



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**“Estudio de la actividad de transglicosilación de las quitinasas
producidas por *Lecanicillium lecanii*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

I.B.I. Jesús Rojas Osnaya

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores:

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa,
Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Expresión
Génica

Dra. Zaizy Rocha Pino

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa,
Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 237292).

México D.F. a 27 de Julio de 2015

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Estudio de la actividad de transglicosilación de las quitinasas producidas por *Lecanicillium lecanii*.

Que presentó:

I.B.I. Jesús Rojas Osnaya

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros.

Asesores:

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Expresión Génica

Dra. Zaizy Rocha Pino

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros.

H. Jurado:

Presidente: *[Handwritten signature]*

Secretario: *Hugo Néjere Pérez*

Vocal: *Dra. Zaizy Rocha Pino*

Vocal: *[Handwritten signature]*

[Handwritten signature]

C. NÚÑEZ RÍ

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Agradecimientos

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio, por todo el apoyo incondicional, paciencia, dedicación y conocimientos transmitidos. Por preocuparse por mi tanto dentro como fuera del laboratorio. Muchas gracias por enseñarme a nunca rendirme y no darme por vencido pero sobre todo gracias por todo el cariño y comprensión durante esta etapa profesional.

Al Dr. Humberto González Márquez por todos los valiosos comentarios, por todo el apoyo brindado durante mi trabajo experimental, muchas gracias por todos los consejos personales y laborales.

A la Dra. Zaizy Rocha Pino por toda la paciencia, motivación, consejos, cariño y dedicación a este trabajo. Muchas gracias por siempre ayudarme y por las enseñanzas durante esta etapa de mi vida y por la amistad brindada.

A la Dra. Alma Guadalupe Villa Lerma por todo su apoyo, paciencia, comprensión, motivación, por la dedicación a la revisión de este trabajo, por los conocimientos transmitidos para la realización de este trabajo y por la amistad brindada.

Al Dr. Hugo Najera Peña por todo el apoyo, tiempo y disposición que pacientemente dedico a este trabajo y además por la amistad brindada.

A la M. en B. Angélica Ramos por todo su apoyo, paciencia, por la asesoría en este trabajo, por los consejos laborales y por la amistad brindada.

Al Dr. Miquel Gimeno por permitirme realizar una parte de mi trabajo experimental en su laboratorio.

Al M. en B. Ulises Carrasco por todo el apoyo, consejos y ayuda brindada durante todo el trabajo experimental y por la amistad brindada.

Al M. en B. Juan Carlos Peña Ávila por los consejos, apoyo y amistad brindada y por motivarme a realizar mis estudios de maestría.

A mis compañeros de maestría: Isabel, Adriana, Rosalinda, Fernando y Dario por todo el apoyo, consejos, charlas motivacionales, por estar ahí cuando más los necesite y por ser parte de esta etapa de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio de biopolímeros por la ayuda que me brindaron en su momento cada quien, especialmente a Carmen, Leticia, Ivana y Alex por llenar de risas y alegría el laboratorio, por motivarme y apoyarme en cada momento, pero sobre todo por linda y sincera amistad.

A Mariana Quintana quien es una persona muy importante en mi vida, por todo tu cariño, comprensión, gracias por apoyarme en momentos difíciles, por estar ahí siempre que te necesite, por compartir momentos a tu lado, sin ti nada esto hubiera sido posible.

Dedicatorias

A mis padres María del Carmen y Jesús por todo su amor, cariño y apoyo incondicional durante toda mi vida, por ser un ejemplo de trabajo, superación y motivación, por enseñarme a nunca rendirme y perseguir siempre mis sueños, por apoyarme siempre en mis decisiones, por enseñarme a ser una persona de bien y nobles sentimientos.

A mi hermana Carmina por su cariño, apoyo y por todos los buenos momentos que hemos compartido juntos, por apoyarme siempre que lo necesite, por cuidarme y preocuparte por mí. Gracias por darme la felicidad de ser tío del mejor sobrino “Ralph” que es la alegría de nuestras vidas.

A mi cuñado Ralph Belford por los consejos y apoyo durante toda mi etapa profesional, por ser un ejemplo de trabajo y dedicación, por motivarme a seguir con mis estudios y por cuidar y hacer feliz a mi hermana.

A mis abuelos Delia y Juan y mi tío Juan Manuel que son mis ángeles que me cuidan desde el cielo, por cuidarme, apoyarme y enseñarme a siempre superarme.

A mis tías Angélica, Mónica y Beatriz por cuidarme, apoyarme y motivarme a seguir con mis estudios.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
3. Justificación.....	7
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivos.....	8
5.1 Objetivo General.....	8
5.2 Objetivos Particulares.....	8
6. Metodología.....	9
6.1. Preparación de quitina coloidal.....	9
6.2. Microorganismo.....	9
6.3. Medio de cultivo.....	9
6.4. Determinación de la actividad Nhasa.....	10
6.5. Determinación de actividad endoquitinasa.....	10
6.6. Determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson.....	11
6.7. Determinación de proteína por el método de Bradford.....	11
6.8. Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.....	11
6.9. Zimograma de actividad Nhasa y Endoquitinasa.....	12
7. Purificación.....	12
7.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	12

7.2. Cromatografía de intercambio aniónico.	13
8. Determinación de la actividad de transglicosilación	13
8.1. Cromatografía en capa fina.....	14
8.2. Análisis de los productos obtenidos por actividad de transglicosilación por MALDI-TOF.....	14
9. Resultados y Discusión	15
9.1. Producción de enzimas quitinolíticas	15
9.1.1 Actividades Nhasa y Endo en los cultivos sumergidos de <i>L. lecanii</i> empleando quitina coloidal con 6% de proteína.....	15
9.1.2. Actividad Nhasa en los cultivos sumergidos de <i>L. lecanii</i> empleando quitina coloidal con 10% de proteína.	16
9.1.3. Actividades Nhasa y Endo en los cultivos sumergidos de <i>L. lecanii</i> empleando quitina coloidal con 14% de proteína.....	17
10. Purificación de Nhasas	19
10.1 Purificación de enzimas quitinolíticas utilizando extractos enzimáticos de <i>L. lecanii</i> empleando como sustrato quitina coloidal con 10% de proteína ...	20
10.1.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	20
10.1.2. Cromatografía de intercambio aniónico.	22
10.1.3 Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.	23
10.1.4. Zimogramas de actividad Nhasa.....	24
10.1.5. Purificación de la Nhasa producida en el cultivo de <i>L. lecanii</i> utilizando quitina con 10% de proteína residual.....	26

10.2. Purificación de enzimas quitinolíticas empleando como sustrato quitina coloidal con 14% de proteína.....	27
10.2.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	27
10.2.2 Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.	29
10.2.3 Zimogramas de actividad Nhasa y Endo	30
10.2.3. Tabla de purificación de la Nhasa y Endo producidas en el cultivo de <i>L. lecanii</i> utilizando quitina con 14% de proteína residual.....	32
11. Actividad de transglicosilación	33
11.1 Efecto de la concentración de sustrato donador sobre la actividad de transglicosilación.....	34
11.2 Efecto de la concentración de enzima y el pH sobre la actividad de transglicosilación.....	37
11.3 Determinación de los productos de transglicosilación.....	41
11.4 Determinación del grado de polimerización de los oligómeros obtenidos por TGA por MALDI-TOF	43
12. Conclusiones.....	48
13. Perspectivas.....	49
14. Bibliografía	50
15. Anexos	56
15.1 Curva de <i>p</i> -nitrofenol para determinación de actividad Nhasa.....	56
15.2 Metodología para determinación de proteína por Lowry -Peterson y curva patrón de seroalbumina.....	57

15.3	Curva patrón para determinación de proteína por Bradford.....	58
15.4	Base de datos para identificación por MALDI-TOF de oligómeros obtenidos enzimáticamente.	59

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo propuesto para determinar la actividad de transglicosilación en Nhasas.	6
Figura 2. Actividad Nhasa volumétrica y específica de <i>Lecanicillium lecanii</i> , empleando quitina coloidal con 10% de proteína. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.	16
Figura 3. Actividad Nhasa volumétrica y específica de <i>Lecanicillium lecanii</i> , empleando quitina coloidal con 14% de proteína. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.	18
Figura 4. Actividad Endoquitinasa volumétrica y específica de <i>Lecanicillium lecanii</i> empleando quitina coloidal con 14% de proteína. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.	19
Figura 5. Cromatograma obtenido de la separación por exclusión molecular y actividad Nhasa específica de las fracciones.	21
Figura 6. Electroforesis con tinción de plata de las fracciones que presentaron proteína en la cromatografía de exclusión molecular (EM). Fracciones: 9, 10 y 11, M: marcador, EC: Extracto crudo.	22
Figura 7. Actividades Nhasa volumétrica y específica de las fracciones.	23
Figura 8. Electroforesis con tinción de plata de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico (IA). Fracciones 50-56, M: marcador. .	24
Figura 9. Zimograma de actividad Nhasa de las fracciones obtenidas por exclusión molecular, EC: Extracto crudo, F: Fracciones (9, 10 y 11).	25
Figura 10. Zimograma de actividad Nhasa de las fracciones obtenidas por intercambio aniónico, F: Fracciones (50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56).	25

Figura 11. Cromatograma obtenido de la separación por exclusión molecular y actividad Nhasa específica de las fracciones.	28
Figura 12. Cromatograma obtenido de exclusión molecular y actividad Endo en U/ mg de proteína de las fracciones 8, 9, 10 y 11.	29
Figura 13. Electroforesis con tinción de plata de las fracciones que presentaron proteína en la cromatografía de exclusión molecular (EM). Fracciones: 8, 9, 10, 11, PSA: fracción obtenida después de precipitación con sulfato de amonio. M: marcador.	30
Figura 14. Zimograma de actividad Nhasa de las fracciones obtenidas por exclusión molecular, EM: Fracciones (8, 9, 10 y 11).	31
Figura 15. Zimograma de actividad Endo de las fracciones obtenidas por exclusión molecular, EM: Fracciones (8, 9,10 y 11).	32
Figura 16. Efecto de la concentración de sustrato donador en la TGA empleando una concentración de 0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de enzima proveniente del precipitado con sulfato de amonio. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.	35
Figura 17. Efecto de la concentración de sustrato donador en la TGA empleando una concentración de 0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la Nhasa parcialmente purificada. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey.	36
Figura 18. Actividad de transglicosilación a pH 7 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	38
Figura 19. Actividad de transglicosilación a pH 8.5 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	38

Figura 20. Actividad de transglicosilación a pH 7 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la Nhasa parcialmente purificada.	39
Figura 21. Actividad de transglicosilación a pH 8.5 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la Nhasa parcialmente purificada.	40
Figura 22. Cromatograma de los productos obtenidos TGA. [1-3] GlcNAc-MU, LacNac y GlcNAc [4-6]: TGA a pH 7, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EPP, [8-10]: TGA pH 7, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EPP, [12-14]: TGA pH 8.5,.....	42
Figura 23. Cromatograma de los productos obtenidos TGA. [1-3] GlcNAc-MU, GlcNAc y LacNac [4-5]: TGA a pH 7, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NPP, [6-8]: TGA pH 7, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NPP, [10]: TGA pH 8.5, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NPP, [11]: TGA pH 8.5, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.	42
Figura 24. Espectro de MALDI-TOF de TGA con Nhasa parcialmente purificada, pH 7.	44
Figura 25. Espectro de MALDI-TOF de TGA con enzima del precipitado con sulfato de amonio pH 7.	45
Figura 26. Espectro de MALDI-TOF de TGA con Nhasa parcialmente purificada, pH 8.5.	46
Figura 27. Espectro de MALDI-TOF de TGA con enzima del precipitado con sulfato de amonio pH 8.5.	47
Figura 28. Curva patrón de p-nitrofenol para la determinación de Nhasas (Tronsmo y Harman, 1993).	56
Figura 29. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry-Peterson (Peterson, 1977).....	57
Figura 30. Curva patrón para la determinación de proteína por microensayo (Bradford, 1976).	58

Índice de tablas

Tabla 1. Purificación de la Nhasa de <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido.....	27
Tabla 2. Purificación parcial de la Nhasa y Endoquitinasa de <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido, empleando quitina coloidal la cual contiene 14% de proteína.	33

Abreviaturas

Endo	Endoquitinasa
EPP	Enzima del precipitado con sulfato de amonio
GlcNAc	<i>N</i> -Acetilglucosamina
GlcNAc-Mu	4-metil- <i>N</i> -acetil-Dglucosamina
Gp	Grado de polimerización
Nhasa	N-acetilhexosaminidasa
NPP	Nhasa parcialmente purificada
LacNac	N-acetil Lactosamina
TGA	Actividad de transglicosilación

Resumen

Las quitinasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces β 1-4 de la cadena de quitina, dependiendo de su secuencia, estructura y mecanismo de acción, éstas pueden pertenecer a una de las dos familias principales de las carbohidrato hidrolasas, a la familia 18 o 19. La familia 18 de las quitinasas son conocidas por catalizar no sólo la hidrólisis sino también una reacción de transglicosilación que resulta en quitin oligosacáridos con una longitud de cadena más larga que la del sustrato inicial. Estos derivados de la quitina son productos de alto valor agregado.

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue producir y purificar quitinasas de *Lecanicillium lecanii* y probar su actividad de transglicosilación. Se obtuvieron en cultivo sumergido, evaluando su producción utilizando como sustrato quitina coloidal con tres porcentajes de proteína diferentes. Los extractos enzimáticos se purificaron mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular, seguido de cromatografía de intercambio aniónico. La reacción de transglicosilación se evaluó a dos pH y a dos concentraciones de enzima, tanto del precipitado con sulfato de amonio como de las enzimas purificadas. Se emplearon quitinas con grado de pureza diferente basada en su contenido de proteína residual, 6, 10 y 14%, las cuales fueron empleadas como sustrato en un biorreactor para producir las enzimas quitinolíticas. Cuando se utilizó quitina coloidal con 14% de proteína se obtuvieron actividades de 0.027 y 22.79 U/mg de proteína para *N*-acetilhexosaminidasa (Nhasa) y Endoquitinasa (Endo) respectivamente. La producción mayor de Nhasa se obtuvo al utilizar quitina coloidal con 10% de proteína residual obteniendo 0.115 U/mg de proteína, mientras que para la quitina coloidal con 6% de proteína no se detectó actividad quitinolítica.

La presencia de actividad Nhasa se corroboró en las etapas de purificación mediante zimogramas. Una vez parcialmente purificada la Nhasa se obtuvieron 22 U/ mg de proteína, estas se sometieron a electroforesis mostrando dos bandas a 50 y 67 kDa. Además esta Nhasa logró llevar a cabo la reacción de transglicosilación utilizando 4-metil-*N*-acetil-D-glucosamina y 4-metil-*N*-acetil-D-glucosamina formando oligómeros con grado de polimerización de 4 con diferentes grados de acetilación.

Abstract

Chitinases are enzymes capable of hydrolyzing the β 1-4 bond of the chitin chain, these belong to two main families of carbohydrate hydrolases, 18 and 19, and this classification depends on sequence, structure and mechanism of action. Some chitinases of family 18, in addition to their hydrolytic activity possess transglycosylation activity, resulting in products derived from chitin (chitin oligosaccharides) which present a high added value with a chain length longer than the initial substrate.

The aim of this work was to produce and purify chitinases from *Lecanicillium lecanii* and investigate if the enzymes were capable to transglycosylate. Chitinases were obtained in submerged culture using colloidal chitin as sole carbon source. The chitin employed presented three different percentages of residual protein, 6, 10, 14%. Crude enzyme was purified by precipitation with ammonium sulphate, size exclusion chromatography followed by anionic exchange chromatography. The transglycosylation reaction was evaluated with both salting out and purified enzyme at two pH and two concentrations of the enzyme.

Enzymes produced with colloidal chitin with at 14% of protein presenting activities of 0.027 and 22.79 U/mg of N-acetylhexosaminidase (Nhasa) and Endochitinase (Endo), respectively. The highest production of Nhasa was obtained when colloidal chitin with 10% of protein was used, specifically 0.115 U/mg. Whereas, submerged culture with colloidal chitin with 6% of protein did not present chitinolytic activity. The presence of chitinolytic activity was determined for each step of purification by zymograms. Purified Nhasa displayed an activity of 3.085 U/mg, electrophoretic profile evidenced a protein band of 50 kDa. Tetramers were obtained as products of the transglycosylation reaction with different degree of acetylation

1. Introducción

Los hongos filamentosos son microorganismos muy estudiados. Se caracterizan por tener estructuras filamentosas ramificadas o hifas que tienen diámetros típicos de 2-18 μm , con o sin paredes transversales o septos. Dentro de los hongos filamentosos se encuentran especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Lecanicillium*, *Rhizopus* y *Mucor* (Faramarzi y col., 2013). Su uso como agentes de control biológico son alternativas muy atractivas a los productos químicos convencionales utilizados en el manejo de plagas y enfermedades de las plantas. El control biológico o biocontrol se define como el uso de organismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos. Dentro de los organismos utilizados como agentes de control biológico se encuentran virus, bacterias, hongos, nematodos y protozoarios (Cederkvist y col., 2008). Los hongos entomopatógenos que parasitan insectos son armas para el control biológico ya que desempeñan un papel importante en el manejo integrado de plagas. Hasta la fecha, varias cepas de hongos entomopatógenos como *Lecanicillium* (nombre anterior, *Verticillium*), *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* y *Nomuraea rileyi* se han utilizado para controlar diversas plagas de insectos (Vu y col., 2007).

Lecanicillium lecanii es un hongo con capacidad de infectar insectos como la mosquita blanca, pulgones y cochinillas, por lo que ha sido utilizado comercialmente como una alternativa de biocontrol en agricultura y horticultura. *Lecanicillium spp.* generalmente sigue la vía típica de la patogénesis de hongos entomopatógenos: adherencia de los conidios a la cutícula del huésped, producción de enzimas quitinolíticas, la germinación de los conidios, la penetración de la cutícula, producción de blastosporas dentro de la hemocel, ramificación de los micelios y la invasión de los tejidos que causan la muerte del huésped y finalmente, la producción de conidios en la superficie del cadáver (Goettel y col., 2008).

Las enzimas quitinolíticas (quitinasas) son producidas por muchos organismos, incluyendo bacterias, hongos, insectos, plantas y animales para diferentes propósitos, tales como la nutrición, la morfogénesis y la defensa contra patógenos que contienen quitina (Andrangi y col., 2010). Debido a su amplia presencia y a sus diversas funciones biológicas para las enzimas quitinolíticas se han encontrado varias aplicaciones. Por ejemplo, pueden ser utilizados en la producción de protoplastos de hongos, la estimación de la biomasa fúngica, el desarrollo de los andamios de cultivo de células 3D, biocontrol de hongos patógenos de plantas e insectos , y la producción de quitin oligosacáridos, glucosamina (Zakariassen y col., 2010).

Las quitinasas son las enzimas responsables de la degradación de la quitina, hidrolizan los enlaces β 1-4 del polímero de quitina. Basado en su modo de acción, se clasifican en dos categorías: quitinasas (EC 3.2.1.14), que escinden la cadena de quitina en sitios internos de una manera aleatoria; y β -*N*-acetilhexosaminidasas (EC 3.2.1.52), que catalizan la eliminación sucesiva de residuos de *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc) desde el extremo no reductor de la cadena. Las quitinasas pertenecen a las familias 18, 19, 23, y 48 de las glicosil hidrolasas (GH), las β -*N*-acetilhexosaminidasas también se incluyen en las familias GH3, GH18, GH20 y GH84 (Seidl., 2008).

Las quitinasas han sido clasificadas hasta ahora en dos diferentes familias por sus secuencias, familias 18 y 19, basados en la similitud de la secuencia de aminoácidos, estructura, mecanismo de acción y los dominios catalíticos (Henrissat y Davies., 1995). Las quitinasas de la familia 18, que incluyen la mayoría de las quitinasas de bacterias y hongos, catalizan la hidrólisis de la quitina y sustratos relacionados, a través de sustrato asistido, mecanismo que implica la formación de un ión oxazolinio intermediario. Las quitinasas se clasifican en Endoquitinasas (EC 3.2.1.14), Exoquitinasas (EC 3.2.1.14), y β -*N*-acetilhexosaminidasas (Nhasas) (EC 3.2.1.52), las endoquitinasas hidrolizan en la parte interna de la cadena de quitina produciendo oligómeros de *N*-acetil glucosamina de masa molecular baja, como quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa; este último, es el producto mayoritario (Matsumoto y col., 2004). La familia 18 contiene quitinasas de las bacterias, hongos, los virus y

animales, y algunas quitinasas de plantas (clases III y V), la familia 19 contiene quitinasas de las plantas clases I, II y IV recientemente identificadas de *Streptomyces griseus*. Las quitinasas de las dos familias no comparten similitud en la secuencias de aminoácidos y tienen las estructuras tridimensionales completamente diferentes; se piensa por consiguiente que tienen orígenes evolutivos diferentes (Patil y col., 2000).

Estudios realizados por Purushotham y col., (2012) mostraron que una quitinasa aislada a partir de una cepa de *Bacillus sp.* degradó más eficientemente la forma β de la quitina que la α , tal vez porque la hidrólisis se dificulta al estar empacadas fuertemente en cadenas antiparalelas de quitina α . Esto puede explicar también porque la mayoría de los organismos poseen la forma α en lugar de la β en sus exoesqueletos y sus paredes celulares. Otras quitinasas contienen dominios y/o secuencias repetidas de función desconocida. La familia 18 de las glicosil hidrolasas, junto con algunas quitinasas de las plantas; son consideradas retentivas, por su parte la familia 19 es de estereoquímica indeterminada y con pocos miembros hasta la fecha; contiene enzimas con actividades quitinasa e hidrolasa.

Una actividad alta, así como la buena estabilidad de las enzimas son los factores más importantes a considerar para la utilización de las quitinasas, de ahí la necesidad de estudiar los posibles productores y a los inductores de bajo costo.

Además de su actividad hidrolítica, en algunas quitinasas se ha encontrado actividad de transglicosilación (TGA); es decir, la capacidad de transferir el resto de oligosacárido a un aceptor adecuado para formar un nuevo enlace glicosídico (Wang y col., 2012). La actividad de transglicosilación enzimática ha sido una metodología utilizada en alimentos y medicinas para la síntesis de oligosacáridos, polisacáridos o derivados de sacáridos, debido a que puede dotar a los aceptores una mayor hidrofobicidad o un sabor diferente de manera segura (Lu y col., 2014).

Aunque el uso de glicosidasas para sintetizar carbohidratos complejos tiene ventajas sobre el uso de glicosiltransferasas, como son: i) las glicosidasas son intrínsecamente menos específicas en la elección de sustrato que las glicosil transferasas, ii) actualmente está disponible una selección más amplia de

glicosidasas, iii) el costo de los sustratos es bajo en comparación con los de glicosiltransferasas. Sus limitaciones también se han señalado ya que su rendimiento es normalmente bajo debido a la hidrólisis de los productos de glicosilación causada por las mismas glicosidasas (Michinari y col., 2007).

Desde un punto de vista práctico, el uso de glicosidasas es especialmente atractivo para la síntesis de oligosacáridos, debido a que son generalmente más disponibles y menos costosas que glicosiltransferasas, y no requieren donantes de nucleótidos de azúcar caros.

2. Antecedentes

La glicosilación enzimática se ha convertido en un método efectivo para la síntesis de polisacáridos y conjugados glicosilados. Se ha demostrado que algunas glucosidasas pueden utilizar donadores glicosilados activados como sustratos para la reacción de transglicosilación y polimerización bajo condiciones controladas (Michinari y col., 2007). La reacción de transglicosilación se puede emplear para la producción de oligosacáridos de quitina útiles con propiedades antitumorales, efectos antioxidantes y la capacidad para activar los sistemas de defensa en las plantas (Wang y col., 2012). Las glucosidasas pueden sintetizar algunos compuestos químicos, tales como oligosacáridos, glicoconjugados y alquil-glucósidos, basado en su actividad de transglicosilación. La gentiobiosa es un oligosacárido funcional que al ser utilizado como aditivo puede promover la proliferación de bacterias beneficiosas en el intestino humano (Guo y col., 2015). Es muy importante para la industria el desarrollo de un método de bajo costo que implica condiciones de reacción suaves y procedimientos sencillos de aislamiento para producir gentiobiosa mediante transglicosilación enzimática (He y col., 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que la familia 18 de las quitinasas y 56 de las hialuronidasas son capaces de polimerizar disacáridos sintéticos para formar quitina artificial, ácido hialurónico y polisacáridos relacionados. Endo β -*N*-acetilglucosaminidasas son una clase de la familia 85 glicosil hidrolasas que liberan *N*-glicanos de *N*-glicoproteínas al hidrolizar el enlace glucósido β -1,4 de la *N,N*-diacetilquitobiosa (Ochiai y col., 2009).

La familia 18 de las quitinasas son conocidas por catalizar no sólo la hidrólisis sino también una reacción de transglicosilación, que resulta en productos con una longitud de cadena más larga que la del sustrato inicial (Taira y col., 2010).

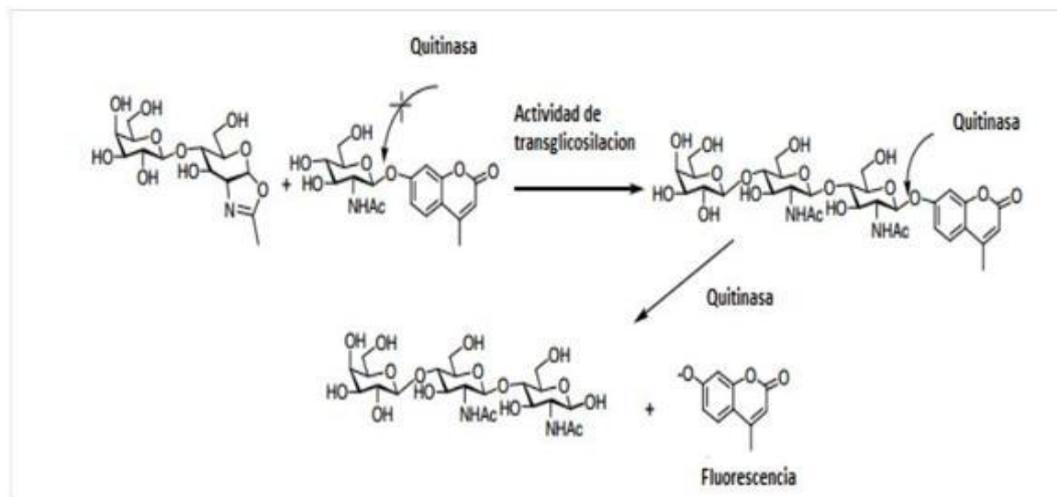


Figura 1. Mecanismo propuesto para determinar la actividad de transglucosilación en Nhasas.

Estas síntesis enzimáticas tienen ventajas notables, en comparación con los enfoques químicos convencionales, en términos de su alta selectividad, la falta de reacciones secundarias indeseables, la operación bajo condiciones suaves y la amabilidad ambiental (Michinari y col., 2007).

La actividad de transglucosilación de algunas quitinasas obtenidas de *Coccidioides immitis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio harveyi* y de *Bacillus circulans* presentan un gran potencial para la síntesis de oligosacáridos y polisacáridos de origen quitina (Wang y col., 2012). La importancia de la producción y detección de estos compuestos deriva en sus posibles aplicaciones, por su actividad antioxidante, antimicrobiana y antitumoral. Oligosacáridos como *N*-acetilquitohexaosa y *N*-acetilquitoheptaosa presentan actividad antitumoral ya que favorecen la desaparición de metástasis en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Yoon., 2015). Katta y col., (2013) inhiben el crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. utilizando oligosacáridos de quitina de bajo peso molecular.

Umamoto y col., (2013) reportan el incremento de la actividad de transglucosilación mutando un residuo triptófano ubicado en sub sitio-3 (Trp167) de la quitinasa de *Serratia marcescens* (AIMSCH). En otro estudio Kadowaki y col., (1997) lograron sintetizar el 6-benziloxihexil- β -*N*-acetilglucosamina utilizando la reacción de transglucosilación de una Nhasa de *Penicillium oxalicum*, molécula de interés comercial ya que sirve como vehículo para medicamentos poco solubles.

3. Justificación

Las quitinasas son las enzimas responsables de la degradación de la quitina, estas son producidas por plantas, animales y algunos microorganismos: bacterias, hongos y virus. Además de su actividad hidrolítica, en algunas quitinasas se ha encontrado actividad de transglicosilación siendo las de bacterias las más reportadas, tales como *Serratia proteamaculans*, *Arabidopsis thaliana*, *Bacillus circulans* y *Bacillus sp.* Los hongos también han sido estudiado en la producción de quitinasas siendo los géneros más explotados: *Trichoderma*, *Penicillium* y *Lecanicillium*. Sin embargo, hay pocos reportes sobre la actividad de transglicosilación.

Lecanicillium lecanii es uno de los hongos poco estudiados reportándose solo el estudio en cuanto a sus condiciones de producción y propiedades catalíticas, sin existir reportes de la actividad de transglicosilación. El poseer dicha actividad implica un gran potencial para la síntesis de oligosacáridos y biopolímeros de interés comercial. La importancia de la producción de estos compuestos deriva en sus posibles aplicaciones, por su actividad antioxidante, antimicrobiana y antitumoral.

Industrialmente los oligosacáridos son obtenidos mediante métodos químicos teniendo como desventaja el uso de agentes tóxicos que dañan el medio ambiente, por lo que se propone un método enzimático como lo es la actividad de transglicosilación para obtener oligosacáridos con mayor biocompatibilidad.

4. Hipótesis

Al menos una de las quitinasas producidas por *Lecanicillium lecanii* tendrán actividad de transglicosilación.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Purificar y determinar la actividad de transglicosilación de las quitinasas producidas por *Lecanicillium lecanii*

5.2 Objetivos Particulares

- Producir las quitinasas de *Lecanicillium lecanii* en cultivo sumergido
- Purificar las quitinasas de *Lecanicillium lecanii*
- Determinar la actividad de transglicosilación de las quitinasas producidas por *Lecanicillium lecanii*.

6. Metodología

6.1. Preparación de quitina coloidal.

La quitina se disolvió en HCl concentrado (37%), a 0 °C con agitación continua, dentro de una campana de extracción, hasta obtener una consistencia de jarabe, posteriormente se mezcló con agua helada (4 °C) para precipitar la quitina, a continuación se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos (Beckman J2–MI, rotor JA–14). La pasta obtenida se neutralizó mediante lavados con agua destilada y NaOH 0.1 M alternados con centrifugación después de cada lavado.

6.2. Microorganismo.

Lecanicillium lecanii ATCC 26854 se propagó en agar papa dextrosa (PDA) a 4°C. La preparación del inóculo se realizó a partir de la agitación mecánica de los cultivos esporulados en PDA (5 días) con una solución de Tween 80 (0.01% p/v) con una concentración final de 1×10^7 esporas/mL (ecuación 1).

$$N = nFD \quad (1)$$

Donde N es el número de esporas/mL de suspensión inicial, n es el promedio del número de esporas contadas en la cámara, F representa factor de la cámara empleada (25×10^4) y D es la dilución empleada para el conteo.

6.3. Medio de cultivo.

Se utilizó la suspensión de esporas que sirvió como inóculo (10^8 esporas/mL) en un biorreactor de 3 L (Applikon BV, Holanda) a 102 rpm, 1 vvm, 25 °C durante 144 h, usando medio de Czapeck con la siguiente composición en g/L: NaNO₃ (3.73), Na₂HPO₄ (3.0), MgSO₄ (0.5), FeSO₄ (0.096), KCl (0.5) suplementado con 10 g /L de quitina coloidal con 6, 10 y 14 % (p/p) de contenido de proteína, el biorreactor se mantuvo a pH 6 durante toda la cinética. Se tomaron muestras de 50 mL cada

24 h, se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se utilizaron para los ensayos enzimáticos y determinación de proteína.

6.4. Determinación de la actividad Nhasa.

Las determinaciones de actividad quitinolítica, Nhasa, se llevaron a cabo utilizando *p*-nitrofenil- β -*N*-acetilglucosamina como sustrato. 200 μ L de extracto enzimático crudo se adicionaron a 200 μ L de amortiguador de citrato/fosfato 0.2 M pH 5.6 y se agregaron 200 μ L de *p*-nitrofenil- β -*N*-acetilglucosamina (1mg/mL). Se incubó a 37 °C por una hora con agitación a 180 rpm. Al término de la incubación se adicionó 1 mL de NaOH 0.02M y se midió la absorbencia a 400 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, EUA).

La concentración de *p*-nitrofenol se determinó utilizando una curva patrón (Anexo 1), una vez obtenido el valor de la muestra, esta se expresó como μ mol/mL y posteriormente se utilizó la definición: “Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto” (Tronsmo y Harman, 1996).

6.5. Determinación de actividad endoquitinasa.

La actividad endoquitinasa se determinó empleando como sustrato 0.5 mL de una suspensión de quitina coloidal al 1%(p/v) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.7 (Tronsmo y Harman 1996). Las muestras y testigos se adicionaron con proporciones iguales de sustrato, la mezcla fue incubada a 30°C por 24 horas bajo agitación a 180 rpm. Al finalizar la reacción, las muestras se llevaron a un volumen de 5 mL agregando agua destilada y agitando vigorosamente, para leer su absorbencia a una longitud de onda de 510 nm. La actividad se calculó como el porcentaje de la reducción en la turbidez relativa a una suspensión similar que contiene agua en lugar del extracto enzimático. “Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina en un 5%” (Tronsmo y col., 1996).

6.6. Determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson.

Para la cinética del cultivo sumergido, la determinación de proteína se realizó por el método de Lowry modificado por Peterson (1977), empleando seroalbúmina bovina como proteína estándar (Anexo 2). El método consistió en la adición de 1mL de reactivo de Lowry A a un 1mL de muestra previamente centrifugada (8,000 rpm por 5 minutos), se mezclaron y se incubaron por 10 min a 25°C, posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo B (Fenol- Folin Ciocalteu en proporción 1:1 con agua desionizada), se agitó e incubó por 30 min a 25°C se determinó la absorbencia a 750 nm.

6.7. Determinación de proteína por el método de Bradford.

La determinación de proteína durante la purificación de la Nhasa y Endoquitinasa se realizó de acuerdo con la metodología descrita (Bio-Rad, Protein Assay, bulletin 9004), el cual se basa en el trabajo reportado por Bradford, (1976), empleando el microensayo, para lo cual 160 µL de muestra se mezclaron con 40 µL del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, número de catálogo 500-0006), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbencia a 595nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante una curva patrón utilizando seroalbúmina bovina como estándar (Anexo 3).

6.8. Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Se realizaron geles unidimensionales bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli, (1970), el gel de concentración fue al 5% y el de separación al 12%, con condiciones eléctricas de voltaje constante de 150 V, la muestra se reveló mediante tinción con azul de Coomasie (Bio-Rad, número de catálogo 161-0786) o con tinción de plata (Bio-Rad, número de catálogo 161-0449EDU), se emplearon marcadores de masa molecular de rango amplio (Bio-Rad, Precision Plus Protein standards, número de catalogo 161-0363).

6.9. Zimograma de actividad Nhasa y Endoquitinasa

La actividad Nhasa y Endo del extracto crudo enzimático y de las fracciones de purificación se detectaron mediante geles de poliacrilamida usando un sustrato, que por acción enzimática liberó el compuesto fluorescente (4-metilumbeliferil), el sustrato fue 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina (GLcNAc-MU) para Nhasa y 4-metilumbeliferil β -*D*-*N,N',N''*-triacetil quitotriosa para la actividad Endo (Sigma-Aldrich, número de catálogo M2133). Para determinar actividad Nhasa y Endo, a los geles de separación de acrilamida (12%, según el procedimiento descrito por Laemmli, 1970), se les adicionó 0.01% p/v de uno de los dos sustratos. La presencia de actividad enzimática se visualizó bajo iluminación ultravioleta (Bio-Rad, UV Transilluminator 2000, EUA, a 302 nm) (Rocha-Pino, 2011).

7. Purificación

Las proteínas presentes en el extracto crudo enzimático se precipitaron con la adición de sulfato de amonio, adicionó lo suficiente de la sal para llevar el extracto al 60% de saturación, se dejó toda la noche equilibrándose a 4 °C, posteriormente el extracto se centrifugó a 18566 x *g* durante 45 min (Beckman J2-MI, rotor JA-14), la fracción precipitada fue solubilizada en amortiguador 0.05M Tris-HCl, 0.15 M NaCl pH 7.8.

7.1. Cromatografía de exclusión molecular.

La fracción precipitada con sulfato de amonio se inyectó en una columna Hi-load 16/600 Superdex 200 PG (GE Healthcare, EUA), la elución se llevó a cabo aplicando un flujo isocrático de solución amortiguadora de 0.05M Tris-HCl- 0.15 M NaCl pH 7.8, a un flujo de 1.3 mL/min.

7.2. Cromatografía de intercambio aniónico.

Las fracciones con mayor actividad se filtraron en unidades de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 10 kDa, en este paso de ultrafiltración se cambió el amortiguador a Tris-HCl 30 mM pH 7.8, las fracciones se inyectaron (5mL) en una columna de intercambio aniónico DEAE Sepharose (Bio-Rad, EUA).

8. Determinación de la actividad de transglicosilación

A las enzimas presentes en la precipitación con sulfato de amonio y las parcialmente purificadas después de una cromatografía de intercambio aniónico se les determinó la actividad de transglicosilación usando como sustrato fluorogénico el 4-metillumbeliferil-*N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc-MU). La liberación del 4-metillumbeliferil dio la información de que fue transferido el oligómero al ion oxazolinio, mediante la aparición de fluorescencia (Li y col., 2008).

La reacción de transglicosilación (TGA) se realizó de la siguiente forma: se emplearon dos concentraciones de enzima (0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) tanto de la precipitación con sulfato de amonio así como de las purificadas. Se incubaron con *N*-acetil-*D*-Lactosamina (LacNAc) a diferentes concentraciones (0.2, 0.4 y 0.6 mM) y (GlcNAc-MU) (1 mM) en un amortiguador de fosfatos (50 μl , 20 mM, pH 7,0 y 8.5). Después se tomaron alícuotas de 5 μl en tiempos definidos (20, 40, 60 y 80 min) posteriormente se le adicionó 200 μl de amortiguador de glicina (150 mM, pH 10,5) para terminar la reacción. Para determinar la fluorescencia se usó un lector de placas de fluorescencia a una onda de excitación de 355 nm y 460 nm para emisión (Tecan M1000 PRO) (Li y col., 2008).

8.1. Cromatografía en capa fina.

Los productos de la reacción de transglicosilación se observaron mediante una cromatografía de capa fina, se utilizó una placa de gel de sílice (Merck HX745188) y una fase móvil metanol-agua (7:5). El revelado de las manchas se llevó a cabo mediante la aplicación de una solución de nitrato de plata (3 g) y acetona (500 mL), posteriormente se secó la placa a temperatura ambiente y para la visualización se adicionó una solución etanólica de hidróxido de sodio 0.5 N (50 mL de hidróxido de sodio 10 N en 450 mL de alcohol etílico) (Gal, 1967).

8.2. Análisis de los productos obtenidos por actividad de transglicosilación por MALDI-TOF.

Se tomaron 5 μ L del producto obtenido de la reacción de transglicosilación, estos se mezclaron en metanol/agua 1:1, posteriormente se tomaron 0.5 μ L de esta solución y se combinaron con 2 μ L de matriz (25 g/L de ácido sinapínico en acetonitrilo, conteniendo 0.1% v/v de ácido trifluoroacético). Los espectros se obtuvieron usando un equipo MALDI-TOF/TOF 4800 Plus Analyzer, los resultados se analizaron de acuerdo a lo reportado por Villa y col., (2013).

9. Resultados y Discusión

9.1. Producción de enzimas quitinolíticas

Con el fin de observar si la cantidad de proteína que estaba presente en la quitina coloidal afectaba la producción de enzimas quitinolíticas, se decidió probar tres quitinas que diferían en su contenido de proteína residual. Algunos autores han reportado que factores influyen en la producción de enzimas quitinolíticas. St. Leger y col., (1998) reportaron que la expresión de las quitinasas están directamente ligadas con factores ambientales como el pH. Rocha-Pino y col., (2011) produjeron quitinasas en cultivo sólido y sumergido; encontrando que, el tipo de sistema, influyó en la producción de enzimas quitinolíticas, lo cual puede ser atribuido a las diferencias de difusión de oxígeno y transferencia de masa. Sin embargo, no hay información que indique la influencia de la concentración de proteína residual en la quitina sobre la producción de enzimas quitinolíticas en cultivo sumergido, por lo cual se decidió probar esta variable.

9.1.1 Actividades Nhasa y Endo en los cultivos sumergidos de *L. lecanii* empleando quitina coloidal con 6% de proteína.

Inicialmente se llevó a cabo la producción de enzimas Nhasa y Endo de *L. lecanii* en cultivo sumergido para la cual se empleó quitina que contenía un 6% de proteína como sustrato. En esta cinética no hubo presencia de actividad Nhasa ni Endo durante las 144 h que se mantuvo el biorreactor. Matsumoto y col., (2004) reportan que, al utilizar una fuente de carbono compleja, aumenta la producción de las enzimas quitinolíticas, sin embargo en el presente trabajo se observó que, además de la fuente de carbono, el contenido de proteína es esencial para la expresión de estas enzimas ya que aunque se empleó el mismo sustrato, estos sólo diferían en la cantidad de proteína inicial.

9.1.2. Actividad Nhasa en los cultivos sumergidos de *L. lecanii* empleando quitina coloidal con 10% de proteína.

Se realizó un segundo cultivo de producción enzimática utilizando quitina coloidal que contenía 10% de proteína residual. Los resultados de producción enzimática de Nhasa obtenidos durante 144 h de cultivo mostraron, un máximo de actividad volumétrica de 20 ± 1.23 U/L y para actividad específica de 0.11 ± 0.140 U/mg de proteína (Figura 2). Carrasco-Navarro y col., (2011) reporta actividades de Nhasa de 0.25 U/mg de proteína, esto es casi el doble de la actividad a lo encontrado en el presente trabajo, lo cual se puede atribuir a que el autor inmoviliza el microorganismo utilizando como soporte espuma de poliuretano, lo cual favorece a la producción de las enzimas.

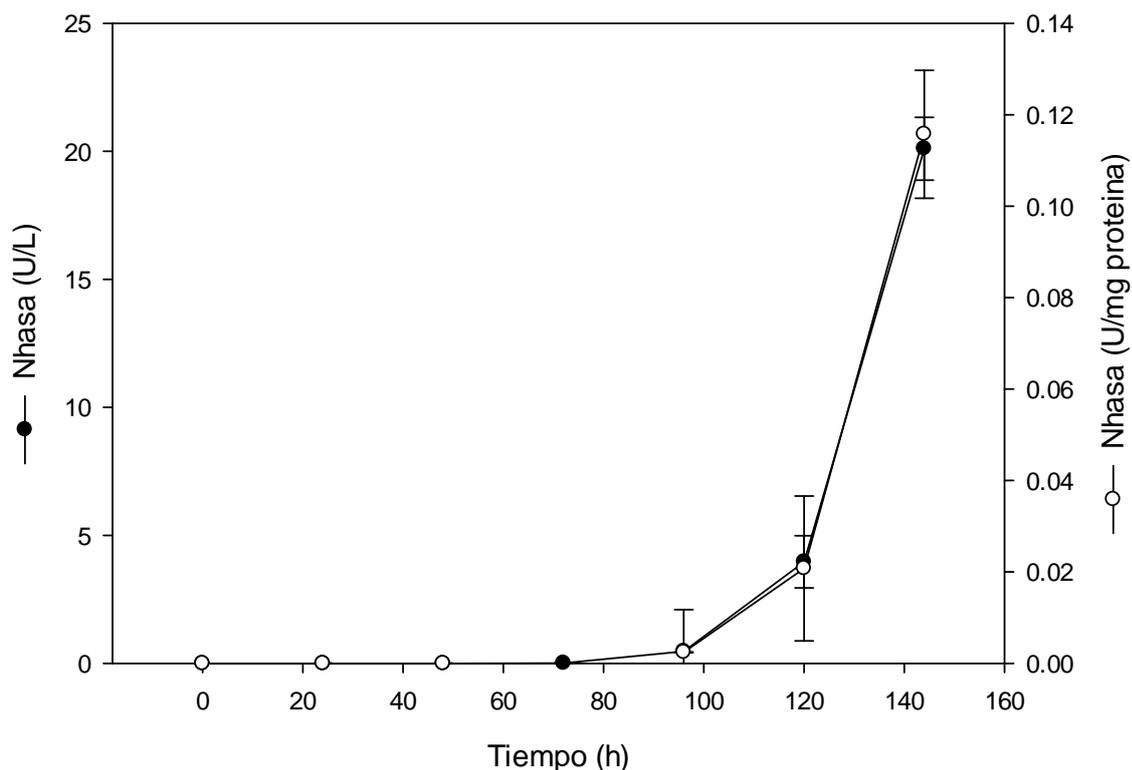


Figura 2. Actividad Nhasa volumétrica y específica de *Lecanicillium lecanii*, empleando quitina coloidal con 10% de proteína. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

En otros reportes, Matsumoto y col., (2004) reportan actividades de Nhasa de 162.5 y 838 U/mg de proteína cuando se inocula el biorreactor con esporas y micelio, respectivamente. Este aumento de actividad fue explicado a una mejor adaptación del microorganismo a la quitina, del ensilado de desperdicios de camarón, durante el pre-cultivo. Por lo que en el cultivo en medio sólido, la fase de adaptación para la producción de las enzimas fue acortada permitiendo una rápida asimilación de la quitina empleada como única fuente de carbono.

9.1.3. Actividades Nhasa y Endo en los cultivos sumergidos de *L. lecanii* empleando quitina coloidal con 14% de proteína.

En la figura 3 se muestran los resultados de producción enzimática de Nhasa obtenidos durante 144 h de cultivo, teniendo como resultado un máximo de actividad volumétrica de 7.54 ± 1.01 U/L y para actividad específica de 0.027 ± 0.0013 U/mg de proteína. Estos resultados se encuentran en el intervalo de producción reportado por Carrasco-Navarro y col. (2011), quien utiliza una suspensión de esporas como control para la producción de Nhasas de *L. lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano obteniendo 11.2 U/L para actividad volumétrica y 0.028 U/mg de proteína para actividad específica.

Por su parte Villa-Lerma y col., (2013), estudió la producción de Nhasa en condiciones similares de agitación (102 rpm) y de temperatura (25 °C), con resultados de 29.34 U/L y 0.61 U/mg de proteína. Este aumento significativo en la actividad de Nhasa fue explicado a los cambios de pH realizados durante el cultivo.

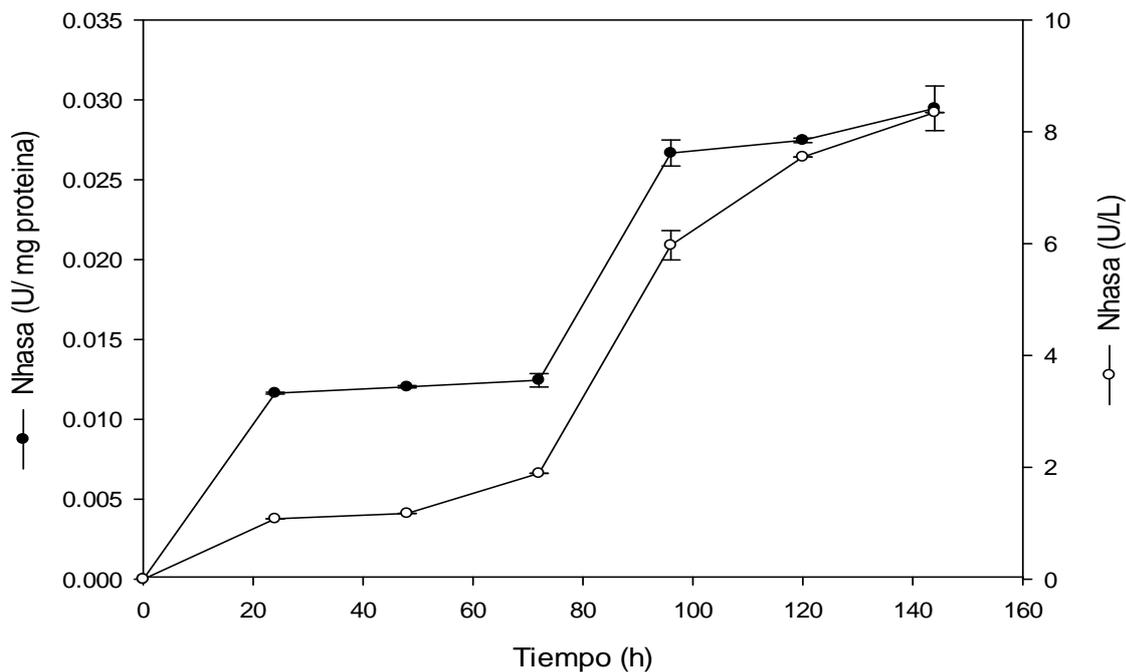


Figura 3. Actividad Nhasa volumétrica y específica de *Lecanicillium lecanii*, empleando quitina coloidal con 14% de proteína. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

Durante el tiempo que el cultivo sumergido, también se determinó la actividad Endo. En la figura 4 se muestran los resultados de producción enzimática, observándose la mayor actividad volumétrica de 624 ± 0.13 U/L a 120 h. Sin embargo, en la actividad específica se observan dos puntos máximos de producción, a las 72 y a las 120 h, con 23.33 ± 4.06 U/mg de proteína y 22.79 ± 4.16 U/mg de proteína, respectivamente. Comparando los resultados entre la producción de Nhasa y Endo (Figura 2 y 3) se puede corroborar el sinergismo de estas enzimas, ya que se observa que la mayor producción volumétrica de Nhasa (96 h) se obtiene cuando existe un descenso de la actividad Endo (Figura 4). Las enzimas con actividad Endo hidrolizan las cadenas de quitina para liberar quitin oligómeros, tales como los dímeros que funcionan como sustrato de las Nhasas (Marin-Cervantes y col., 2007). Adicionalmente, lo anterior es confirmado por Ramirez-Coutiño y col., (2009) quien reporta un comportamiento similar en la producción de Endo y Nhasa utilizando a *Verticillium fungicola*, donde el descenso

de la enzima Endo se presentó entre las 36 y 72h y su máxima producción fue determinada a las 96 h de cultivo.

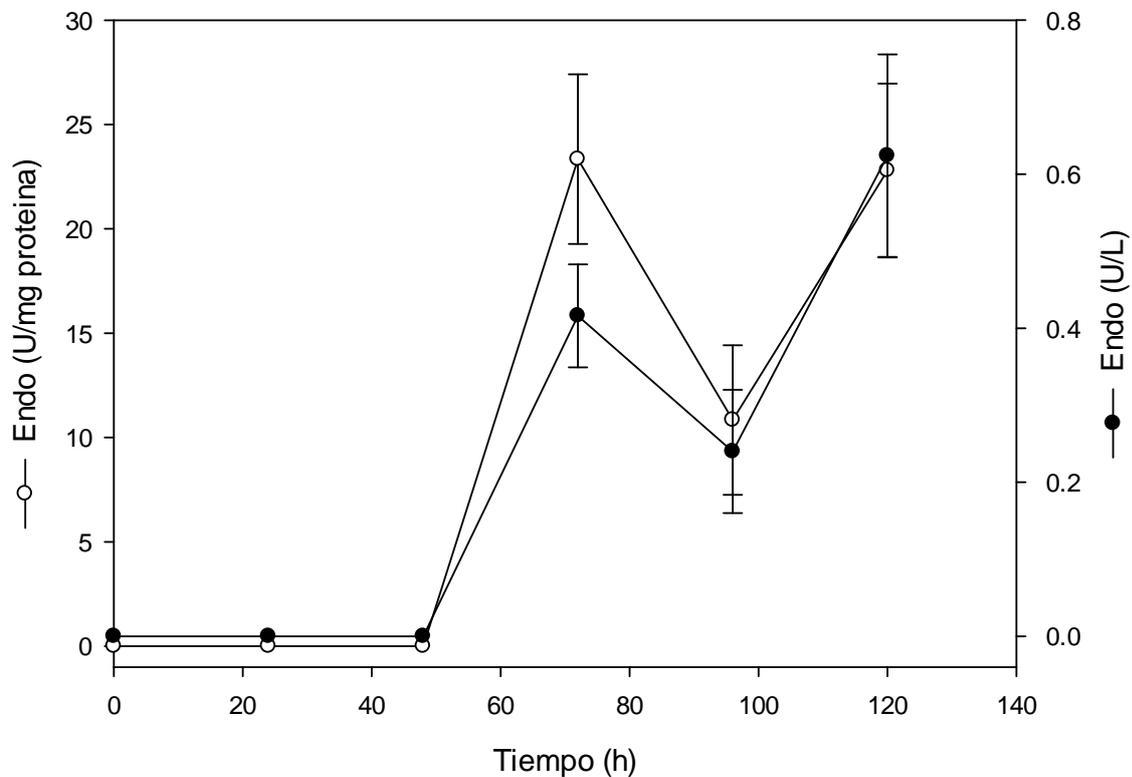


Figura 4. Actividad Endoquitinasa volumétrica y específica de *Lecanicillium lecanii* empleando quitina coloidal con 14% de proteína. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

10. Purificación de Nhasas

Una vez obtenidas las enzimas del extracto crudo usando quitina coloidal con 10% y 14% de proteína se procedió a purificarlas de acuerdo al protocolo previamente establecido por Carrasco-Navarro y col., (2011), como primer paso de purificación, se realizó la precipitación con sulfato de amonio a un 60% de saturación, esto con la finalidad de separar toda la proteína del extracto crudo incluyendo las enzimas de interés.

Respecto a la producción de quitinasas se observó que el incremento de proteína residual influyo en la producción de enzimas quitinolíticas, obteniendo producción

de ambas enzimas Nhasa y Endo utilizando la quitina coloidal con 14% de proteína residual.

Sin embargo al utilizar la quitina coloidal con 10% de proteína residual sólo se detectó actividad Nhasa pero esta resultado mayor cuando se utilizó quitina coloidal con 14% de proteína residual. De acuerdo a lo reportado por Loera y col. (2015), la cantidad de proteína tiene un efecto significativo en la producción de enzimas, ya que a una mayor concentración de proteína se incrementa la producción de estas.

10.1 Purificación de enzimas quitinolíticas utilizando extractos enzimáticos de *L. lecanii* empleando como sustrato quitina coloidal con 10% de proteína

Una vez obtenidas las enzimas de extracto crudo del cultivo adicionado con quitina coloidal con 10% de proteína se procedió a purificarlas de acuerdo a lo reportado por Carrasco-Navarro y col., (2011), como primer paso de purificación se realizó la precipitación con sulfato de amonio a un 60% de saturación, esto con la finalidad de separar toda la proteína del extracto crudo incluyendo las enzimas de interés.

10.1.1. Cromatografía de exclusión molecular.

La separación por exclusión molecular del precipitado con sulfato de amonio fue realizada determinándose la actividad quitinolítica a las fracciones obtenidas de la cromatografía (Figura 5). Las fracciones 9, 10 y 11 presentaron únicamente actividad Nhasa, 0.738, 0.380 y 0.313 U/mg proteína, respectivamente (Figuras 5 y 6). Sin embargo, ninguna otra fracción presentó actividad Nhasa o de Endo, esto corrobora los resultados observados durante la producción enzimática (sección 9.1.2.).

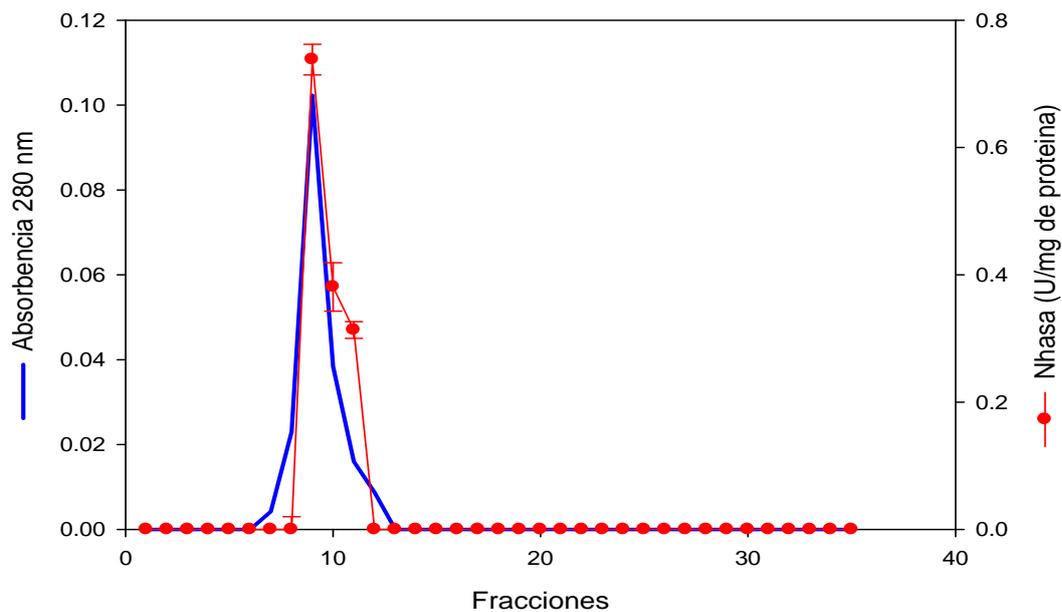


Figura 5. Cromatograma obtenido de la separación por exclusión molecular y actividad Nhasa específica de las fracciones. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

Las quitinasas de hongos tienden a presentarse como dímeros con una masa molecular en el rango de 11-150 kDa (Scigelova y Crout, 1999). Las fracciones con mayor concentración de proteína y actividad Nhasa y Endo (9, 10 y 11) obtenidas de cada paso de purificación fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE) y los gels obtenidos fueron teñidos con tinción de plata con el propósito de identificar las bandas proteicas correspondientes a quitinasas. En las fracciones 9, 10 y 11 obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular presentaron tres bandas de 67, 54 y 44 kDa (Figura 6).

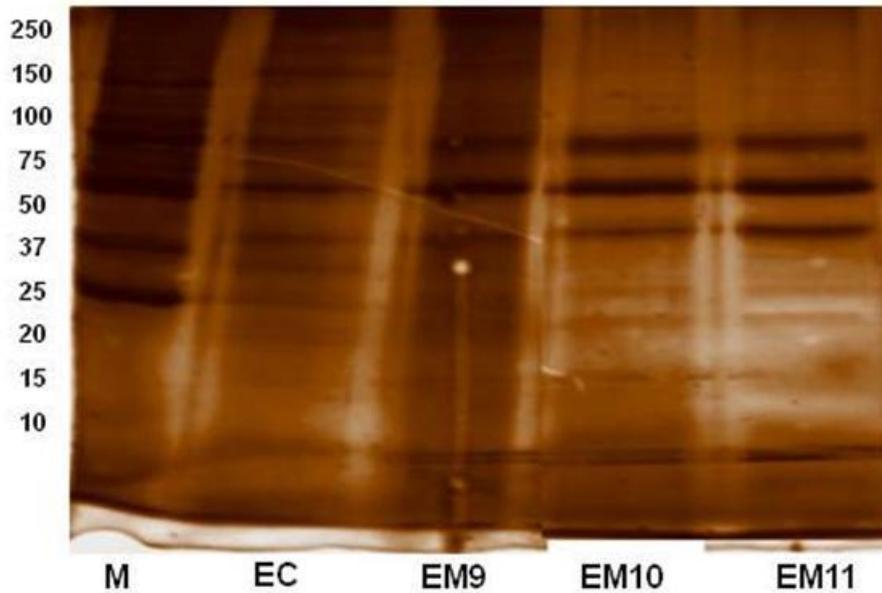


Figura 6. Electroforesis con tinción de plata de las fracciones que presentaron proteína en la cromatografía de exclusión molecular (EM). Fracciones: 9, 10 y 11, M: marcador, EC: Extracto crudo.

10.1.2. Cromatografía de intercambio aniónico.

Las fracciones obtenidas por exclusión molecular que presentaron actividad Nhasa (9, 10, 11) fueron sometidas a cromatografía de intercambio aniónico cada una de ellas por separado. Estas fueron ultrafiltradas para eliminar las sales que aun estuvieran presentes en la muestra y para equilibrarlas con la solución amortiguadora adecuada para la interacción iónica. Las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico se les determinó actividad Nhasa presentándose esta solo en las fracciones 50 a la 56, obteniendo valores de (0.02, 0.09, 0.10, 0.11, 0.15, 0.12, 0.09 U/mg proteína (Figura 7).

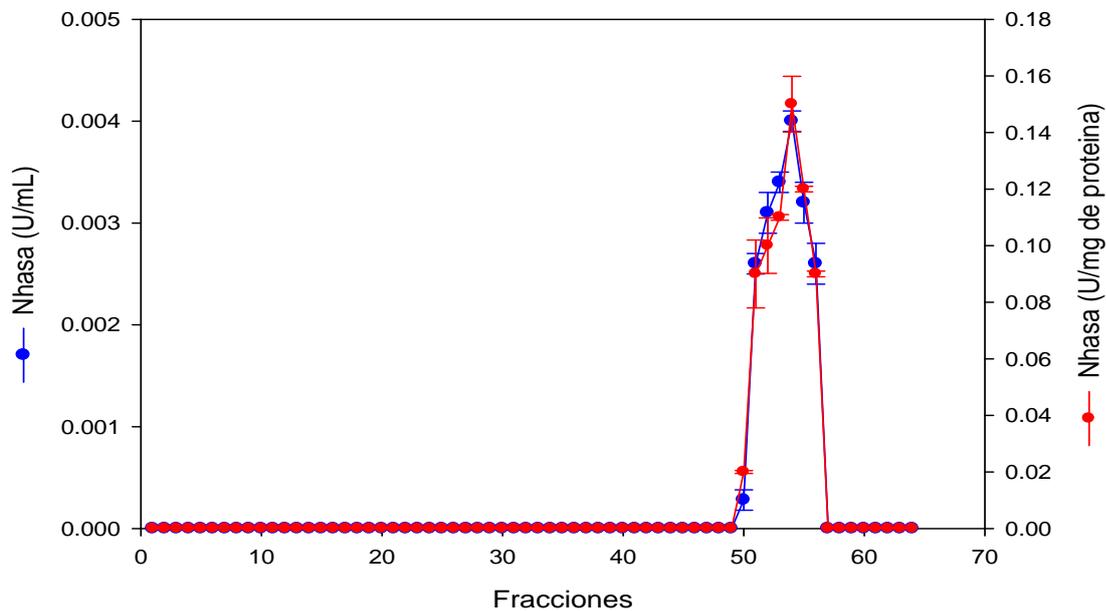


Figura 7. Actividades Nhasa volumétrica y específica de las fracciones. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

10.1.3 Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Los geles de electroforesis mostraron que después de la cromatografía de intercambio aniónico se aislaron las bandas de 67 y 54 kDa (Figura 8). Esto es acorde con lo informado por Carrasco-Navarro y col., (2011) quien purifica una Nhasa de *L. lecanii* que presenta un peso molecular de 55 kDa. En otros reportes Podile y col., (2013) lograron purificar una Nhasa de origen bacteriano empleando *Stenotrophomonas maltophilia*, encontrando una banda proteica de 41.6 kDa.

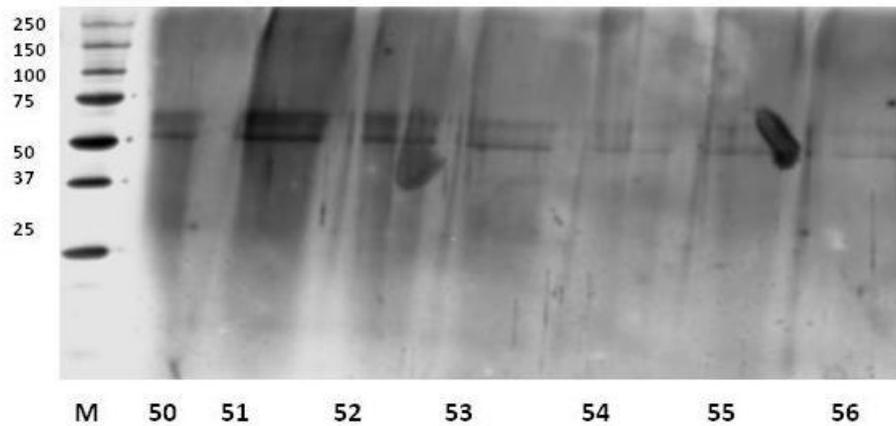


Figura 8. Electroforesis con tinción de plata de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico (IA). Fracciones 50-56, M: marcador.

10.1.4. Zimogramas de actividad Nhasa

La actividad Nhasa de las fracciones de purificación fue corroborada mediante zimogramas utilizando 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- β -*D*-glucosamina como sustrato. En la figura 8 se puede observar que hay actividad en el extracto crudo (EC) y en las fracciones 9, 10 y 11 después de exclusión molecular (EM) (Figura 9). Asimismo se determinó actividad Nhasa en las fracciones obtenidas de intercambio aniónico (Figura 10).

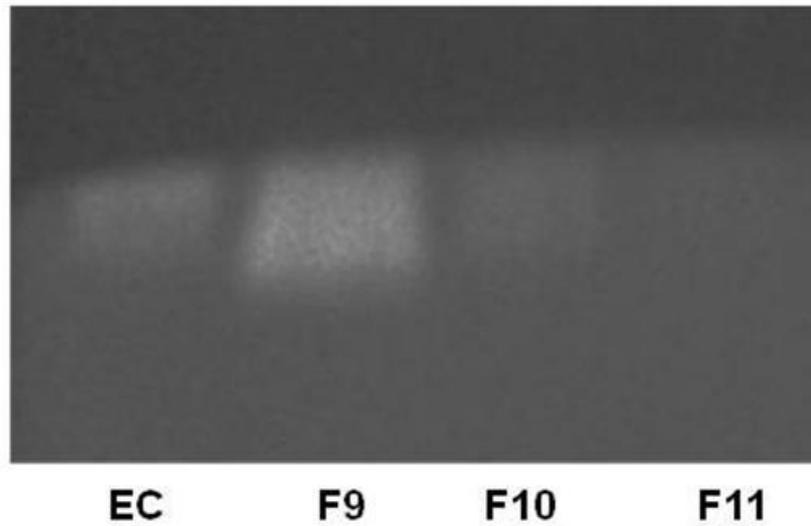


Figura 9. Zimograma de actividad Nhasa de las fracciones obtenidas por exclusión molecular, EC: Extracto crudo, F: Fracciones (9, 10 y 11).

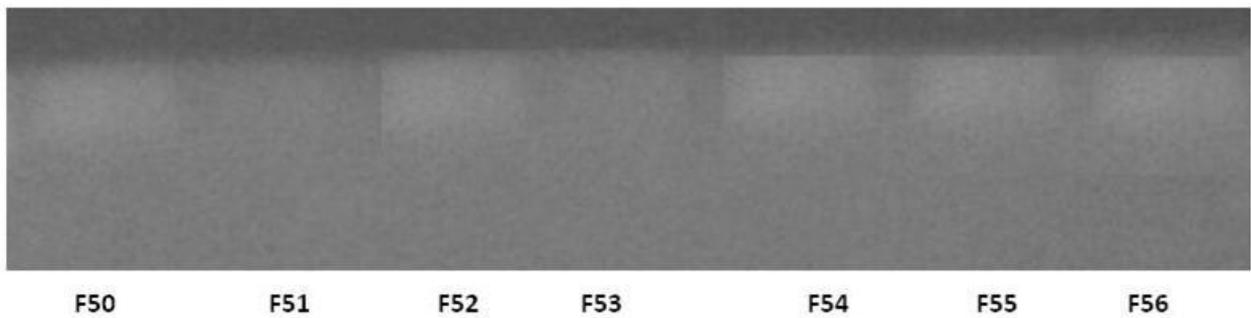


Figura 10. Zimograma de actividad Nhasa de las fracciones obtenidas por intercambio aniónico, F: Fracciones (50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56).

10.1.5. Purificación de la Nhasa producida en el cultivo de *L. lecanii* utilizando quitina con 10% de proteína residual

En la tabla 1 se resumen los resultados de la purificación de la Nhasa. En la que se observa que al inicio de la purificación se tenía una concentración de proteína de 289 mg, actividad total de 34 U y actividad específica de 0.11 U/mg de proteína. Durante la precipitación con sulfato de amonio se recuperó 84.9% de la enzima con un factor de purificación de 9.04. Hamaguchi y col., (2010) reportaron una recuperación del 68.8% de la enzima Nhasa, utilizando una precipitación al 40% de saturación del extracto enzimático crudo. La mayor cantidad de enzima precipitada en el presente trabajo fue con 60% de sulfato de amonio, estas condiciones fueron previamente establecidas en el estudio realizado por Carrasco-Navarro y col., (2011) y corroborado por Villa-Lerma y col., (2013). En otro trabajo de Taylor y col., (2002), logran recuperar el 83.71% del total de actividad enzimática en el paso de precipitación con sulfato de amonio durante la purificación de una quitinasa del hongo *Stachybotrys elegans*, éste es similar a lo encontrado en este trabajo.

En el paso de purificación de exclusión molecular (Tabla 1) se logró recuperar 28.26%, este valor fue más alto a lo encontrado por Villa-Lerma y col.,(2013) quienes reportan una recuperación de sólo el 8.6%. Esto se puede atribuir a que el rendimiento fue determinado con base en las actividades de las 5 fracciones, mientras que en el presente trabajo el rendimiento se calculó con todas las fracciones obtenidas de exclusión molecular y que presentaron actividad Nhasa. No obstante, el rendimiento es bajo si se compara con los estudios de Hamaguchi y col., (2010) que determinan una recuperación del 44.6%. Aunque son superiores a los obtenidos por Szukalska y col., (2014) que es de sólo el 3.5% para una galactosidasa de la bacteria *Arthrobacter* sp. 32cB.

Los resultados de la cromatografía de intercambio aniónico (Tabla 1), se logró recuperar el 40% con respecto a la actividad total. Adrangi y col., (2010) lograron recuperar 82% de una quitinasa con respecto a la actividad total inicial, esto pudo deberse al orden de los pasos de purificación ya que estos autores utilizan la

cromatografía de intercambio aniónico como primer paso y posteriormente llevan a cabo cromatografía de exclusión molecular para su purificación.

Tabla 1. Purificación de la Nhasa de *L. lecanii* en cultivo sumergido.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1700	290	34	0.12	1	100
Precipitación 60% de saturación	60	28	29	1.04	8.6	85
Exclusión molecular	15	1.3	22	17.2	143	65
Intercambio Aniónico	7	0.6	13	22	183	39

10.2. Purificación de enzimas quitinolíticas empleando como sustrato quitina coloidal con 14% de proteína

10.2.1 Cromatografía de exclusión molecular.

Las quitinasas del extracto crudo del cultivo de *L. lecanii* utilizando quitina coloidal con 14% de proteína como sustrato fueron purificadas siguiendo el mismo protocolo de purificación ya mencionado. En la Figura 11 se observa el cromatograma obtenido después de exclusión molecular, donde a las fracciones obtenidas se les determino actividad enzimática, siendo las fracciones 8, 9, 10 y 11 las que presentaron actividad Nhasa y encontrando la mayor actividad en las fracciones 8 y 10 con valores de 0.4147 U/mg de proteína y 0.633 U/mg de proteína, respectivamente, mientras que las fracciones 9 y 11 mostraron valores de 0.227U/mg de proteína y 0.4456 U/mg de proteína, respectivamente.

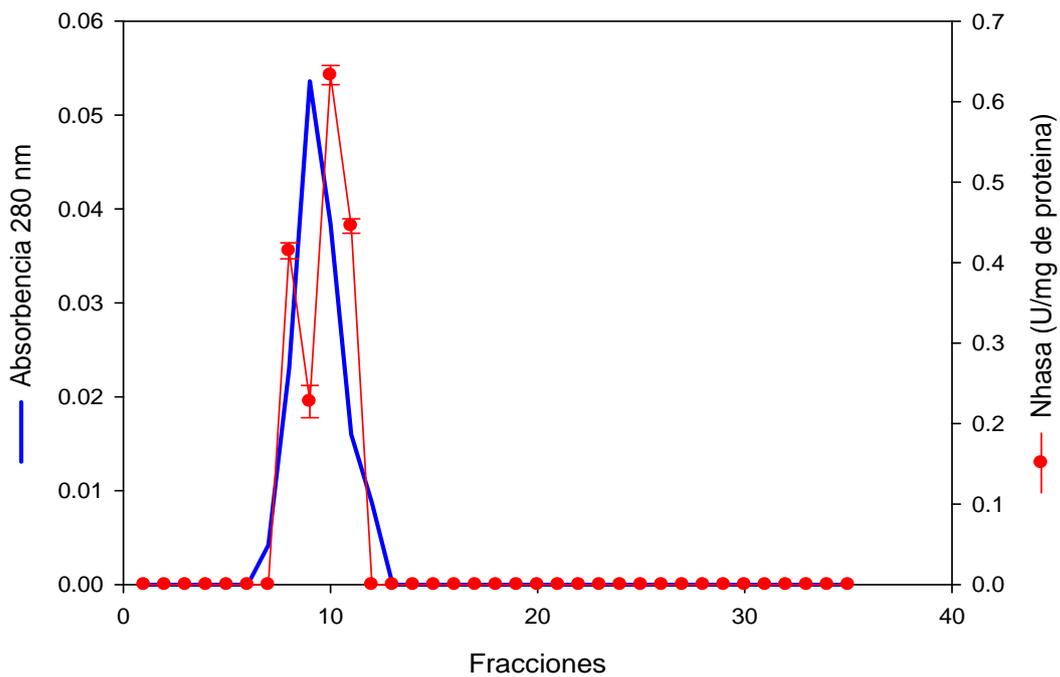


Figura 11. Cromatograma obtenido de la separación por exclusión molecular y actividad Nhasa específica de las fracciones. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

Además, se determinó la actividad Endo a todas las fracciones obtenidas, mostrando que las fracciones 8, 9, 10 y 11 presentan actividad enzimática (Figura 12). Las fracciones 10 y 11 tuvieron la mayor actividad Endo, 3151.51 U/mg de proteína y 2008.13 U/mg de proteína, respectivamente y las fracciones 8 y 9 presentaron menor actividad, 878.37 U/mg de proteína y 576.20 U/mg de proteína, respectivamente.

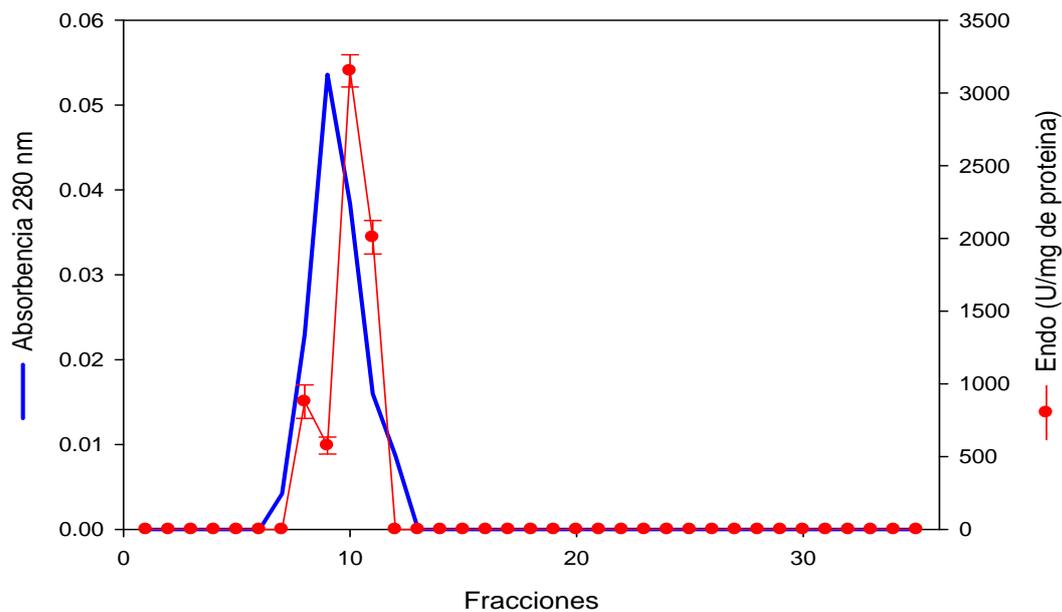


Figura 12. Cromatograma obtenido de exclusión molecular y actividad Endo en U/ mg de proteína de las fracciones 8, 9, 10 y 11. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones y su desviación estándar.

10.2.2 Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Se realizaron geles de electroforesis con el propósito de observar las proteínas presentes en las fracciones. Esto se efectuó únicamente en las fracciones que presentaron actividad quitinolítica en el cromatograma obtenido de exclusión molecular. Los resultados se muestran en la Figura 13, donde se pueden observar al menos tres bandas en las fracciones 8, 9, 10 y 11 que corresponden a un peso molecular de 91, 69 y 30 kDa. Estos valores se encuentran dentro de los reportados para quitinasas.

Carrasco-Navarro y col., (2011) reporta bandas con pesos moleculares de 51, 62, 101 y 38.7 kDa esto se puede deber a que en dicho trabajo el sistema de producción de enzimas fue utilizando a *L. lecanii* inmovilizado. Ramirez-Coutiño y col., (2006), reportan bandas con pesos moleculares de 23 y 100 kDa, siendo esta última es asignada a proteasas, en el presente trabajo se obtuvieron valores de 0.46 U/mg de proteína y bandas de 91 kDa por lo que se puede concluir que en el presente análisis también hay presencia de proteasas. En la muestra

inyectada en una columna de intercambio aniónico se pueden observar varias bandas proteicas las cuales no se eliminaron en este paso de purificación, debido a que las muestras obtenidas de exclusión molecular se mezclaron por lo que se decidió para este paso de purificación, inyectar las muestras de exclusión molecular por separado en una columna de intercambio aniónico.

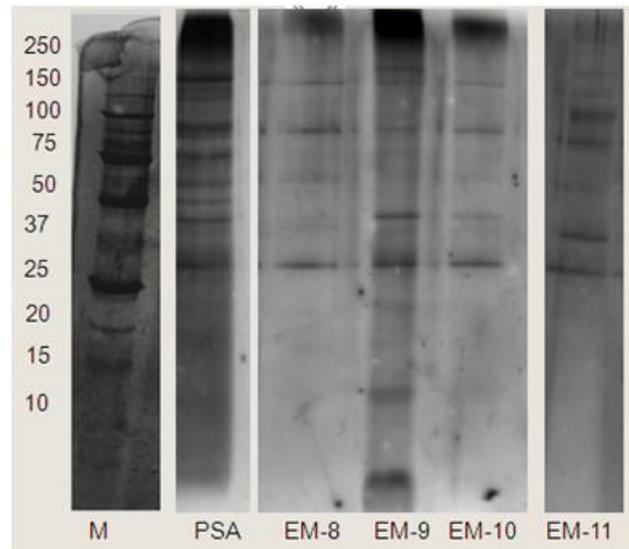


Figura 13. Electroforesis con tinción de plata de las fracciones que presentaron proteína en la cromatografía de exclusión molecular (EM). Fracciones: 8, 9, 10, 11, PSA: fracción obtenida después de precipitación con sulfato de amonio. M: marcador.

10.2.3 Zimogramas de actividad Nhasa y Endo

Debido a que durante la etapa de producción enzimática de este cultivo se determinó la presencia de enzimas Nhasa y Endo. En esta etapa, la actividad enzimática de Nhasa y Endo fue corroborada mediante zimogramas en cada uno de los pasos de purificación del extracto enzimático. En la figura 14 se puede observar que hay actividad Nhasa en las fracciones 8 y 11 después de exclusión molecular. Las fracciones 9 y 10 no presentaron actividad Nhasa, de acuerdo a lo reportado por Tronsmo y Harman (1996) la visualización de la actividad quitinolítica mediante zimogramas se puede ver afectada por la adición del 2-mercaptoetanol, ya que al ser un agente reductor este puede estar afectando la

estabilidad de las enzimas, desnaturalizándola completamente y por consecuencia que esta pierda su actividad quitinolítica.

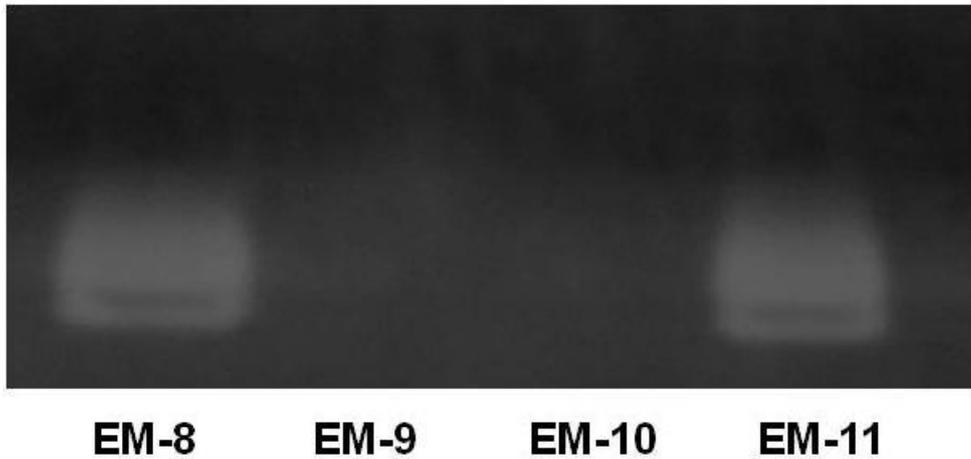


Figura 14. Zimograma de actividad Nhasa de las fracciones obtenidas por exclusión molecular, EM: Fracciones (8, 9, 10 y 11).

Mientras que en el zimograma de actividad Endo (Figura 15) podemos ver la presencia de la enzima en las mismas fracciones que presentaron actividad Nhasa, fracciones 8, 9, 10 y 11, (Figura 13). Esto se puede deber a que ambas enzimas tengan un peso molecular cercano, asimismo los resultados de electroforesis desnaturalizante mostraron la presencia de al menos cuatro o cinco bandas en una misma fracción obtenida de exclusión molecular (Figura 14). Por su parte, Villa-Lerma y col., (2013) reportan actividades Nhasa y Endo en una misma fracción obtenida después de exclusión molecular debido a que ambas enzimas presentaron una masa molecular similares de 69 y 30 kDa para Nhasa y Endo respectivamente.

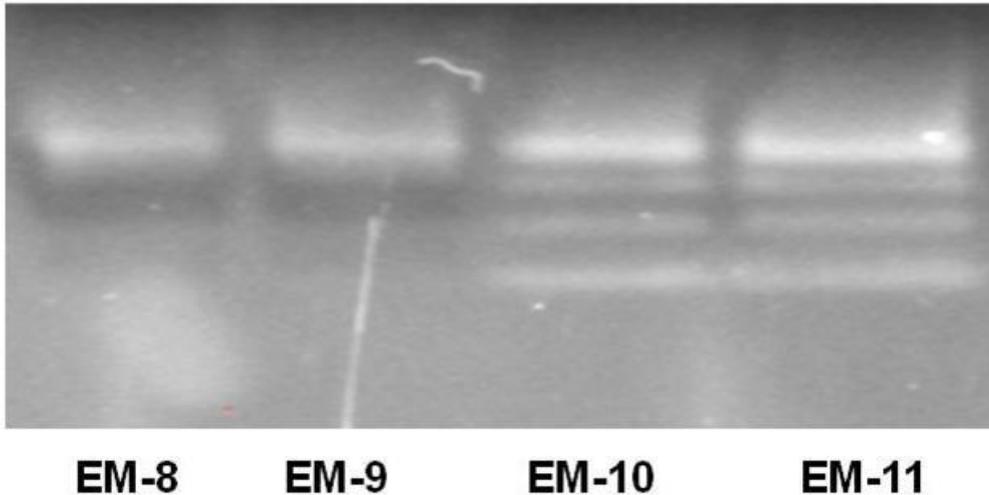


Figura 15. Zimograma de actividad Endo de las fracciones obtenidas por exclusión molecular, EM: Fracciones (8, 9,10 y 11).

10.2.3. Tabla de purificación de la Nhasa y Endo producidas en el cultivo de *L. lecanii* utilizando quitina con 14% de proteína residual

En la tabla 2 se resumen los resultados de la purificación parcial de la Nhasa y Endo precipitadas al 60% de saturación, al inicio de la purificación se tenía una concentración de proteína de 489 mg, actividad total de 12.06 U y una actividad específica de 0.028 U/mg para Nhasa. Durante la precipitación con sulfato de amonio se recuperó 5.95% de la enzima con un factor de purificación de 1.15, autores como Carrasco-Navarro y col., (2011) reporta recuperación del 50.9% de la enzima y un factor de purificación de 1.35 después de la precipitación con sulfato de amonio; Hamaguchi y col., (2009) reportan una recuperación del 68.8% y un factor de purificación de 8.8.

Después de la cromatografía de exclusión molecular solo se recuperó el 1.82% de la enzima proveniente del extracto crudo, sin embargo, la actividad específica aumento más de un 100% (1.3 U/mg) con respecto al paso anterior, en este paso se logró un factor de purificación de 47.2. Hamaguchi y col., (2009) obtienen un factor de purificación de 875 para el paso después de cromatografía de exclusión molecular y actividad específica de 0.168 U/mg que resulta ser una valor bajo comparado con lo obtenido en el presente trabajo, esto se debe a que los autores

emplean la cromatografía de exclusión molecular como tercer paso de purificación, al aumentar un paso de purificación el factor de purificación aumenta ya que la actividad específica también aumenta respecto al paso inicial.

Para el caso de la enzima Endo se recuperó el 88% de la enzima y un factor de purificación de 1.36 después de la precipitación con sulfato de amonio, pero después de la columna de exclusión molecular se logró recuperar 78.49% de la actividad total del paso inicial.

Tabla 2. Purificación parcial de la Nhasa y Endoquitinasa de *L. lecanii* en cultivo sumergido, empleando quitina coloidal la cual contiene 14% de proteína.

Paso purificación	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)		Actividad específica (U/mg)		Factor de purificación		Rendimiento (%)	
			Nhasa	Endo	Nhasa	Endo	Nhasa	Endo	Nhasa	Endo
Extracto crudo	1700	490	12.1	998	0.028	23	1	1	100	100
Precipitación 60% de saturación	60	452	0.72	879	0.031	32	1.15	1.36	5.94	88
Exclusión molecular	15	1.5	0.22	784	1.3	6613	47.2	290	1.82	78

11. Actividad de transglicosilación

Una de las necesidades actuales en la investigación química es el desarrollo de reacciones más amigables con el medio ambiente. La glicosilación es un ejemplo, siendo esta una de las reacciones más importantes y difíciles para la síntesis de biomoléculas, ya que requiere de múltiples etapas de reacción y el uso de diversos grupos protectores. En la naturaleza hay varias enzimas como glicosiltransferasas, liasas, y glicosidasas capaces de romper y unir fácilmente el enlace glicosídico con alta selectividad. Hoy en día, el uso de biocatalizadores parece ser uno de los enfoques más prometedores como herramientas para la

síntesis de glicoconjugados y su aplicación en varios campos biotecnológicos (Pennec y col., 2015).

Se determinó la actividad de transglicosilación de las Nhasas purificadas y las enzimas del precipitado con sulfato de amonio. Se evaluó el efecto del pH, la concentración de sustrato donador y la concentración de enzima sobre la actividad de transglicosilación.

11.1 Efecto de la concentración de sustrato donador sobre la actividad de transglicosilación

Para probar la actividad de transglicosilación (TGA) con las enzimas mencionadas anteriormente se emplearon tres concentraciones, 0.2, 0.4 y 0.6 mM de N-acetilactosamina (Lac NAc), utilizado como sustrato donador. En la Figura 16 se observa la influencia de la concentración de sustrato donador en la TGA empleando una concentración de 0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de enzima proveniente del precipitado con sulfato de amonio.

Para una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de precipitado enzimático se aprecia que la concentración de sustrato donador no afectó la liberación de 4-metilumbeliferil a pH 8.5. Cuando se empleó pH 7, se observa que aumento la actividad enzimática, sin embargo, al incrementar la concentración de sustrato donador, la actividad no fue afectada, siendo así que se obtuvo la mayor TGA a pH 7 empleando una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Se puede observar que al utilizar una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de precipitado enzimático, no se incrementó la fluorescencia, medida indirecta de la transglicosilación. Esto ocurrió sin importar la concentración de sustrato donador o pH utilizado en la reacción.

Al realizar el análisis estadístico correspondiente se encontró que la concentración de sustrato donador no mostró efecto significativo en la actividad de transglicosilación en los tratamientos probados con el precipitado enzimático, ya que no se obtuvo un incremento de fluorescencia, la cual es una medida indirecta de dicha actividad. Sin embargo, el pH y la concentración de enzima en

la reacción si tuvieron efecto significativo. Se determinó que la máxima TGA se obtuvo al utilizar una concentración de precipitado enzimático de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y pH 7 en la reacción.

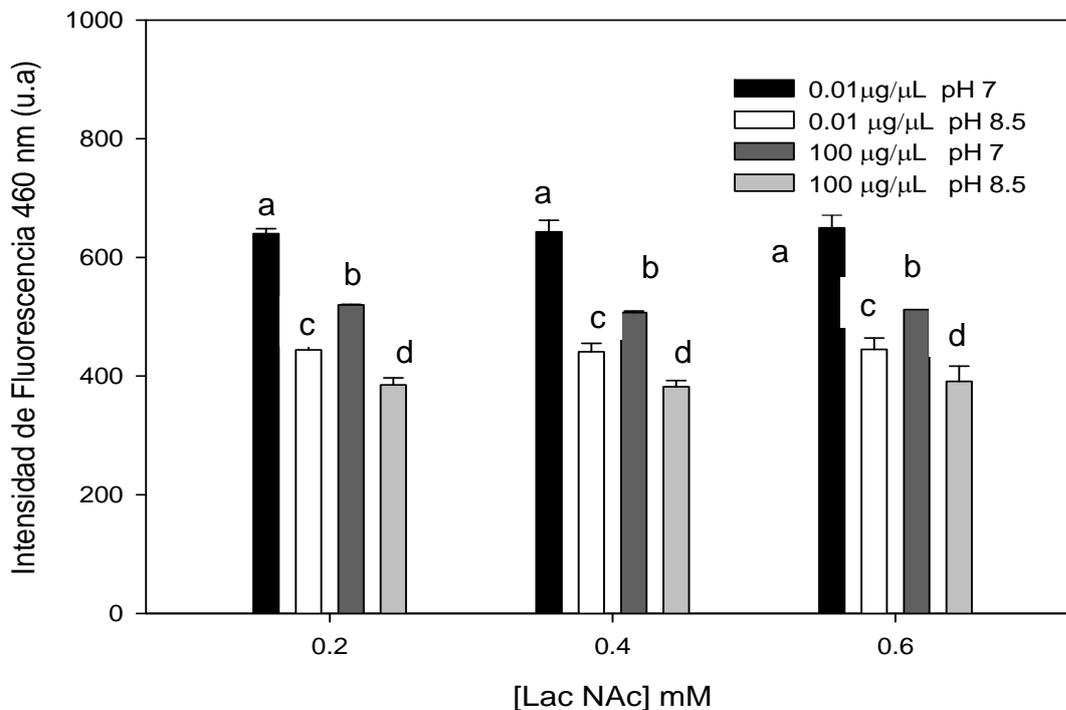


Figura 16. Efecto de la concentración de sustrato donador en la TGA empleando una concentración de 0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de enzima proveniente del precipitado con sulfato de amonio. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

La TGA también se probó utilizando la Nhasa parcialmente purificada. En la Figura 17 se puede apreciar que para 0.01 mg/mL de enzima parcialmente pura, la concentración de sustrato donador no influye en la liberación del 4 metillumbeliferil tanto a pH 7 como a 8.5. Aunque a pH 7 se observa una mayor actividad enzimática respecto a 8.5, dicha actividad no aumenta conforme se incrementa la concentración de sustrato donador. Se observa el mismo comportamiento a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de enzima parcialmente pura para ambos pH.

Al igual que en el caso anterior, se determinó que la concentración de sustrato no influyó sobre la TGA y que solo la concentración de enzima y pH de la reacción fueron significativos. Se determinó que la mayor TGA se obtuvo al utilizar la

concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la Nhasa parcialmente purificada y un pH 7 en la reacción. Estos resultados son contrarios a los obtenidos al utilizar el precipitado enzimático y se puede deber a la presencia de diversas enzimas que existen en el precipitado, las cuales pueden interferir con la actividad y estabilidad de la Nhasa. Por ejemplo, el pH de 8.5 podría favorecer la actividad de proteínas que estuvieran en mayor concentración en comparación con la Nhasa o incluso favorecer la actividad de enzimas como las proteasas que a su vez puedan hidrolizar a la quitinasa.

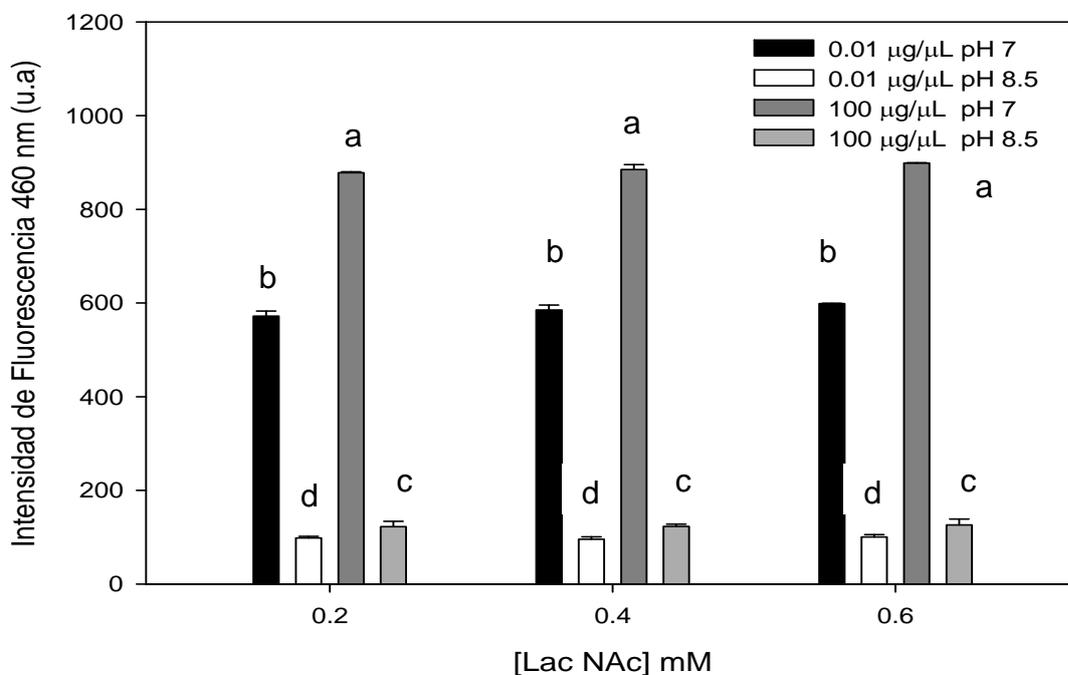


Figura 17. Efecto de la concentración de sustrato donador en la TGA empleando una concentración de 0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la Nhasa parcialmente purificada. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias de Tukey.

11.2 Efecto de la concentración de enzima y el pH sobre la actividad de transglicosilación

Con el fin de observar si la concentración de enzima influye en la actividad de transglicosilación se decidió probar dos concentraciones de enzima (0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con sulfato de amonio y de las Nhasas purificadas).

En la figura 18 se puede observar la TGA a pH 7 usando una concentración de enzima de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con sulfato de amonio en el cual se puede ver que la concentración de enzima influye en dicha actividad, ya que se obtiene una máxima intensidad de fluorescencia a los 40 minutos en cambio cuando se utiliza una menor concentración de enzima (0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se obtiene una máxima intensidad de fluorescencia a los 80 minutos, esto puede atribuirse a que al tener una mayor cantidad de enzima se esté consumiendo el sustrato rápidamente y por consecuencia se obtiene una mayor actividad enzimática en un menor tiempo, a diferencia de cuando se utiliza una menor concentración de enzima se obtiene una máxima intensidad de fluorescencia en un mayor tiempo. Por otro lado, cuando la reacción de transglicosilación se llevó a cabo a pH 8.5 (Figura 19) para ambas concentraciones de enzima se pudo observar que hay una disminución en la producción de fluorescencia para ambos casos a comparación con lo obtenido a pH 7.

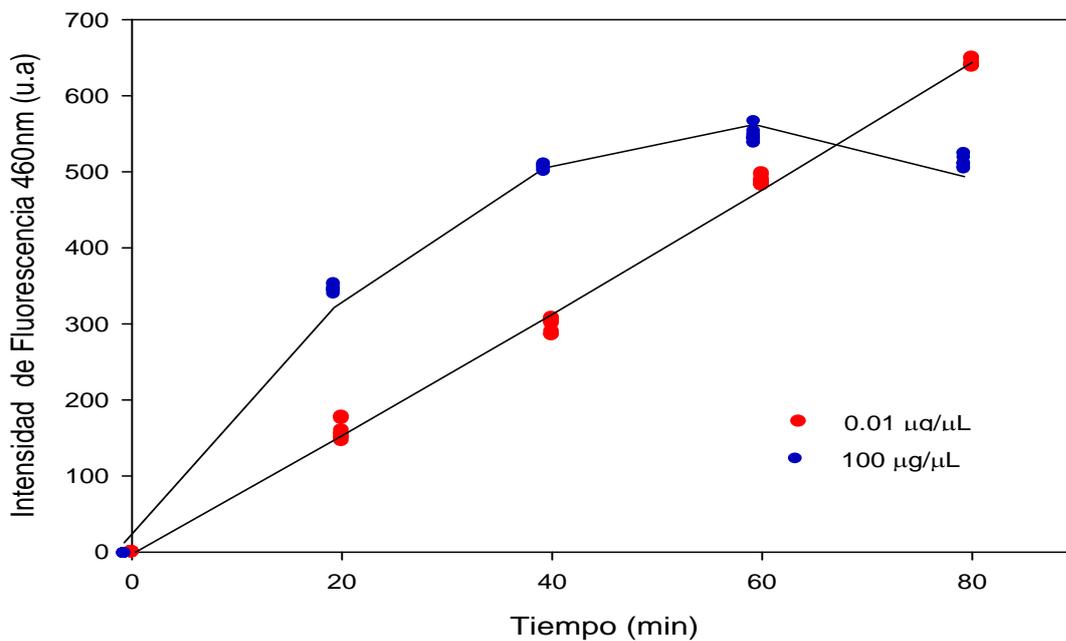


Figura 18. Actividad de transglucosilación a pH 7 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

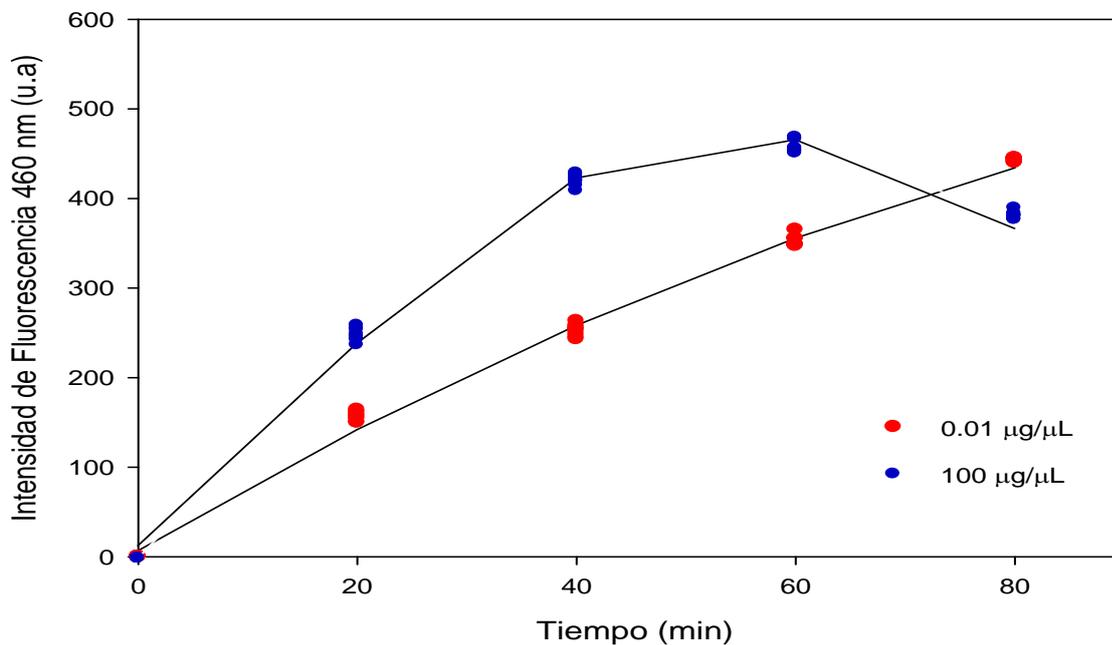


Figura 19. Actividad de transglucosilación a pH 8.5 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En la Figura 20 se muestra la TGA a pH 7 utilizando la Nhasa parcialmente pura a las concentraciones ya mencionadas, donde se puede apreciar que a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de enzima hay una máxima intensidad de fluorescencia de 900 unidades a los 80 minutos y 600 unidades cuando se utiliza una menor concentración de enzima. Este comportamiento es similar a lo obtenido con las enzimas del precipitado de sulfato de amonio a las mismas concentraciones de enzima. Por el contrario, cuando se llevó a cabo la reacción de transglicosilación de la Nhasa parcialmente pura a pH 8.5 (Figura 21) hay una disminución considerable en la intensidad de fluorescencia. Cabe mencionar que, tanto las enzimas del precipitado como las Nhasas puras presentaron el mismo comportamiento en la intensidad de fluorescencia y ambas presentan disminución al aumentar el pH, lo que se puede atribuir al efecto que tiene el pH sobre la actividad hidrolítica de las enzimas. Esto es apoyado por Michinari y col., (2007) quienes reportan que a condiciones básicas (pH 8 - 11) las enzimas pierden parcial o totalmente su actividad hidrolítica, ya que un ácido carboxílico que se encuentra en su residuo catalítico es desprotonado bajo condiciones básicas.

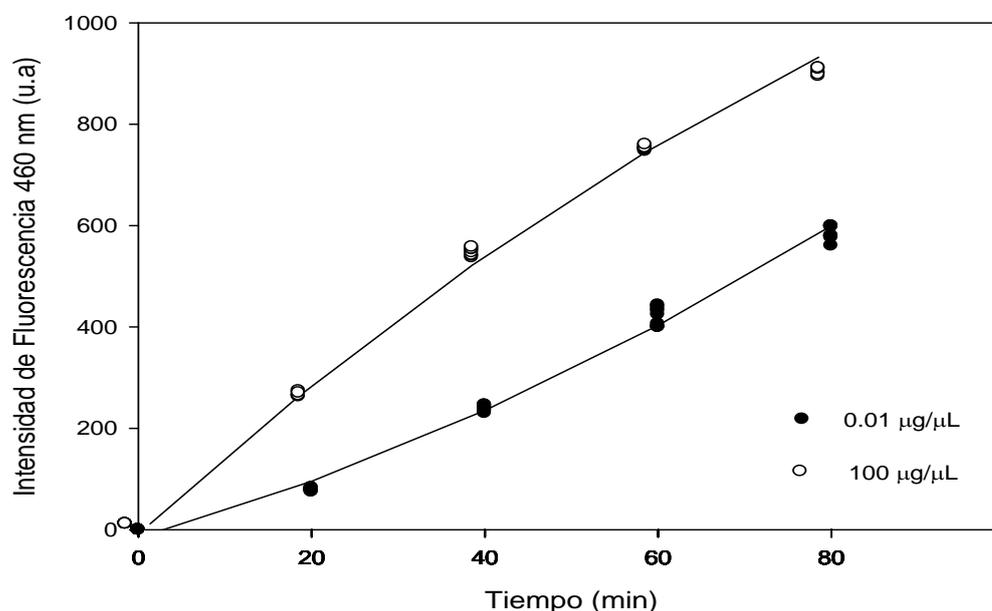


Figura 20. Actividad de transglicosilación a pH 7 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la Nhasa parcialmente purificada.

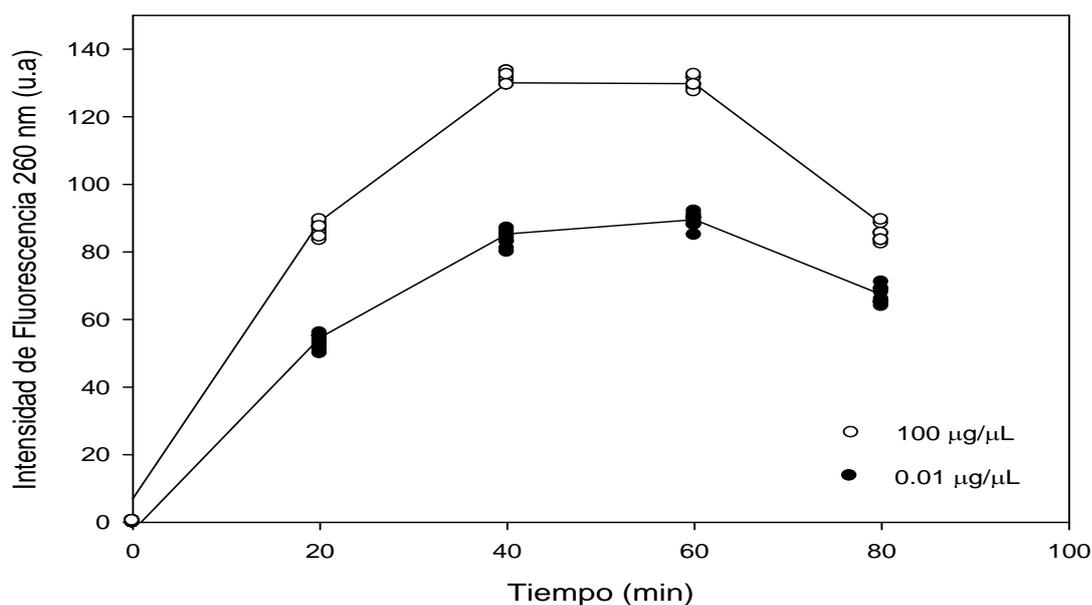


Figura 21. Actividad de transglicosilación a pH 8.5 usando una concentración de enzima de 100 y 0.01 µg/µL de la Nhasa parcialmente purificada.

Al utilizar una concentración de 100 µg/µL de la Nhasa purificada para la reacción de transglicosilación se obtuvieron 900 unidades de fluorescencia. Este resultado es mayor a lo obtenido cuando se utilizó la enzima precipitada con sulfato de amonio. Esta disminución se puede atribuir a que en el precipitado con sulfato de amonio estén presentes proteasas (0.46 U/mg de proteína), las cuales probablemente están inhibiendo la actividad hidrolítica. Kumar y col., (2010) reporta que la actividad hidrolítica es inhibida por enzimas proteasas ya que estas actúan directamente sobre los enlaces peptídicos de las proteínas.

En otro reporte Li y col., (2008), al medir la reacción de transglicosilación de una quitinasa purificada de *Bacillus sp.*, reportan 50,000 unidades de fluorescencia, esto utilizando para la reacción de transglicosilación una enzima modificada en su sitio catalítico. Umemoto y col., (2013) también reporta que al mutar un residuo de glicina del subsitio +1 de la quitinasa de *Arabidopsis thaliana*, se incrementa la actividad de transglicosilación.

11.3 Determinación de los productos de transglicosilación

Se realizó una cromatografía en capa fina con el propósito de observar los productos obtenidos de la reacción de transglicosilación. En la figura 22 se muestra el cromatograma obtenido, en el cual se aprecia en los carriles 1, 2 y 3 los sustratos de TGA, GlcNAc-MU, GlcNAc y LacNac, respectivamente. En los carriles 4-6 y 8-10 se inyectaron las muestras de la reacción de transglicosilación a pH 7, donde los carriles 4-6 representan la utilización de enzima a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y los carriles del 8-10 a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ambos del precipitado con sulfato de amonio. Para los carriles 12-15 y 16-17 se inyectaron los productos obtenidos a pH 8.5 utilizando una concentración de enzima de 0.01 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del precipitado con sulfato de amonio.

Observando la corrida de las manchas de cada una de las muestras inyectadas se puede decir que hay presencia de un trímero o tetrámero de quitina en las muestras obtenidas al utilizar el precipitado enzimático y pH 7 en la reacción (carriles 4-6 y 8-10), contrario a lo obtenido de la reacción a pH 8.5 (carriles 12-14 y 15-17) donde no hay presencia de este producto pero se logran observar la presencia de los sustratos de TGA. Al presentarse estas manchas en el cromatograma se dedujo que la enzima no había llevado a cabo la reacción de transglicosilación, esto se puede atribuir al cambio de pH ya que este pudo haber inhibido la actividad.

Al utilizar la Nhasa parcialmente purificada para la reacción de transglicosilación (Figura 23), se inyectaron en los carriles 4-6 y 7-8 los productos obtenidos a pH 7 de la enzima parcialmente pura a una concentración de 0.01 y 100, respectivamente. Para los carriles 10 y 11 se inyectaron los productos obtenidos a pH 8.5 a las mismas concentraciones de enzima purificada. De acuerdo con las manchas obtenidas en este cromatograma, se aprecia el mismo comportamiento en cuanto a la producción de oligómeros con grado de polimerización entre 3 y/o 4, cuando se lleva a cabo la TGA a pH 7. Asimismo, se observa que la enzima purificada no presenta TGA a pH 8.5.

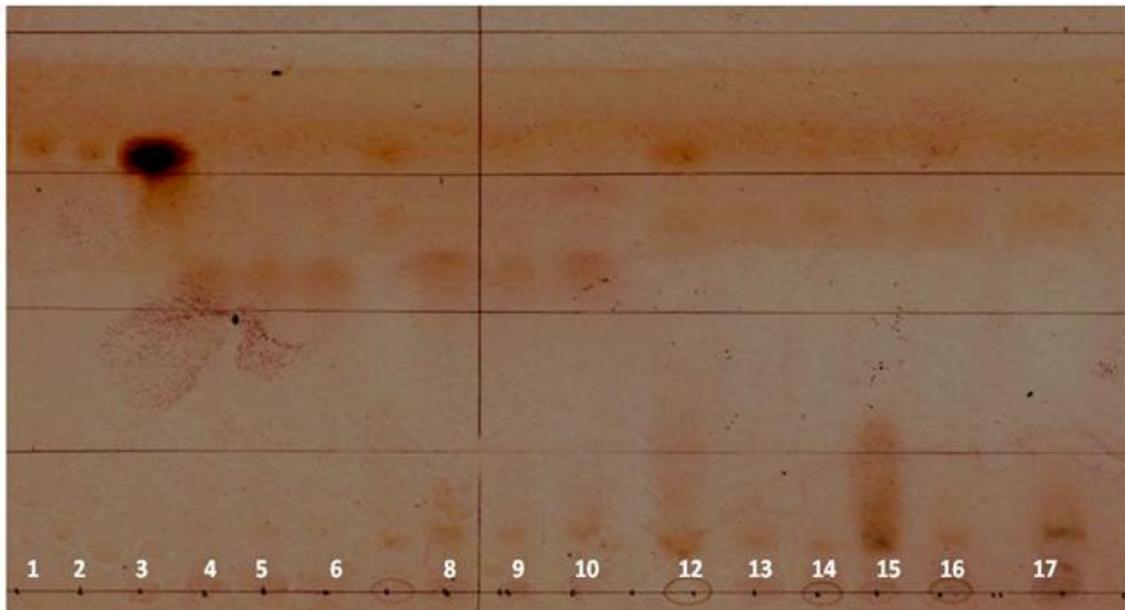


Figura 22. Cromatograma de los productos obtenidos TGA. [1-3] GlcNAc-MU, LacNac y GlcNAc [4-6]: TGA a pH 7, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EPP, [8-10]: TGA pH 7, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ EPP, [12-14]: TGA pH 8.5,



Figura 23. Cromatograma de los productos obtenidos TGA. [1-3] GlcNAc-MU, GlcNAc y LacNac [4-5]: TGA a pH 7, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NPP, [6-8]: TGA pH 7, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NPP, [10]: TGA pH 8.5, 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ NPP, [11]: TGA pH 8.5, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

11.4 Determinación del grado de polimerización de los oligómeros obtenidos por TGA por MALDI-TOF

A continuación, se muestran los espectros de MALDI-TOF de los oligómeros obtenidos por TGA a pH 7 usando las enzimas del precipitado con sulfato de amonio y las Nhasas parcialmente purificadas. Para la identificación del grado de polimerización de los oligómeros obtenidos se utilizó una tabla con las relaciones masa/carga (m/z) y los posibles aductos generados debido a la incorporación de átomos de Na y K (Anexo 4). En la reacción de TGA observada con la Nhasa parcialmente purificada se obtuvieron oligómeros de 4 unidades siendo el más abundante, el tetrámero con un grupo acetilo (Figura 24). Por otra parte, la TGA empleando las enzimas del precipitado con sulfato de amonio produjo oligómeros con grado de polimerización de 4 con diferentes grados de acetilación (1, 2 y 3) siendo los más abundantes el tetrámero con un grupo acetilo (Figura 25). Sin embargo, para este caso, la intensidad del pico fue mayor a diferencia del obtenido al utilizar la enzima del precipitado con sulfato de amonio. Para la TGA a pH 8.5 utilizando Nhasa parcialmente purificada y las enzimas del precipitado con sulfato de amonio (Figura 26 y 27) se observó que no hay presencia de oligómeros, esto se atribuyó a que el pH inhibió la actividad de transglicosilación, pero la actividad hidrolítica sigue presente a estas condiciones. Li y col., (2008) prueban TGA de una quitinasa de *Bacillus* sp. proveniente del extracto crudo sin purificar y pura. En este trabajo, dicha actividad fue afectada por la presencia de proteasas. Considerando lo mencionado anteriormente, la escasa formación de oligómeros reportada en el presente trabajo se puede atribuir a la presencia de proteasas en el precipitado con sulfato de amonio afectaron la TGA.

Así mismo, los autores antes mencionados reportan oligómeros con grado de polimerización de 12 y 13 para un tiempo de 1000 min. Sin embargo, en el presente trabajo se obtienen tetrámeros en un tiempo de 80 min, debido a esto se puede considerar el tiempo como un factor que también influye sobre la TGA de las enzimas tratadas.

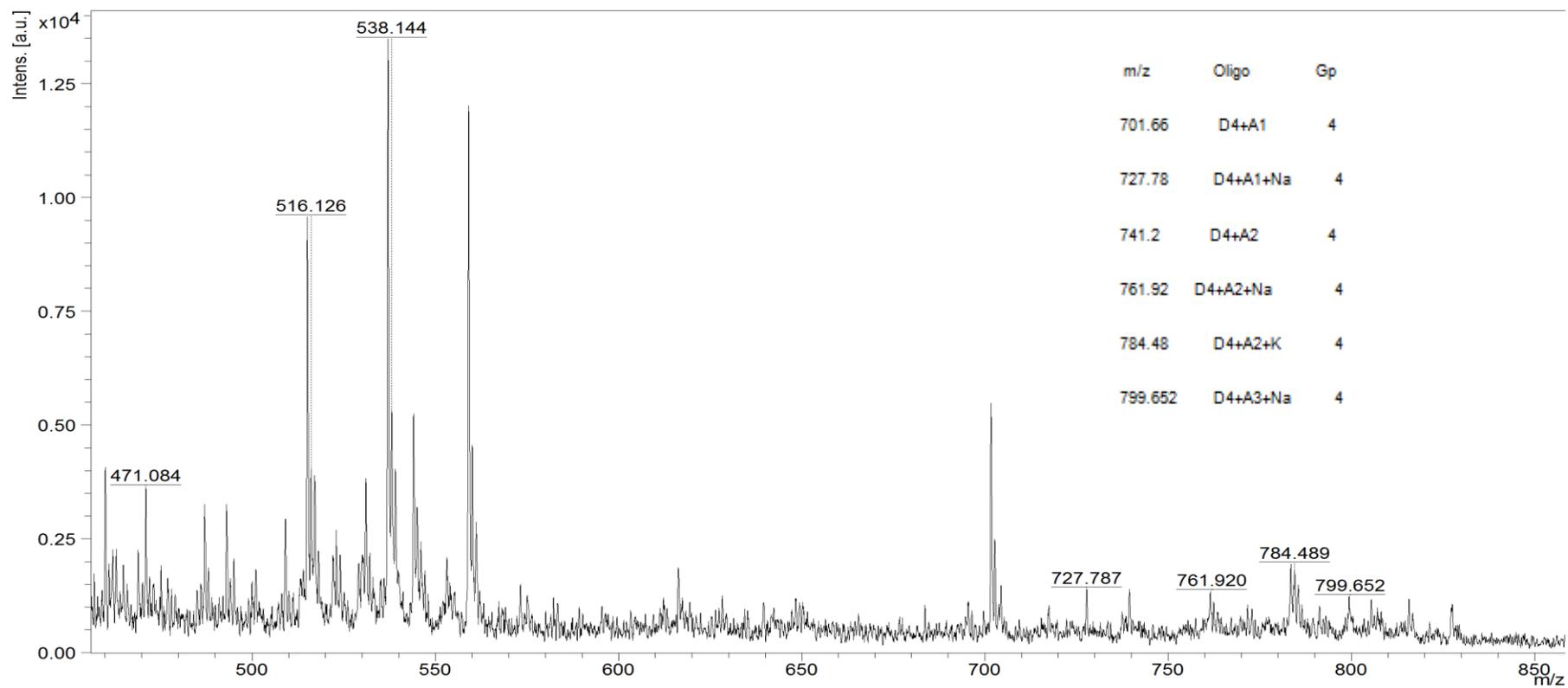


Figura 24. Espectro de MALDI-TOF de TGA con Nhasa parcialmente purificada, pH 7.

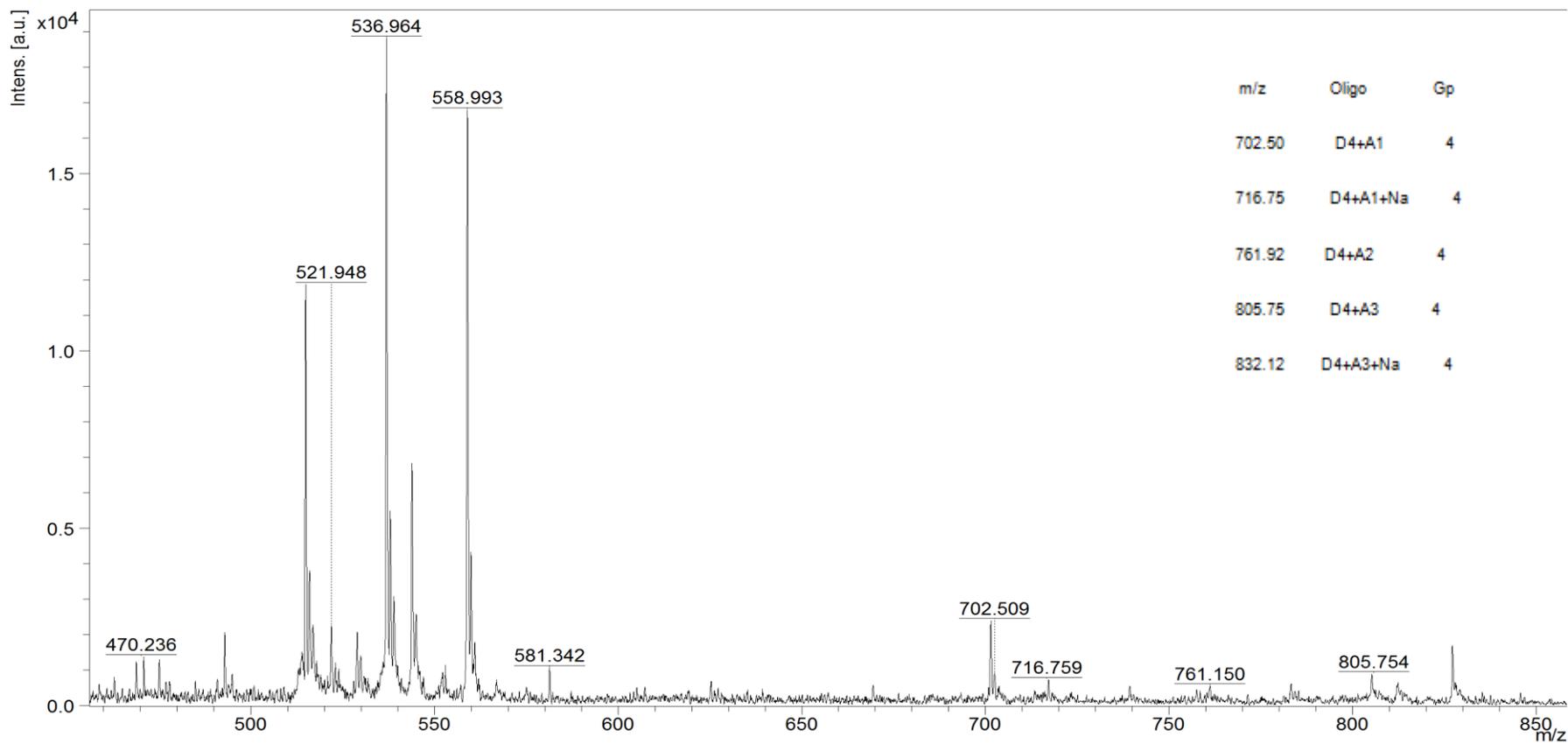


Figura 25. Espectro de MALDI-TOF de TGA con enzima del precipitado con sulfato de amonio pH 7.

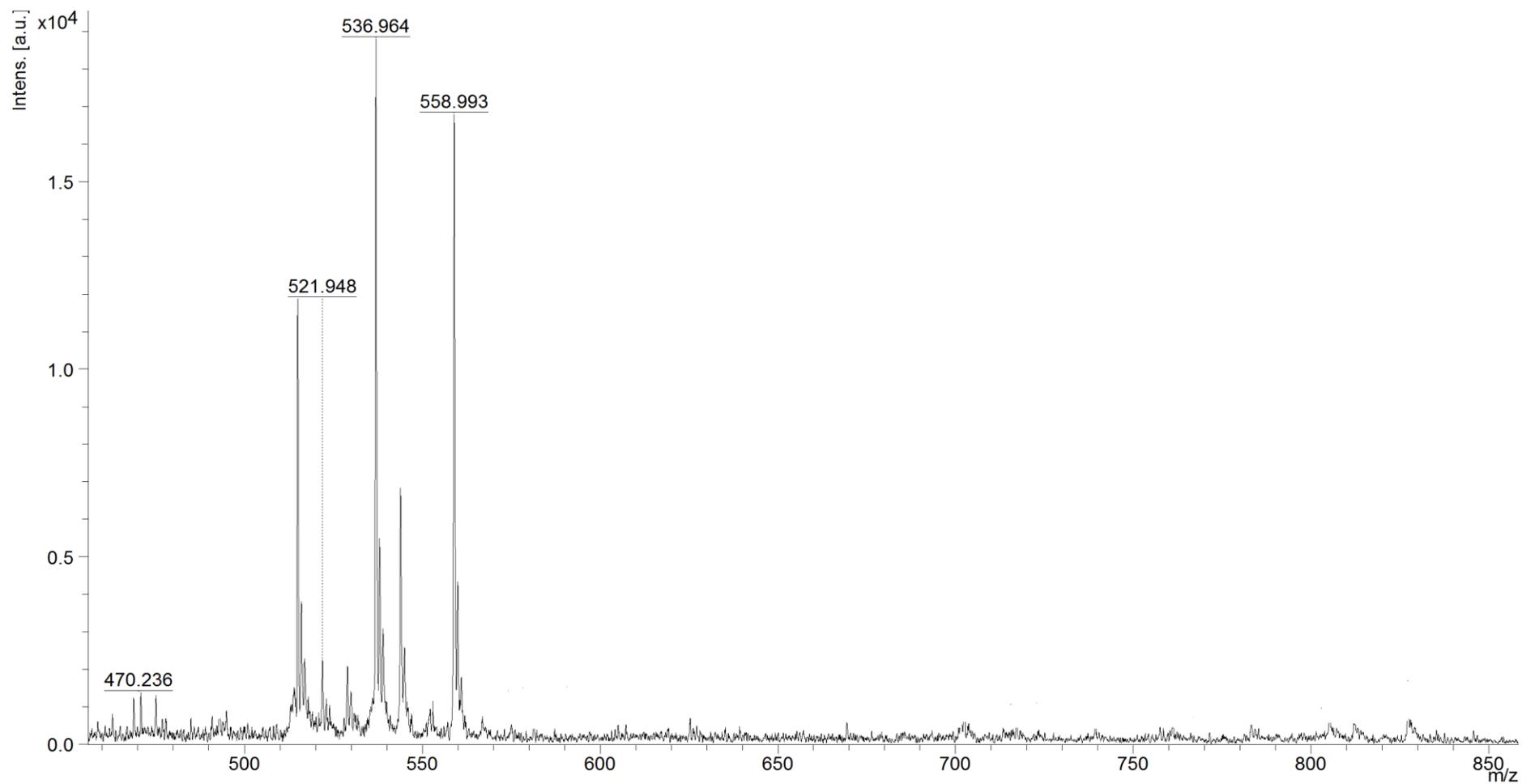


Figura 26. Espectro de MALDI-TOF de TGA con Nhasa parcialmente purificada, pH 8.5.

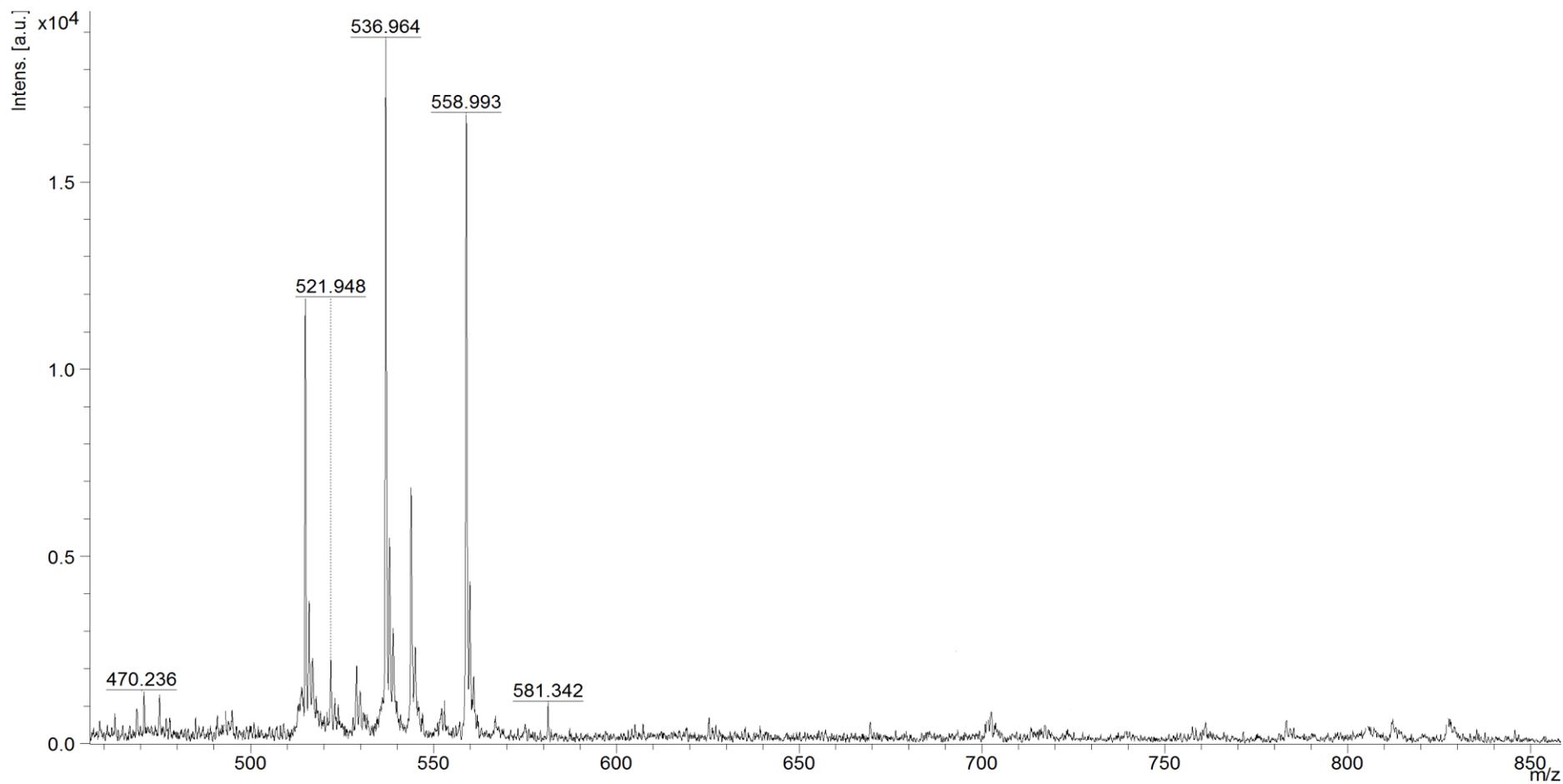


Figura 27. Espectro de MALDI-TOF de TGA con enzima del precipitado con sulfato de amonio pH 8.5.

12. Conclusiones

La Nhasa obtenida de *L. lecanii* presentó TGA, siendo a pH 7 la mejor condición para que la enzima polimerice los sustratos.

La mejor fuente de carbono fue la quitina con 10% de proteína ya que con este sustrato se obtuvo la mayor producción de enzima Nhasa la cual es esencial para llevar a cabo reacciones de transglicosilación.

Se logró la purificación parcial de la enzima Nhasa utilizando precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones obtenidas de exclusión molecular inyectadas de manera individual en una cromatografía de intercambio aniónico facilitó la purificación de la enzima Nhasa.

La TGA utilizando la Nhasa purificada presentó una mayor intensidad del pico del tetrámero a diferencia de cuando se utilizó el precipitado enzimático.

13. Perspectivas

En este trabajo se comprobó que una quitinasa parcialmente purificada de *L. lecanii* presenta actividad de transglicosilación, para estudios posteriores se podría aislar y estudiar más a fondo su mecanismo de reacción, determinando parámetros cinéticos y probar otros sustratos donadores para la actividad de TGA.

Se propone purificar otras enzimas de *L. lecanii*, como Endo, para estudiar si éstas también presentan actividad de transglicosilación.

Se probaría la actividad de transglicosilación variando los tiempos de reacción, caracterizando las enzimas purificadas en cuanto a pH y temperatura óptimas para obtener oligómeros con un grado de polimerización mayor a lo obtenido en el presente trabajo.

14. Bibliografía

- Andrangi S, FaramarziMA, Shahverdi AR, Sepehrizadeh Z. **“Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*”**. Carbohydr Res 2010;345: 402–7.
- Banat .B., Kameyama Y., Yoshioka T., Koga D. **“Purification and characterization of a 54 kDa chitinase from *Bombyx mori*”** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (1999) 537–547
- Bradford M. 1976. **“A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”**. Analytical Biochemistry., 72: 248-254.
- Carrasco-Navarro U., Gonzalez-Marquez H., Shirai K. **“Producción y purificación de β -N-acetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano”**. Universidad Autónoma Metropolitana (tesis de maestría) (2011).
- Faramarzi M., Adrangi S. **“From bacteria to human: A journey into the world of chitinases”**, Biotechnology Advances 31(2013) 1786–1795
-
- Gal EA. **“Separation and identification of monosaccharides from biological materials by thin-layer chromatography”**. Analytical Biochemistry 24, 452-461 (1968)
- Goettel, M. **“Potential of *Lecanicillium spp.* For management of insects, nematodes and plant diseases”** Journal of Invertebrate Pathology 98 (2008) 256–261

-
- Guo Y, Yan Q, Yang Y, Yang S, Liu Y, Jiang Z. **“Expression and characterization of a novel b-glucosidase, with transglycosylation and exo-b-1,3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*”** Food Chemistry 175 (2015) 431–438
 - Hamaguchi T., Ito T., Inoue Y., Limpaseni T., Pongsawasdi P. **“Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*”** Glycobiology, vol. 20 no. 4 pp. 420–432, 2010
 - He H , Qin Y , Chen G, Li N, Liang Z. **“ Two-Step Purification of a Novel β -Glucosidase with High Transglycosylation Activity and Another Hypothetical β -Glucosidase in *Aspergillus oryzae* HML366 and Enzymatic Characterization”** Appl Biochem Biotechnol (2013) 169:870–884
 - Henrissat B and Davies G. **“Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases”** Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:637-644
 - Kadowaki S, Saskiawan I, Watanabe J, Yamamoto K, Bunno M, Kumagai H. **“Transglycosylation activity of *B-N*-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicurn* and Its Application to Synthesis of a Drug Carrier”** Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 83, No. 4, 341-345. 1997
 - Kumar A, Rao M. **“A novel bifunctional peptidic aspartic protease inhibitor inhibits chitinase A from *Serratia marcescens*: Kinetic analysis of inhibition and binding affinity”**. Biochimica et Biophysica Acta 1800 (2010) 526–536

-
- Li, C., Wei H., Lai Xi W., “**Chemoenzymatic synthesis of *N*- linked neoglycoproteins through a chitinase catalyzed transglycosylation**”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 8366-8372
 -
 - Lu Tong, Yong-mei Xia “**Transglycosylation specificity of glycosyl donors in transglycosylation of stevioside catalysed by cyclodextrin glucanotransferase.**” *Food Chemistry* 159 (2014) 151–156
 - Matsumoto Y., Saucedo G., Revah. S., Shirai.K. “**Production of β -*N*-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer**” *Process Biochemistry* 39 (2004) 665-671
 - Michinari K., Kobayashi A., and Shin-ichiro S., “**Design and Utilization of Chitinases with Low Hydrolytic Activities**” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol.19 No.107 (May 2007) pp.165–180
 - Ochiai H, Huang W, Wang L. “**Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase-catalyzed polymerization of B-Glcp-(1-4)-GlcPNAc oxazoline: a revisit to enzymatic transglycosylation**” *Carbohydrate Research* 344 (2009) 592–598
 - Patil, R. Ghormade V, Deshpande M. “**Chitinolytic enzymes: an exploration**” *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000) 473–483
 - Pennec A., Daniellou R., Loyer P., Chauvin N., Ferrieres V. “**Araf51 with improved transglycosylation activities: one engineered biocatalyst for one specific acceptor**” *Carbohydrate Research* 402 (2015) 50–55

-
- Purushotham P., Sarma PVSRN., and Podile AR. . **“Multiple chitinases of an endophytic *Serratia proteamaculans* 568 generate chitin oligomers”** *Bioresource Technology* 112 (2012) 261–269
 - Purushotham P. and Podile A. **“Synthesis of Long-Chain Chitooligosaccharides by a Hypertransglycosylating Processive Endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568”** *J. Bacteriol.* 2012, 194(16):4260. DOI: 10.1128/JB.06473-11
 - Ramirez-Couiño L., Marin-Cervantes M., Huerta S., Revah Sergio, Shirai K. **“Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases”**, *Process Biochemistry* 41 (2006) 1106-1110
 - Ramirez-Coutiño L., Espinosa-Marquez J., Peter M., Shirai K., **“The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures”**, *Bioresearch Technology* 101 (2009) 9236-9240
 - Rocha-Pino Z., Marín-Cervantes M., Martínez-Archundia M., Soriano-Blancas E., Revah S., Shirai K. **“Morphological changes, chitinolytic enzymes and hydrophobin like proteins as responses of *Lecanicillium lecanii* during growth with hydrocarbon”** *Bioprocess Biosyst Eng* (2011) 36:531–539
 - Scigelova M, Crout D. 1999. **“Microbial β -N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications”**. *Enzyme and Microbial Technology.* 25: 3-14
 - Seidl V. **“Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions”** *fungus biology reviews* 22 (2008) 36–42

-
- St. Leyer R., Joshi L.,” **Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae***”. Applied Environmental Microbiology (1998) 64(2) : 709-713
 - Szukalska A, Wanarska M. “**A novel cold-active β -d-galactosidase with transglycosylation activity from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32cB – Gene cloning, purification and characterization**” Process Biochemistry Volume 49, Issue 12, December 2014, Pages 2122–2133
 - Taira t, Fujiwara M, Denhart N, Hayashi H, Onaga S, Ohnuma T, Letzel T, Sakuda S, Fukamizo T. “**Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas 54evolute*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS**” Biochimica et Biophysica Acta 1804 (2010) 668–675
 - Taylor G, Jabaji-hare S, Charest P. M, Wajahatullah K. 2002. “**Purification and characterization of an extracellular exochitinase, β -N- 62 acetylhexosaminidase, from the fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans***”. Canadian Journal of Microbiology. 48: 311-319.
 - Tronsmo A., Hjelrord L., Klemsdal S. S., Varum K. M. Nordtveit H. R y Harman G. E. Chitin Enzymology (1996) 2: 235-244
 - Umemoto N., Ohnuma T., Mizuhara M., Sato H., Skriver K., and Fukamizo T. “**Introduction of a tryptophan side chain into subsite +1 enhances transglycosylation activity of a GH-18 chitinase from *Arabidopsis thaliana*, AtChiC**” Glycobiology vol. 23 no. 1 pp. 81–90, 2013
 - Villa-Lerma G., Gonzalez-Marquez H., Gimeno M., Lopez-Luna A., Barzana E., Shirai K “**Ultrasonication and steam-explosion an chitin**

pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*", Bioresearch Technology 140 (2013) 794-798.

- Wang S, Ye X, Chen J, Rao P. **"A novel chitinase isolated from Vicia faba and its antifungal activity"** Food Research International 45 (2012) 116–122
- Yoon J. **"Enzymatic synthesis of chitooligosaccharides in organic cosolvents"** Enzyme and Microbial Technology 37 (2005) 663–668
- Zakariassen H, Klemetsen L, Sakuda S, Vaaje-Kolstad G, VårumKM, Sørli M, et al. **"Effect of enzyme processivity on the efficacy of a competitive chitinase inhibitor"**. Carbohydr Polym 2010; 82:779–85.

15. Anexos

15.1 Curva de *p*-nitrofenol para determinación de actividad Nhasa

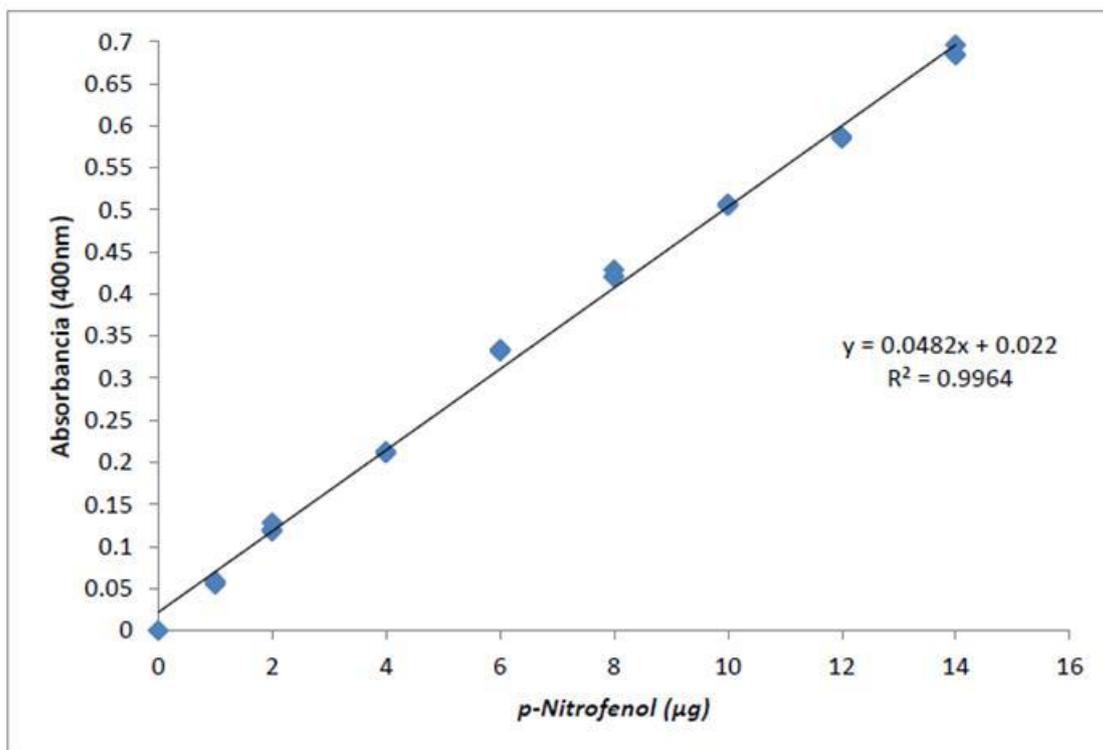


Figura 28. Curva patrón de *p*-nitrofenol para la determinación de Nhasas (Tronsmo y Harman, 1993).

15.2 Metodología para determinación de proteína por Lowry - Peterson y curva patrón de seroalbumina

Reactivo A

A) Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio: Se disolvieron 25 g de carbonato de sodio, 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 g de tartrato de sodio y potasio en 250 ml de agua destilada.

B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): 25g de SDS fueron disueltos en 250 ml de agua destilada.

C) Solución de hidróxido de sodio: Se disolvieron 8g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

Se mezclan las soluciones A, B y C aforándose con agua destilada a 1L.

Reactivo B

Se diluyeron 1:1 el reactivo fenol Folin-Ciocalteu con agua destilada, este debe prepararse en el momento del análisis.

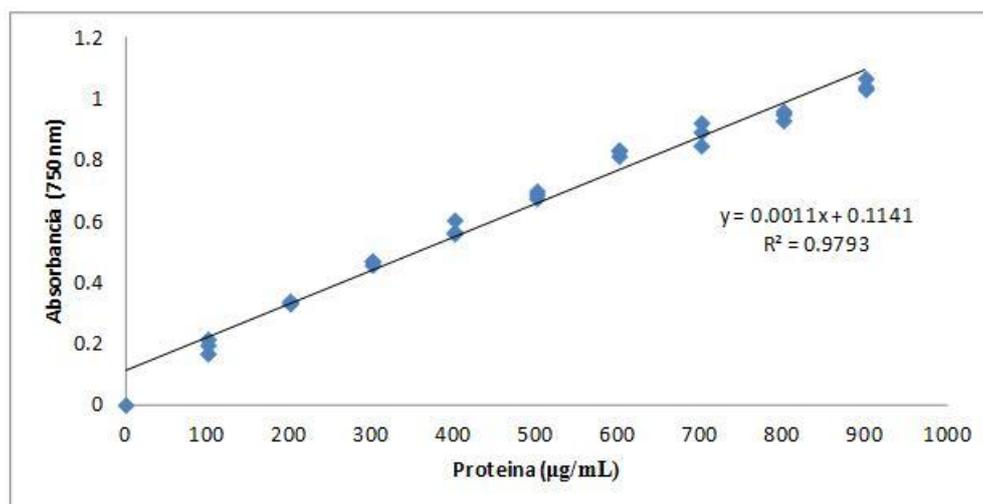


Figura 29. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry-Peterson (Peterson, 1977).

15.3 Curva patrón para determinación de proteína por Bradford

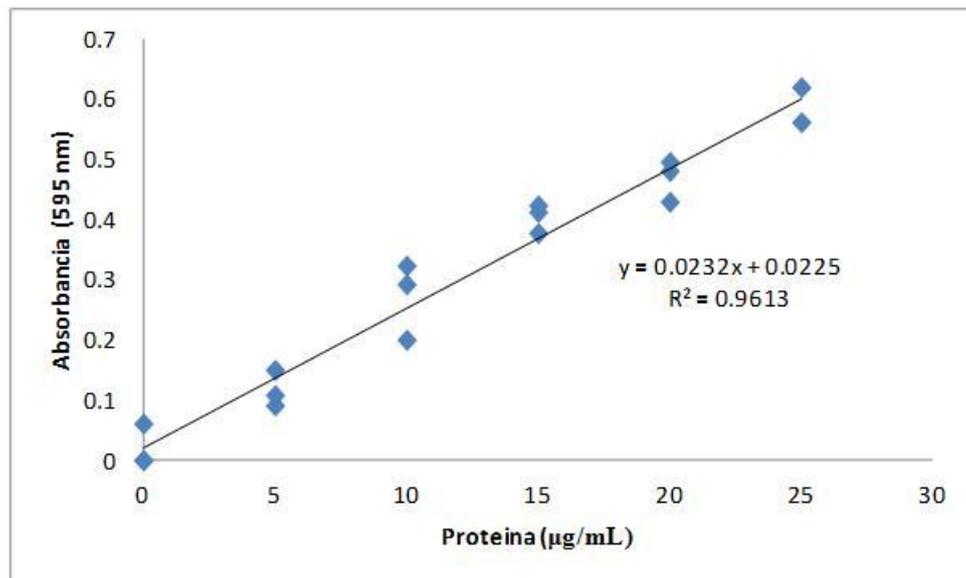


Figura 30. Curva patrón para la determinación de proteína por microensayo (Bradford, 1976).

15.4 Base de datos para identificación por MALDI-TOF de oligómeros obtenidos enzimáticamente.

Incrementos:					
Na:	22.9898	GlcN:	161.0688	H ₂ O	18.01056471
Ac:	42.0106	GlcNAc:	203.0794		
K:	39.0983	K-Na:	16.1085		

Oligomer	M	M+Na	plus 1 Ac	plus 2 Ac	plus 3 Ac	plus 4 Ac	plus 5 Ac	plus 6 Ac	plus 7 Ac	plus 8 Ac	plus 9 Ac	plus 10 Ac
GlcN	179.08	202.0698	244.0804									
GlcN2	340.15	363.1398	405.1504	447.161								
GlcN3	501.22	524.2098	566.2204	608.231	650.2416							
GlcN4	662.28	685.2698	727.2804	769.291	811.3016	853.3122						
GlcN5	823.35	846.3398	888.3504	930.361	972.3716	1014.3822	1056.3928					
GlcN6	984.42	1007.4098	1049.4204	1091.431	1133.4416	1175.4522	1217.4628	1259.4734				
GlcN7	1145.49	1168.4798	1210.4904	1252.501	1294.5116	1336.5222	1378.5328	1420.5434	1462.554			
GlcN8	1306.56	1329.5498	1371.5604	1413.571	1455.5816	1497.5922	1539.6028	1581.6134	1623.624	1665.6346		
GlcN9	1467.64	1490.6298	1532.6404	1574.651	1616.6616	1658.6722	1700.6828	1742.6934	1784.704	1826.7146	1868.7252	
GlcN10	1628.69	1651.6798	1693.6904	1735.701	1777.7116	1819.7222	1861.7328	1903.7434	1945.754	1987.7646	2029.7752	2071.7858