiero del proyecto 67/10 otorgado a J.E.B-C. Cristóbal Castañeda-Ramírez estudiante de la Maestría en Biociencias y Rubén Darío-Pacheco Cano de la licenciatura en Ingeniería en Alimentos, ambos fueron apoyados a través de una beca otorgada por el CONACYT-México y la Universidad de Guanajuato, respectivamente.

## REFERENCIAS

- [1] Suzuki, S., (2000). Biological effects of chitin, chitosan, and their oligosaccharides. *Biotherapy* 14: 965-971.
- [2] Merzendorfer, H., Zimoch, L., (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206: 4393-4412.
- [3] Rojas Avelizapa, L., Cruz Camarillo, R., Guerrero, M., Rodríguez Vázquez, R., Ibarra, J. E., (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15(2): 299-308.
- [4] Kumar, M. N. V. R., (2000). A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46: 1-27.
- [5] Gouda Fouad, D. R., (2008). *Chitosan as an antimicrobial compound: Modes of action and resistance mechanisms*. Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität, Bonn, Germany. Tesis doctoral, p. 215.
- [6] Bhattacharya, D., Nagpure, A., Rajinder, K. G., (2007). Bacterial chitinases: Properties and Potential. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27: 21-28.
- [7] Rabea, E., Badawy, C., Stevens, V., Smagghe, G., Steurbaut, W., (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromol.* 4: 1457-1465.
- [8] Hernández Nuñez, C. M., Varo Argüello, W. E., Leyva Reyes, N., Ramírez Barragan, C. A., Andrade Ortega, J., (2008). *Utilización de residuos de camarón para la obtención de quitina blanqueada: propuesta de una metodología en base de tratamientos alcalino-base y ozono*. Avances de la Investigación Científica en CUBCA, Universidad de Guadalajara. p-659-666. ISBN 978 607 00 2083 4.
- [9] Suntornsuk, W., Pochanavanich, P. E., Suntornsuk, I., (2002). Fungal chitosan production on food processing by-products. *Process Biochem.* 37(7): 727-729.
- [10] Singla, A. K., Chawla, M., (2001). Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1047-1067.
- [11] Guibal, E., (2004). Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Sep. Purif. Technol.* 38(1): 43-74.
- [12] Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., Albertengo, L., (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food, *Macromol. Bioscience.* 3:521-530.
- [13] Mulawarman, J., Hallmann, D., Bell, B., Holtwiesche, K., Sikora, R. A., (2001). Effects of natural products on soil organisms and plant health enhancement. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.* 66: 609-617.
- [14] Chen, A. S., Taguchi, T., Sakai, K., Kikuchi, K., Wang, M. W., Miwa, I., (2003). Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1326-1330.
- [15] Qin, C. Q., Du, Y. M., Xiao, L., Li, Z., Gao, X. H., (2002). Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 31: 111-117.
- [16] Muzzarelli, R. A. A., (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 131-140.
- [17] Varum, K. M., Myhr, R., Hjerde, J. N., Smidsrød, O., (1997). In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr. Res.* 299: 99-101.
- [18] Sikorski, P., Stokke, B. T., Sørbotten, A., Vårum, K. M., Horn, S. J., Eijsink, V. G., (2005). Development and application of a model for chitosan hydrolysis by a family 18 chitinase. *Biopolymers.* 77: 273-285.
- [19] Kumar, A. B. V., Varadaraj, M. C., Gowda L. R., Tharanathan R. N., (2005). Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 391: 167-175.
- [20] Rivas, L. A., Parro, V., Moreno Paz, M., Mellado, R. P., (2000). The *Bacillus subtilis* 168 csn gene encodes a chitosanase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme. *Microbiol.* 146: 2929-2936.
- [21] Omumasaba, C. A., Yoshida, N., Sekiguchi, Y., Kariya, K., Ogawa, K., (2000). Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 19-27.
- [22] Yan, W., Peigen, Z., Jianxing, Y., Xiaorong, P., Pingping, W., Weiqing, L., Shendan, T., (2007). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas* CUY8 Asia Pacific. *J. Clin. Nutr.* 16(1): 174-177.
- [23] Fukamizo, T., Honda, Y., Goto, S., Boucher, I., Brzezinski, R., (1995). Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Biochem. J.* 311: 377-383.
- [24] Fukamizo, T., Ohkawa, T., Ikeda, Y., Goto, S., (1994). Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *BBA-Protein. Struct. M.* 1205: 183-188.
- [25] Tanabe, T., Morinaga, K., Fukamizo, T., Mitsutomi, M., (2003). Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 354-364.
- [26] Saito, J., Kita, A., Higuchi, Y., Nagata, A., (1999). Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MHK1 at 1.6Å resolution and its substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* 274: 30818-30825.
- [27] Struszczyk, M. H., Struszczyk, K. J., (2007). Medical applications of chitin and its derivatives. *Polish Chitin Society, Monograph XII.*
- [28] Harish Prashanth, K. V., Tharanathan, R. N., (2007). Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 117-131.
- [29] Gohel, V., Jiwan, D., Tandel, S., Vyas, P., Chhatpar, H. S., (2005). Management of the chitinous wastes by production of chitosan and its application. *Environ. Degrad. Manag.* 1: 35-42.
- [30] Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., Vad, K., (1993). Plant chitinases. *Plant J.* 3: 31-40.
- [31] Felse, P. A., Panda, T., (1999). Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 141-151.
- [32] Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G. O., (2003). Cell wall associated enzymes in fungi. *Phytochem.* 64: 339-366.
- [33] Young, V. L., Simpson, R. M., Ward, V. K., (2005). Characterization of an exochitinase from *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (family *Baculoviridae*). *J. Gen. Virol.* 86: 3253-3261.

- [34] Boot, R. G., Bussink, A. P., Verhoek, M., De Boer, P. A. J., Moorman, A. F. M., Aerts, J. M. F., (2005). Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J. Histochem. Cytochem.* 53(10): 1283-1292.
- [35] Ruiz Sánchez, A., Cruz Camarillo, R., Salcedo Hernández, R., Barboza Corona, J. E., (2003). Serratia marcescens: de patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *Biotechnol.* 8(2): 31-37.
- [36] Barboza-Corona, J. E., Bautista-Justo, M., Ibarra, J. E., (1998). Actividad quitinolítica de *Bacillus thuringiensis* y su uso potencial en el control biológico de plagas. *Acta Universitaria.* 8(1): 57-65.
- [37] Brurberg, M. B., Eijsink, G. H., Haandrikman, A. J., Venema, G., Nes, I. F., (1995). Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing. *Microbiol.* 141: 123-131.
- [38] Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz Kalman, Z., Koncz, Z., Schell, J., Zilberstein, A., (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3 581-586.
- [39] Reyes Ramirez, A., Ibarra, J. E., (2005). Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3): 1346-1355.
- [40] Barboza-Corona, J. E., Gutierrez-Acosta, O. B., Imperial-Cervantes, M., Bideshi, D. K., de la Fuente-Salcido, N., Bautista-Justo, M., Salcedo-Hernández, R., (2008). Generation of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 105(5): 1511-1520.
- [41] Ortiz Rodríguez, T., De la Fuente Salcido, N. M., Bideshi, D., Salcedo Hernández, R., Barboza Corona, J. E., (2010). Generation of chitin-derived oligosaccharides toxic to pathogenic bacteria using ChiA74, an endochitinase native to *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:184-190.
- [42] Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., Chet, I., (1995). Chitinolytic Enterobacter agglomerans Antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- [43] Barboza-Corona, J. E., Contreras, J. C., Velázquez-Robledo, R., Bautista-Justo, M., Gómez-Ramírez, M., Cruz-Camarillo, R., Ibarra, J. E., (1999). Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 1125-1129.
- [44] Smirnoff, W. A., Valero, J. R., (1977). Determination of the chitinolytic activity of nine subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* (2): 265-266.
- [45] Barboza-Corona, J. E., Nieto-Mazzocco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernández, R., Bautista, M., Jiménez, B., Ibarra, J. E., (2003). Molecular cloning of a chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2): 1023-1029.
- [46] Cruz Camarillo, R. C., Sánchez Pérez, O., Rojas Avelizapa, N. G., Gómez Ramírez, M., Rojas Avelizapa, L. I., (2004). Chitinase activity in *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol.* (Praha). 49: 94-96. (2004)
- [47] Shih Bin, L., Shan He, C., Kou Cheng, P., (2009). Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of  $\beta$ -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. *J. Sci. Food Agric.* 89: 238-244.
- [48] Yang, T. C., Chou, C., Li, C. F., (2003). Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *Int. J. Food Microbiol.* 97(3): 237-45.
- [49] Wang, Y., Zhou, P., Yu, J., Pan, X., Wang, P., Lan, W., Tao, S., (2007). Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by chitosanase from *Pseudomonas CUY8*. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 16: 174-177.
- [50] Hirano, S., Nagao, N., (1989). Effects of chitosan, peptic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* 53: 3065-3066.
- [51] Ji Young, K., Kil Nam, K., Jong Gwan, K., Seong Chul, K., Wook Jae, L., Chang Gu, H., *In Vitro* antimicrobial and antioxidant activities of chitosan oligosaccharides. *J. Appl. Biol. Chem.* 52(2): 84-87. (2009)
- [52] Lee, H. L., An, D. S., Lee, S. C., Park, H. J., Lee, D. S., (2004). A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and a tocopherol. *J. Food Eng.* 62: 323-329.
- [53] Portes, E., Gardrat, C., Castellán, A., Coma, V., (2009). Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties. *Carbohydr. Polym.* 76: 578-584.
- [54] Rao, M. S., Chander, R., Sharma, A., (2008). Synergistic effect of chitoooligosaccharides and lysozyme for meat preservation. *Food Sci. Technol.* 41(10): 1995-2001.
- [55] Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O., Varlamov, V. P., (2004). Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 40 (3): 301-306.
- [56] No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Meyers, S. P., (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 5(74): 65-72.
- [57] Rhoades, J., Roller, S., (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1): 80-86.
- [58] Roller, S., Covill, N., (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 47(12): 67-77.
- [59] Tsai, G. J., Wu, Z. Y., Su, W. H., (2000). Antibacterial activity of a chitoooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J. Food Prot.* 63(6): 747-52.