



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

LA QUITINA DESACETILASA DE
Bacillus thuringiensis CEPA Bt-132

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

QUIMICOBIOLOGICAS

P R E S E N T A :

I.B.Q. FABIOLA ISABEL GARCÍA JACOME

DIRECTORES DE TESIS:

DR. RAMÓN CRUZ CAMARILLO

DRA. LUZ IRENE ROJAS AVELIZAPA



MÉXICO, D.F. 14 DE DICIEMBRE DEL 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 10:00 horas del día 30 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

La quitina desacetilasa de *Bacillus thuringiensis* cepa Bt-132

Presentada por el alumno:

García
Apellido paterno

Jacome
Apellido materno

Fabiola Isabel
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	0	1	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Ramón Cruz Camarillo

Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

Dr. En Tao Wang Hu

Dra. Deifilia Ahuatzi Chacón

Dra. Nora Ruiz Ordaz

Dr. Cuthberto Jose Juvenio Galindez Mayer

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López



S.E.P.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 6 del mes diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Fabiola Isabel García Jacome alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B091018, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Ramón Cruz Camarillo y la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa ceden los derechos del trabajo intitulado La quitina desacetilasa de *Bacillus thuringiensis* cepa Bt-132, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección cruzcamarillo2003@yahoo.com.mx y luzirenemx@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Fabiola Isabel García Jacome

Dr. Ramón Cruz Camarillo

Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Enzimas Microbianas, del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Ramón Cruz Camarillo y la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa.

La investigación contó con apoyo económico de la Secretaría de Posgrado e Investigación del IPN, a través de los proyectos:

SIP 20101500. "El sistema aminolítico de *Bacillusthuringiensis*".

SIP 20111010. Función biológica y características bioquímicas de la quitina desacetilasa de *Bacillusthuringiensis*".

AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto Politécnico Nacional (IPN)** y a la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB)**, por permitirme continuar con mi desarrollo académico, y por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo la investigación presente, y poder así concluir satisfactoriamente mis estudios de maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme otorgado una beca para estudios de posgrado, durante el período agosto 2009 a julio 2011.

Al **Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)** del Instituto Politécnico Nacional por otorgarme una beca durante el período agosto 2009 a julio 2011.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Cruz Camarillo por haberme permitido trabajar en el laboratorio que se encuentra bajo su cargo para desarrollar la presente investigación; así como por su asesoría que fue relevante para concluir este proyecto.

A la Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa por las sugerencias, conocimientos y apoyo que fueron importantes para el desarrollo y conclusión de la presente investigación.

Al Dr. Antonio Ventura Suárez por su amistad, sugerencias y conocimientos de aspecto teórico-práctico, los cuales fueron de ayuda para el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Marlenne Gómez Ramírez por las sugerencias y conocimientos brindados durante mi estancia en el laboratorio.

Al comité tutorial, designado para evaluar el presente trabajo, Dra. Deifilia Ahuatzi Chacón, Dra. Nora Ruíz Ordaz, Dr. En Tao Wang Hu, Dr. Juvencio Galíndez Mayer y Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa, por las sugerencias, conocimientos y tiempo brindados, para la revisión de los avances, y del documento final de la presente investigación.

A mis compañeros de laboratorio, QBP. Imelda Guerrero Coronilla, M. en C. Salvador Embarcadero Jiménez, M. en C. Darío Rafael Olicón Hernández y al Sr. José Antonio Gaytán García, por su amistad, conocimientos y compañerismo durante mi estancia en el laboratorio. Sobre todo a mi compañera y amiga IBQ. Brenda Román Ponce, por los momentos en los que necesité de un apoyo incondicional, gracias.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir, darme una familia, superarme en todos los aspectos importantes para mí y, permitir que algunas personas aparezcan y otras permanezcan en mi vida.

A mi mamá, Dula Jácome Munguia, por sus cuidados, consejos, apoyo y ánimos, que sin ellos me hubiese sido difícil tomar decisiones importantes en mi vida.

A mis hermanos, Elizabeth y Bladimir, que siempre me han apoyado emocionalmente siendo una pieza importante en mi vida, los quiero mucho a pesar de todas las cosas que hemos pasado.

A mi papá, Pablo García Hernández por todos sus consejos, porque me preparó para cuando él no estuviera conmigo, gracias a tales consejos y regaños he podido ser mejor persona. Así como todo el apoyo económico que me brindó en su momento para poder superarme académicamente, recuerda que te quiero mucho y siempre he querido lo mejor para ti, aunque hayas decidido tomar otro camino sin nosotros.

A mi abue, Tomasa Munguia Aguilar porque siempre me ha apoyado y dado consejos sin juzgarme, pero sobre todo por confiar en mí, TQMM abue.

A mi novio, Arturo Lamas Moreno por apoyarme en todo momento y darme ánimos cuando las cosas parecían no tener solución, gracias porque sin tí hubiese sido más difícil superarlo, TE AMO.

A mis suegros por su cariño y apoyo incondicional que fueron importantes para concluir la maestría y tomar algunas decisiones.

A mis amigas que siempre han estado conmigo a pesar del tiempo y la distancia; por haber creído en mí y me han apoyado en momentos difíciles, las quiero mucho Miriam Llanos Zetina, Sandra Muñoz Rosales, Kriscia Suárez Barrios y Elena Hernández López.

A mis compañeras de apartamento Paola Cabrera Antonio y Diana Hernández Carpio, por su apoyo y compañía, gracias por todo; las quiero.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura química de la quitina y la quitosana	1
1.2. Propiedades generales y usos prácticos de la quitina y la quitosana	3
1.3. Función biológica de las quitinasas y quitosanasas	4
1.4. Microorganismos con actividad quitinolítica y quitosanolítica	5
1.5. Biodegradación de quitina y quitosana	6
1.6. La quitina desacetilasa (QDA). Propiedades y aplicaciones	8
1.7. Distribución biológica de las quitinas desacetilasas	10
1.8. Propiedades de la quitina desacetilasa	11
1.9. Función biológica de las QDAs	13
1.10. Aplicaciones de la QDA	14
1.11. La QDA (o polisacárido desacetilasa) de <i>B. thuringiensis</i>	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GENERAL	18
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	18
3. METAS	19
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Medios de cultivo	22
5.2. Preparación de sustratos enzimáticos especiales	23
5.2.1. Preparación de quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada	23
5.2.2. Preparación de quitosana coloidal	24
5.2.3. Preparación del sustrato de glicol-quitina	24
5.3. Determinación de la quitina desacetilasa (QDA)	25
5.4. Liberación de la QDA	26
5.5. Caracterización de la QDA cruda y purificada	27
5.5.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática	27
5.5.2. Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática	27
5.5.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la QDA	27
5.5.4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática	28
5.5.5. Efecto de reactivos tiol-específicos sobre la actividad enzimática	28
5.5.6. Efecto del EDTA	28
5.5.7. Requerimientos iónicos	28
5.5.8. Inactivación de la enzima por agentes desnaturizantes	29
5.6. Concentración y fraccionamiento de la QDA con sulfato de amonio	29
5.7. Purificación de la quitina desacetilasa	30
5.7.1. Concentración por liofilización de la quitina desacetilasa	31

5.7.2. Fraccionamiento en columna de fenil sefarosa CL-4B	31
5.7.3. Cromatografía de filtración en gel	32
5.7.3.1. Fraccionamiento y desalación en columna de Sephadex G-25	32
5.7.3.2. Fraccionamiento y desalación en columna de Sephadex G-75	33
5.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1. Posible participación de la QDA en la utilización microbiana de la quitina	35
6.2. Especificidad de la QDA	38
6.3. Ensayos tamiz (screening) para identificar microorganismos productores de QDA	41
6.4. Instauración de una técnica cuantitativa para evaluar la QDA	42
6.5. Ubicación celular de la QDA	45
6.6. Regulación de la síntesis de la QDA	47
6.7. Liberación de la quitina desacetilasa	52
6.8. Caracterización parcial de la QDA a nivel de extracto crudo	56
6.9. Purificación de la quitina desacetilasa	60
6.9.1. Concentración de la quitina desacetilasa	61
6.9.2. Fraccionamiento de la QDA (rutas 1,2 y 3)	62
6.9.3. Concentración y fraccionamiento de la QDA (ruta 4)	66
6.10. Caracterización comparativa de la QDA pura con la presente en el extracto crudo	72
7. CONCLUSIONES	75
8. BIBLIOGRAFIA	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación estructural de la quitina con la quitosana y la celulosa.	2
Figura 2. Modelo general de la degradación enzimática de la quitina, hasta N-acetil-D-glucosamina (NAG).	7
Figura 3. Reacción química catalizada por la quitina desacetilasa.	8
Figura 4. Diagrama de flujo de producción y purificación de la QDA	30
Figura 5. Comparación de <i>B. thuringiensis</i> Bt-132 y <i>S. marcencens</i> Nima inoculados por picadura en un medio sólido con quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada.	35
Figura 6. Evaluación en placa de la desacetilación enzimática de sustancias xenobióticas acetiladas, adicionadas como únicas fuentes de carbono a un medio sintético, con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.	39
Figura 7. Curva tipo de glucosamina obtenida de cuatro series de datos (arriba).	42
Figura 8. Actividad de QDA en las fracciones soluble e insoluble, recuperadas después de centrifugar cultivos autolisados de Bt-132, obtenidos de diferentes medios de cultivo.	46
Figura 9. Regulación por glucosa de la síntesis de QDA.	48
Figura 10. Curvas de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> cepa Bt-132 en medios formulados con caldo nutritivo adicionado con diferentes monosacáridos.	49
Figura 11. Actividad de la QDA presente en las células cultivadas en caldo nutritivo sólo o adicionado de diferentes monosacáridos.	49
Figura 12. Cinéticas de crecimiento de Bt-132 en caldo nutritivo adicionado de NAG o glucosamina ambos al 1 % así como el consumo de dichos monosacáridos .	50
Figura 13. Estabilidad de la QDA de Bt-132 al conservarla a temperaturas de refrigeración (5°C) y congelación (-15 °C).	59
Figura 14. Alternativas utilizadas para realizar la purificación de la QDA de Bt-132.	60
Figura 15. Perfil de elución de la QDA durante su fraccionamiento con fenil-sefarosa CL-4B.	63
Figura 16. Electroferograma utilizando la tinción con nitrato de plata.	63
Figura 17. Perfil de elución de la QDA en una columna empacada con Sephadex G-75.	64
Figura 18. Electroferograma SDS-PAGE, teñido con nitrato de plata.	64
Figura 19. Fraccionamiento de la QDA de Bt-132 en una columna de Sephadex G-25.	65

Figura 20. Electroferograma SDS-PAGE con tinción de plata.	65
Figura 21. Diagrama del proceso de fraccionamiento de la QDA de Bt-132 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	66
Figura 22. Perfil de elución en una columna de Sephadex G-25.	67
Figura 23. Electroferograma SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata del fraccionamiento en columna con Sephadex G-25.	67
Figura 24. Curva de calibración para el cálculo del peso molecular de la proteína en estudio, mediante PAGE-SDS.	69
Figura 25. Procesos de purificación de algunas QDAs de origen microbiano.	71
Figura 26. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la QDA de Bt-132.	72
Figura 27. Efecto del pH sobre la actividad de la QDA de <i>B. thuringiensis</i> Bt-132.	73
Figura 28. Efecto de sustancias quelantes (EDTA) sobre la actividad de la QDA.	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Usos prácticos de la quitina y quitosana	4
Tabla 2. Comparación de las propiedades de las quitina desacetilasas de <i>Mucor rouxii</i> y de <i>Colletotricum lindemuthianum</i> según Farag Ibrahim, 1999.	9
Tabla 3. Microorganismos productores de quitina desacetilasa.	11
Tabla 4. Características de las columnas empacadas con Sephadex G-25.	32
Tabla 5. Datos de liberación y solubilización de la QDA mediante autólisis celular.	54
Tabla 6. Liberación y solubilización de la QDA de <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt-132.	55
Tabla 7. Caracterización parcial de la QDA a nivel extracto crudo.	57
Tabla 8. Movilidad electroforética relativa de seis proteínas de peso molecular conocido y de la QDA de Bt-132.	68
Tabla 9. Marcha de la purificación de la QDA de <i>B. thuringiensis</i> cepa Bt-132.	69
Tabla 10. Incremento porcentual de la actividad de la QDA previamente inactivada con EDTA, por adición de distintas sales.	74

RESUMEN

La cepa *B. thuringiensis* Bt-132 produce una desacetilasa periplásmica e inespecífica, la cual desacetila sustancias tan distintas como glicol-quitina, EDTA, acetato de uranilo, p-nitrofenilacetato y ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético. Es posible entonces que la cepa pueda desacetilar sustancias xenobióticas. Esta enzima se sintetiza constitutivamente. En este trabajo se investigó la actividad de esta quitina desacetilasa (QDA), usando glicol-quitina como sustrato. Para su purificación y caracterización se produjo primero en caldo nutritivo. Su extracción y solubilización, se llevó a cabo lisando células colectadas en la parte media de la fase logarítmica de crecimiento, mediante ruptura mecánica con diversos abrasivos, aplicando agitación vigorosa, fricción, presión o sonicación. Sin embargo, los mejores rendimientos se obtuvieron al autolisar las células en condiciones de agitación (280 rpm), a 28 °C durante 96 h. Los autolisados clarificados y libres de células se concentraron por liofilización, luego se fraccionó por cromatografía de hidrofobicidad en una columna de fenil sefarosa CL 4B, eluyendo en un gradiente decreciente y discontinuo de sulfato de amonio. La enzima eluyó rápidamente, mostrando ser poco hidrofóbica. Para una posterior purificación y eliminación del sulfato de amonio proveniente del paso anterior, se realizó una cromatografía en gel utilizando una columna de sephadex G-25. De este modo se logró purificar la QDA hasta homogeneidad molecular, comprobada ésta mediante PAGE-SDS usando la tinción con nitrato de plata. Mediante este proceso la enzima se purificó 33 veces, con un rendimiento de 11 %, valores que son satisfactorios si se comparan con los reportados por otros autores. La enzima pura mostró un peso molecular de 60.2 kDa, y se inactivó rápidamente al dializarla contra EDTA, indicando ser una metaloenzima. Ya inactivada con EDTA, la QDA se reactivó al adicionarle sales de metales divalentes como ZnCl₂, CaCl₂, MgCl₂ y CoCl₂. La recuperación fue más notoria con el ión Zn⁺⁺, como ha sido reportado en otras QDA. La máxima estabilidad y mayor actividad de la enzima ocurrió a pH 4.5, y aunque su termoestabilidad es alta, la temperatura óptima de reacción se observó a 40 °C, valor más bajo que los reportados, los cuales oscilan entre 50-60 °C. Las QDAs estudiadas hasta ahora han sido de origen fúngico, de lavaduras y de unas pocas bacterias. Este es el primer reporte concerniente a la purificación y caracterización de la QDA de *B. thuringiensis*.

ABSTRACT

Deacetylase produced by the strain of *B. thuringiensis* Bt-132 is a periplasmic non-specific enzyme hydrolyzing substances different such as glycol chitin, EDTA, uranyl acetate, p-nitro phenyl acetate and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Therefore, it may also enzyme could degrade acetylated xenobiotic compounds. This enzyme is constitutive. In order to purify and characterize the enzyme with activity of chitin deacetylase (CDA) present in the strain Bt-132, both glycol chitin and colloidal chitin previously demineralized and deproteinized were used as its substrates. The purification of the CDA was carried out, by a process starting with the collection of bacterial cells grown in nutrient broth, until de middle zone of the logarithmic phase of growth. Such cells were broken by using different abrasive materials, combined with vigorous shaking, friction, high-pressure and sonication treatments. However, the best results to release the enzyme, were obtained when the bacteria were autolyzed after an incubation for 96 h, under shaking (280 rpm) at 28 °C. The autolyzate was then clarified by centrifugation, and sterilized by filtration. The cell-free crude enzymatic extract was concentrated by lyophilization, and then dissolved in a minimal volume of one appropriate buffer. The sample obtained was at once fractionated in a hydrophobic column of sepharose CL-4B, eluting with a descending discontinuous gradient of ammonium sulphate. The enzyme eluted fastly, showing its low hydrophobicity. The collected fractions with the highest activity of CDA were pooled and lyophilized. The new sample obtained was again fractionated in a column of Sephadex G-25, in order to eliminate the ammonium sulphate derived from the previous chromatography, and also to obtain a still more purified sample of the CDA. The molecular homogeneity of the resulting CDA was electrophoretically verified by PAGE-SDS, staining the protein bands by means of the silver nitrate staining technique. The enzyme obtained was purified 33 times with a recovery of 11 %, wich are satisfactory data, with respect to published previous reports. The pure enzyme showed a molecular weight of 60.2 kDa, and it was inactivated with EDTA, being its activity restored by addition of salts as ZnCl₂, CaCl₂, MgCl₂ and CoCl₂; therefore, it may be considered as a metalloenzyme. Besides, the CDA presented its greatest stability and activity at pH 4.5. On the other hand, although its thermostability is high, the more favorable temperature for its reaction was 40 °C, a lower value compared with the temperature required (50-60°C) by other reported CDAs. This study is the first report related to the purification and characterization of the CDA from *B. thuringiensis*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura química de la quitina y la quitosana

La quitina fue aislada de las envolturas de hongos superiores por Braconnot en 1811, y la llamó “fungina”. En 1823 Odier la redescubrió en la cubierta de algunos escarabajos, denominándola quitina, del griego “χιτων” (quitún, túnica), aludiendo a su papel protector. La quitina es un material blanco, insoluble en la mayoría de los disolventes convencionales, formado por moléculas de N- acetil- glucosamina (NAG), eslabonadas por enlaces glicosídicos β 1,4. Este enlace propicia una alternancia en la orientación de los radicales N- acetilo en la cadena polimérica, por lo que el dímero de NAG (quitobiosa), resulta la unidad mínima de repetición en la molécula de quitina (Figura 1).

Por su abundancia relativa, la celulosa y la quitina son los biopolímeros más abundantes de la naturaleza, siendo recursos renovables producidos por síntesis biológica, que comparten gran semejanza tanto en su función biológica como en su estructura, sólo que la celulosa se encuentra en los vegetales y la quitina en los animales. En la Figura 1, se observa que difieren sólo en los radicales unidos al carbono 2, que es un hidroxilo en la celulosa y un grupo acetamida en la quitina. Ambos polímeros actúan como material de soporte y defensa de los organismos que los contienen.

Por otro lado, la quitosana (Figura 1) es un polisacárido lineal compuesto por dos tipos de unidades estructurales que son la NAG y la D-glucosamina, las cuales se encuentran distribuidas al azar y están unidas por enlaces glicosídicos β 1,4. Por lo tanto la quitosana es un producto natural derivado de la desacetilación química o enzimática de la quitina, desacetilación que según algunos autores varía desde 45 hasta 85%. Aunque la estructura química de ambos polisacáridos es similar, los grupos amino libres de la quitosana se protonan a pH ácido, convirtiéndola en un polication (Mitsutomi *et al.* 1990). Además, las moléculas de quitina y quitosana se asocian en haces muy compactos mediante puentes de hidrógeno inter e intracadena.

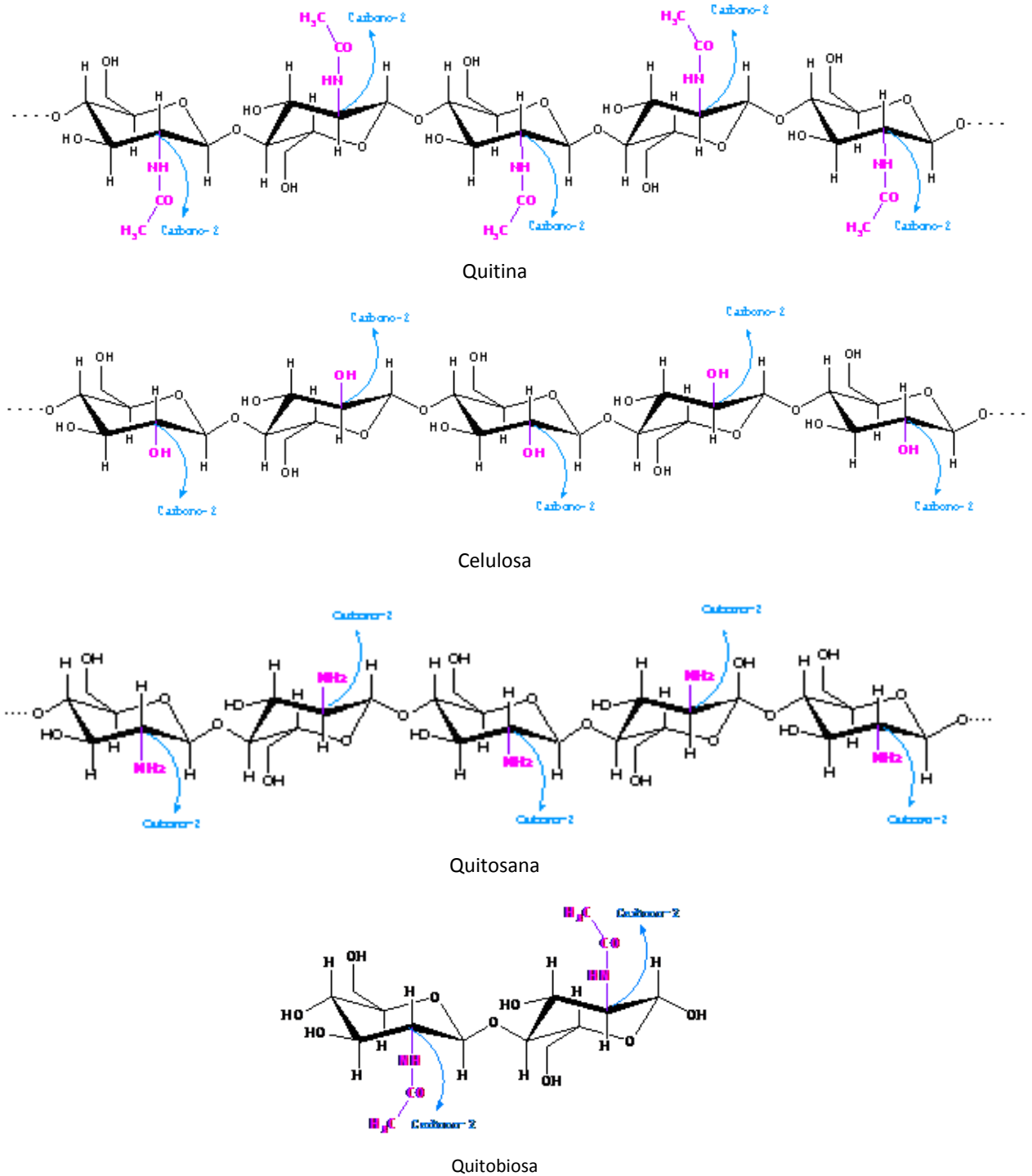


Figura 1. Relación estructural de la quitina con la quitosana y la celulosa. Puede observarse que la diferencia entre los tres polisacáridos está en los radicales unidos al carbono 2 de la hexosa. En la parte inferior se muestra la unidad estructural mínima (quitobiosia), que se repite sucesivamente en la molécula de quitina.

Los haces multi-moleculares densamente empaquetados de ambos polisacáridos, se asocian además con proteínas para formar complejos quitino-proteicos o quitosano-proteicos, diferentes según el modelo biológico estudiado, que puede ir desde la cutícula de un insecto, la pared celular de un hongo o una concha de molusco (Cruz-Camarillo & Rojas-Avelizapa 1999).

1.2. Propiedades generales y usos prácticos de la quitina y la quitosana

La quitina es un polímero insoluble en agua y en soluciones diluidas de solventes orgánicos. Cuando la quitina se solubiliza en ácidos débiles forma sales solubles en agua. La quitina se encuentra ampliamente distribuida entre los seres vivos, como el principal componente de la pared celular de muchos hongos (22-44 %); también se encuentra asociada a proteínas en invertebrados, artrópodos, crustáceos y protozoarios, donde juega un importante papel en estructuras tan variadas como exoesqueletos, conchas, quistes, huevos y cápsulas (Cody 1989).

La quitosana por su parte se encuentra principalmente en los mucorales, como componente de su pared celular. Además, es soluble en agua a pH ácido, y en estas condiciones todos sus grupos amino se protonan, por lo que el polímero se comporta como un polícatión lineal. Tanto la quitina como la quitosana tienen variadas e importantes aplicaciones, algunas de las cuales se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Usos prácticos de la quitina y quitosana.

Polímero	Campo de aplicación	Utilidad	Referencia
Quitina	Medicina	<ul style="list-style-type: none"> • Cicatrizante y anticoagulante 	Pandya & Knorr 1991
	Biología	<ul style="list-style-type: none"> • Soporte para inmovilizar enzimas • Producción de oligosacáridos 	Krajewska 2004 Tokoro <i>et al.</i> 1988
	Industria farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Excipiente y transportador de medicamentos 	Muzzarelli 1985
	Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Mejoramientos de suelos 	Gualtieri <i>et al.</i> 1988
	Industria textil y papelera	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración de telas y diferentes tipos de papel 	Chen <i>et al.</i> 2007
Quitosana	Biología	<ul style="list-style-type: none"> • Soporte para inmovilizar enzimas • Fabricación de microesferas y microcápsulas • Producción de quitina-oligosacáridos • Floculante para obtención de biomasa de microalgas marinas • Descontaminación de aguas industriales 	Krajewska 2004 Pandya & Knorr 1991 Gualtieri <i>et al.</i> 1988
	Industria farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Excipiente, liberación controlada de fármacos y reducción de los niveles de colesterol. 	Muzzarelli 1985
	Medicina	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulante del sistema inmunológico y despertador de la actividad antitumoral • Tratamientos de pérdida de peso 	Haris-Prashanth & Tharanathan 2007
	Cosmetología	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración de geles 	Haris-Prashanth & Tharanathan 2007
	Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Protección de frutos 	Haris-Prashanth & Tharanathan 2007

1.3. Función biológica de las quitinasas y las quitosanasas

Muchos organismos que tienen como constituyente a la quitina producen quitinasas; sin embargo otros que no poseen dicho polisacárido también pueden producirlas, como ocurre con gran variedad de bacterias y plantas superiores. En este contexto, se considera que el papel biológico de las quitinasas se relaciona con aspectos como los siguientes:

- a) En hongos, crustáceos e insectos, su papel principal es modificar las estructuras quitinosas, mediante fenómenos de síntesis-degradación.
- b) En las plantas, la producción de quitinasas es considerada como parte de su mecanismo de defensa contra hongos fitopatógenos (Roberts & Selitrennikoff 1988).

- c) En bacterias, hongos y otros microorganismos que pueden tener o no quitina, las quitinasas, casi siempre de naturaleza inducible y extracelular, desempeñan un papel nutricional para utilizar la quitina como una fuente de carbono.

Por otro lado, las quitosanasas son enzimas que aparentemente están involucradas en diversas funciones como pueden ser:

- a) Nutricionales, ya que la intervención de las quitosanasas permite transformar la quitosana en moléculas simples utilizables para el crecimiento de los microorganismos.
- b) Fisiológicos, permitiendo el crecimiento hifal mediante lisis-biosíntesis de la pared celular de algunos hongos.
- c) Como defensa, pues en varias especies de vegetales las quitosanasas son secretadas para protegerse de hongos fitopatógenos que poseen quitosana en su pared celular.

Al igual que las quitinasas, las quitosanasas son enzimas ampliamente distribuidas en microorganismos y plantas, que se pueden producir de manera inducida o constitutiva. Como se ha podido observar, las quitinasas y las quitosanasas tienen funciones muy similares (Fenton & Eveleigh 1981).

1.4. Microorganismos con actividad quitinolítica y quitosanolítica

Las quitinasas se han reportado principalmente en *Cellvibrio mixtus*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* y varias especies de *Streptomyces* y *Bacillus* (Trudel & Asselin 1989). Dentro del género *Bacillus*, *B. circulans* es una de las bacterias donde más se ha estudiado su sistema quitinolítico (Watanabe *et al.* 1991). En contraste, el menos estudiado ha sido probablemente *B. thuringensis*, ya que los estudios con esta bacteria se han restringido casi siempre a su actividad insecticida (Ibarra & Federici 1986). Aun cuando la información sobre las quitinasas de *B. thuringensis* es escasa, algunos de sus aspectos básicos ya han sido descritos (Gómez-Ramírez 2000; Gómez-Ramírez *et al.* 2001; Gómez-Ramírez 2006).

Un microorganismo donde se han hecho estudios amplios sobre las quitosanasas es *Mucor rouxii*, cuya pared es rica en quitosana. Otros géneros donde tales enzimas han sido

estudiadas son *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Fusarium*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Uchida & Ohtkara 1988).

1.5. Biodegradación de quitina y quitosana

La biodegradación de la quitina y la quitosana, se realiza mediante un sistema multienzimático. Por su insolubilidad, tamaño, complejidad molecular y composición, estos polisacáridos no pueden ser degradados dentro de la célula, por lo cual los microorganismos secretan enzimas hidrolíticas extracelulares con diferente especificidad. Los oligosacáridos solubles resultantes pueden ser incorporados por las células, e intracelularmente ser utilizados como fuentes de nitrógeno y/o carbono (Cruz-Camarillo & Rojas-Avelizapa 1999).

Con base en lo anterior, las enzimas quitinolíticas y su modo de acción son principalmente de cuatro tipos:

- a) Endoquitinasas, las cuales rompen al azar enlaces glicosídicos internos de la molécula de quitina, dando como productos oligosacáridos de 2-6 unidades de NAG, llamados quitodextrinas.
- b) Exo-N-diacetil-quitobiohidrolasas. Éstas separan una a una moléculas del disacárido quitobiosa, a partir del extremo no reductor de la molécula de quitina, o de aquellos oligosacáridos mayores de 3 unidades de NAG.
- c) Exo-N-acetil-glucosaminidasas, las cuales separan una a una moléculas de NAG a partir del extremo no reductor de la molécula de quitina, o de aquellos oligosacáridos mayores de 3 unidades de NAG.
- d) Quitobiasas, las cuales hidrolizan al disacárido quitobiosa, en 2 moléculas de NAG.

En la Figura 2, se muestra el modo de acción de las enzimas mencionadas. Algunos microorganismos poseen un sistema quitinolítico completo, tal es el caso de *S. marcescens*, la cual transforma extracelularmente la quitina hasta NAG.

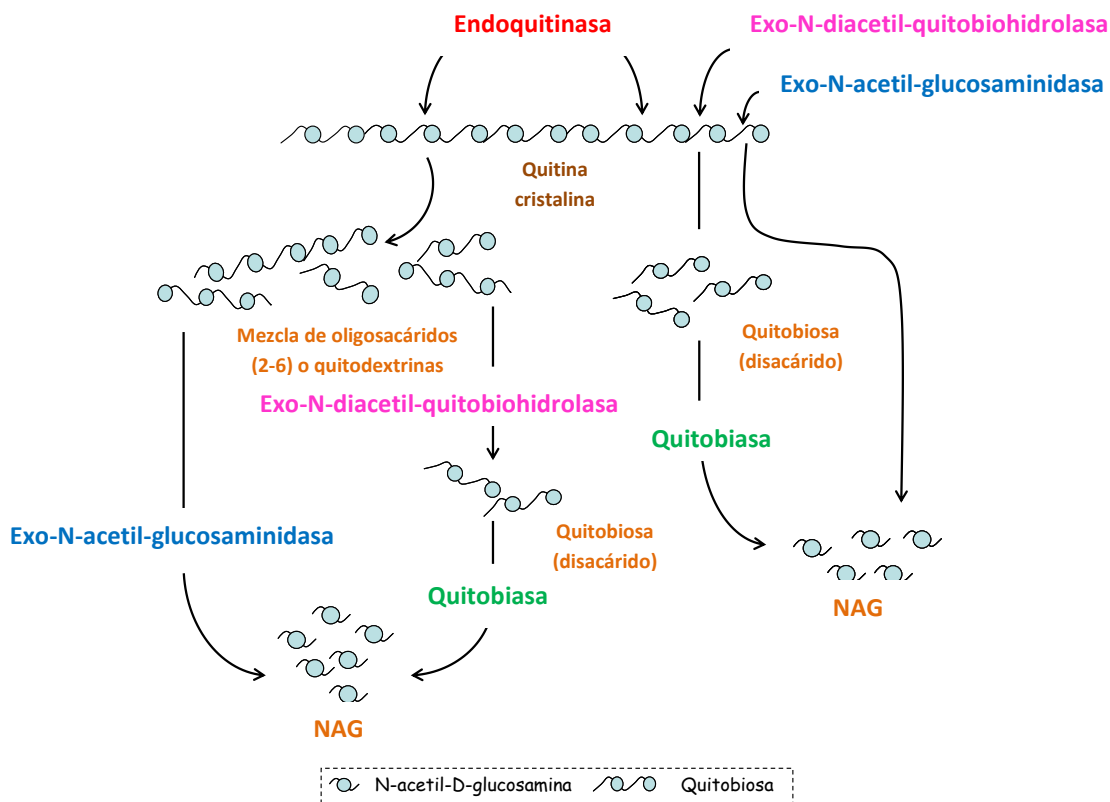


Figura 2. Modelo general de la degradación enzimática de la quitina, hasta N- acetil - D – glucosamina (NAG). Adaptado de Cruz-Camarillo y Rojas-Avelizapa 1999

Por su parte, la biodegradación de la quitosana se supone que ocurre por un conjunto de enzimas con actividades similares a las descritas para el caso de la quitina, y en consecuencia, se obtienen como productos finales una mezcla de NAG y glucosamina. La proporción de cada amino azúcar dependerá del grado de acetilación de la quitosana. Sin embargo, es probable, que los esquemas de degradación de quitina y de quitosana no sean tan iguales, pues las quitosanasas obtenidas de varias fuentes muestran diferentes patrones de acción hidrolítica, las cuales dependen del grado de polimerización y acetilación del sustrato; además, requieren de sustratos con al menos tres o más residuos de glucosamina o de NAG para la expresión de su actividad. Las quitosanasas, por otra parte, pueden actuar reconociendo o no a los acetilos para realizar el corte. También se ha encontrado que las quitosanasas son principalmente endohidrolasas que liberan predominantemente dímeros, trímeros y oligómeros mayores (Susuki *et al.* 1986).

1.6. La quitina desacetilasa (QDA). Propiedades y aplicaciones

Esta hidrolasa pertenece a la familia 4 de las Carbohidrato Esterasas (CE4) y cataliza la conversión de quitina en quitosana, mediante la desacetilación de los residuos de NAG presentes en la molécula de la primera, de acuerdo con la siguiente reacción:

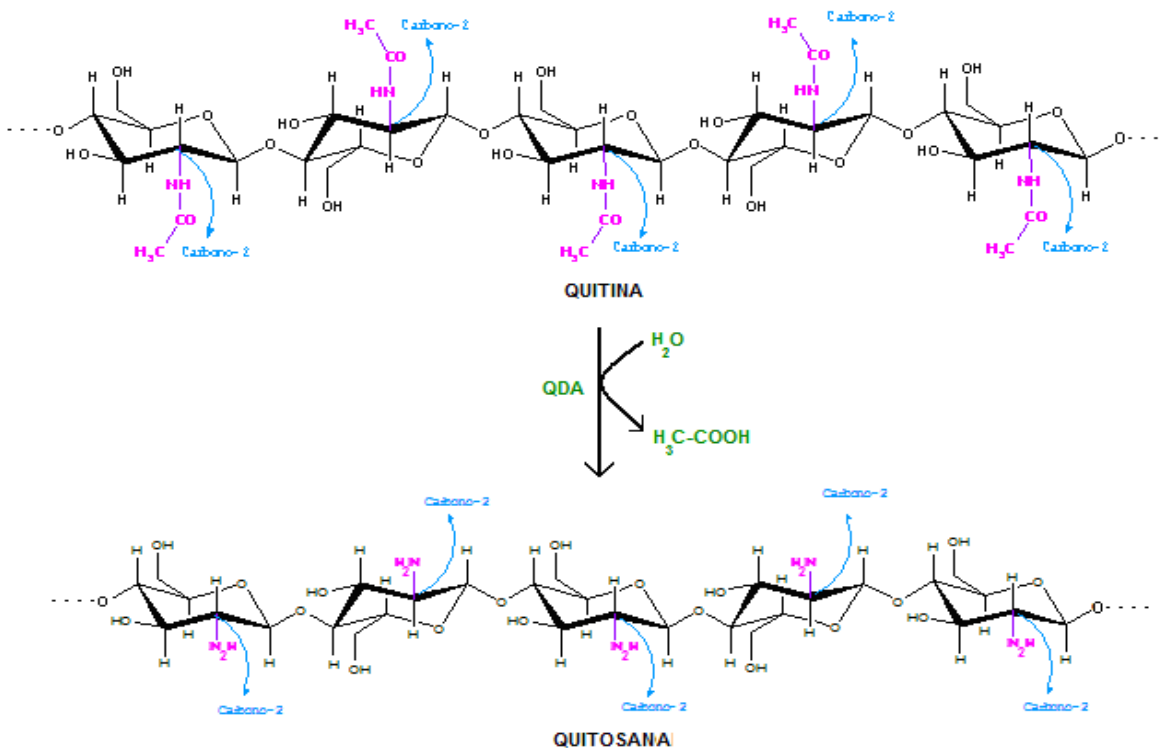


Figura 3. Reacción química catalizada por la quitina desacetilasa.

Como ya se explicó, la quitosana más que la quitina, tiene multitud de usos prácticos, de manera que ha habido interés en utilizar la QDA para convertir la quitina en quitosana, aunque con pobres resultados por la naturaleza insoluble de la quitina. Por esta razón, la obtención comercial de la quitosana se hace por desacetilación química de la quitina, usando NaOH al 50-70 % y temperaturas de 70-105 °C, por períodos de dos o más horas. Las condiciones son más drásticas conforme se desean índices de desacetilación más altos.

La QDA fue estudiada primero por Araki e Ito (1975), en lisados miceliales de *Mucor rouxii*. La enzima era constitutiva, con un pH óptimo de 5.5, aunque mostraba su actividad en un intervalo de pH entre 4 y 9, los datos podían fluctuar dependiendo del tipo de amortiguador utilizado. Desde un principio la QDA fue involucrada en la síntesis de la pared

celular de *M. rouxii*, de modo que en 1987 Calvo-Méndez y Ruiz-Herrera encontraron que tanto la quitina sintetasa como la QDA eran requeridas para la formación de quitosana en la pared celular de dicho hongo, aunque la desacetilación no ocurría cuando la quitina se encontraba ya estructurada en forma cristalina. Otros autores han encontrado evidencia de que la QDA puede desacetilar quitinas modificadas solubles, como la glicol-quitina, u oligosacáridos de NAG solubles y de bajo peso molecular (Davis & Bartniki-Garcia 1984). Esto ha permitido proponer que la QDA puede desacetilar oligosacáridos solubles, producidos por acción de endoquitinasas sobre la quitina, fenómeno que puede darse durante la autólisis de la pared celular de aquellos microorganismos con quitina en dicha estructura (Alfonso *et al.* 1995). Resulta interesante mencionar, que en estudios más recientes se ha demostrado que las QDA en general son más activas sobre oligosacáridos formados por NAG, por ejemplo la quitopentaosa, transformándola en un pentámero de glucosamina. Estos oligosacáridos parecen tener importancia como moléculas moduladoras de diferentes eventos bioquímicos (Amorim *et al.* 2005).

Cabe agregar, por otra parte, que mientras la QDA de *M. rouxii* es constitutiva y se localiza en el espacio periplásmico, la QDA de *Colletotricum lindemuthianum* es extracelular y se ha purificado a partir de filtrados libres de células (Farag Ibrahim 1999). En la Tabla 2 se hace una comparación de ambas enzimas.

Tabla 2. Comparación de las propiedades de las quitina desacetilasas de *Mucor rouxii* y de *Colletotricum lindemuthianum* según Farag Ibrahim 1999.

Propiedad	<i>Mucor rouxii</i> ^a	<i>C. Lindemuthianum</i> ^b
Localización	Micelio	Extracelular
Peso molecular (kDa)	80	31.5-33
pH óptimo	4.5	8.5-12
Temperatura óptima (°C)	50	60
Inhibición por EDTA	Si	Si
Inhibición por acetato	Si	No
Punto isoeléctrico	3.0	3.7

a = Kafetzopoulos *et al.*, 1993. b = Tokuyasu *et al.*, 1996.

Estudios respecto al modo de acción de la quitina desacetilasa de *Mucor rouxii* sobre N-acetil quitoligosacáridos con grado de polimerización 1-7, han mostrado que es importante la longitud de los oligómeros para la acción de la enzima. La enzima no es efectiva con quitino-oligómeros con grado de polimerización menor a tres. La tetra-N-acetilquitotetraosa y la penta-N-acetil quitopentaosa son totalmente desacetilados por la enzima, y en el caso de la tri-N-acetilquitotriosa, la hexa-N-acetilquitohexaosa y la hepta-N-acetilquitoheptaosa, el residuo del extremo reductor siempre permanece intacto. La enzima inicialmente remueve un grupo acetilo del extremo no reductor de todos los quitino-oligómeros con un grado de polimerización mayor a 2, continuando luego la hidrólisis de los siguientes grupos acetamidos de manera progresiva. El mismo mecanismo de acción enzimática ocurre sobre polímeros de la quitosana parcialmente desacetilados (Tsigos *et al.* 1999).

1.7. Distribución biológica de las quitinas desacetilasas

En cuanto a su distribución biológica, la QDA se ha encontrado en microorganismos que poseen quitosana en su pared, aunque no sea ésta el polisacárido más abundante, por ejemplo *Aspergillus niger* (Knorr & Klein 1986); *Mucor meihei*, (Kauss *et al* 1983); *Absidia butleri*, *Absidia glauca*, *Absidia orchidis*, *Circinella muscae*, *Phycomyces nitens*, *Rhizopus circinans*, *Rhizopus micorsporus*, *Zygorhynchus californiensis*, *Zygorhynchus exponens*, y *Rhizopus stolonifer* (Shimahara *et al.* 1989). *Absidia coerulea*, *Rhizopus circinans*, *Rhizopus nigricans*, *Mortierella sp DY-52*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium anisophae*, *Saccharomyces cerevisie*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Flammulina velutipes*, *Cryptococcus neoformans* (Zhao *et al.* 2010-a).

Las QDAs también han sido encontradas en insectos (*Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster*, *Helicoverpa armigera*, *Mamestra configurata*, *Tribolium castaneum* y *Trichoplusia ni*, entre otros), durante su estado larval en la membrana peritrófica del intestino delgado. En bacterias marinas del género *Vibrio* y *Photobacterium* también han sido encontradas QDAs, debido a que estos microorganismos utilizan la NAG obtenida principalmente de la hidrólisis de la β -quitina, dado que la estructura de este

polisacárido, presente en la concha de cangrejo o en la pluma de calamar, permite un fácil acceso de la enzima, (Zhao *et al.* 2010-a). Algunas características de la quitina desacetilasa producida por otros microorganismos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos productores de quitina desacetilasa.

Microorganismo	pH óptimo	T óptima	Peso molecular (kDa)	Inhibidor/Inductor
<i>Abesidia coerulea</i>	5.0	50 °C	75	Fe ⁺³ /No
<i>Uromyces viciaefabae</i>	5.5-6.0	No reportado	12.7-48.1	No reportado
<i>Bacillus subtilis</i>	4.0	35 °C	No reportado	Ca ⁺² /No
<i>Aspergillus nidulans</i>	7.0	50 °C	27	No reportado

Huang *et al.* 2004; Farag Ibrahim 1999.

1.8. Propiedades de la quitina desacetilasa

Las quitinas desacetilasas pueden ser de dos tipos: las mal llamadas intracelulares (secretadas en el periplasma) y extracelulares (secretadas en el medio de cultivo). Se ha encontrado que este tipo de enzimas son secretadas en diferentes periodos según el microorganismo, por ejemplo la extracelular de *C. lindemuthianum* es secretada durante la penetración de las hifas fúngicas en las plantas, modificando la quitina presente en dichas hifas (Tsigos & Bouriotis 1995). Por su parte la QDA intracelular de *M. rouxii* se produce durante la formación de la pared celular del hongo (Davis & Bartnicki-Garcia 1984). En otros casos la QDA se produce durante la esporulación, el crecimiento vegetativo, o al desarrollarse el cuerpo fructífero de los basidiomicetes. (Zhao *et al.* 2010-a).

Además, las QDA pueden existir en varias isoformas en un mismo microorganismo, aunque sus roles respectivos no han sido explicados aún. Por otro lado, el peso molecular de las QDA puede oscilar entre 25 y 85 kDa, aunque se han encontrado algunas de 150 kDa en *C. lindemuthianum* DSM 63144. Se ha encontrado también que estas enzimas son glicoproteínas, pudiendo estar glicosiladas en una proporción de 20 a 70 % (Zhao *et al.* 2010-a).

Respecto a los pH óptimos que presentan las QDA, se han encontrado valores de 7-12 para las extracelulares, y de 4.5-6 para las periplásmicas. En cuanto a la temperatura óptima, todas ellas la manifiestan dentro del intervalo de 50-60 °C, al menos las procedentes de hongos.

Por otro lado, las QDA son metaloenzimas cuya actividad catalítica es altamente influenciada por iones divalentes (Zn^{+2} , Ca^{+2} y Co^{+2}), siendo el Zn^{+2} el más eficaz para mejorar la actividad. En otros estudios enfocados a averiguar la afinidad y la especificidad de las QDA por distintos sustratos, se ha encontrado que éstas requieren oligosacáridos con un grado de polimerización igual o mayor a 2, para presentar una óptima actividad y para producir patrones más específicos de desacetilación (Hekmat *et al.* 2003). En cuanto a los genes de las QDA, éstos han sido clonados de varios hongos e insectos y caracterizados; entre ellos los de *C. lindemuthianum*, *D. melanogaster*, *F. velutipes*, *M. configurata*, *M. rouxii*, *R. circinans*, *R. nigricans*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *T. castaneum* y *T. ni*, sin embargo, aun existen varias QDA sin caracterizar como ocurre en *Bacillus* spp. (Zhao *et al.* 2010-a).

El múltiple alineamiento de la secuencia peptídica de las QDAs, demostró que éstas contienen cinco grupos catalíticos bien conservados, los cuales conforman el dominio correspondiente al sitio activo de la familia de las desacetilasas CE-4 (Blair *et al.* 2006). Los cinco grupos catalíticos encontrados comprenden varios residuos de histidina y de ácido aspártico, los cuales han sido observados en otros miembros de la familia CE-4, como en la peptidoglicano desacetilasa de *S. pneumoniae* y en la xylan estereasa de *S. lividans* (Blair *et al.* 2005). Además, los miembros de la familia de las QDA CE-4, conservan con pocas excepciones, un grupo enlazante con el zinc formado por la triada His-His-Asp (Blair *et al.* 2006).

1.9. Función biológica de las QDAs

Se ha encontrado que las QDAs tienen diferentes funciones, según los organismos que las contengan ya sean insectos, bacterias marinas u hongos (Zhao *et al.* 2010-a).

- a) **En insectos.** En estos organismos aún no está clara la función de la QDA. Sin embargo, la mayoría de las QDAs tienen un supuesto péptido, el cual puede estar involucrado en la inmunidad del insecto. También se ha propuesto que dicha enzima minimiza el efecto inhibitorio de los quitina-oligosacáridos acetilados, sobre la actividad de las quitinasas intestinales, necesarias para la renovación de los recubrimientos corporales (Dixit *et al.* 2008). Por otro lado, por el alto contenido de quitina en el intestino delgado, la QDA podría participar en la inmovilización de enzimas digestivas, activando así la protección del intestino contra parásitos o toxinas como las lectinas (Campbell *et al.* 2008).
- b) **En bacterias marinas.** Puesto que la quitina es un abundante sustrato marino, podría representar una fuente de carbono, nitrógeno y energía para los microorganismos marinos. En este contexto, las QDAs podrían intervenir en muchos procesos metabólicos y fisiológicos como la quimiotaxis, la multiplicación celular, la formación de biopelículas, y la relación comensal y simbiótica con organismos más grandes, entre otras posibles funciones (Pruzzo *et al.* 2008).
- c) **En hongos.** La QDA participa en la formación de la quitosana presente en la pared celular durante el crecimiento vegetativo (Baker *et al.* 2007). También en la formación de quitosana en las esporas, para mantener su rigidez estructural y resistencia al estrés ambiental (Christodoulidou *et al.* 1999). Así mismo es importante en los hongos patógenos, para evitar que sus hifas puedan ser lisadas por quitinasas vegetales, al transformar la quitina de la pared celular en quitosana.

1.10. Aplicaciones de la QDA

La QDA tiene un papel muy importante tanto en mecanismos de ataque biológico, como en sistemas de defensa, por lo cual puede tener aplicación en el control biológico (Zhao *et al.* 2010). Por lo tanto, la QDA puede ser una alternativa para el biocontrol de hongos patógenos en humanos, puesto que esta enzima puede desacetilar la quitina de la pared celular fúngica, siendo entonces una excelente opción de terapia antifúngica (Zhao *et al.* 2010-a). También puede ser una alternativa para el biocontrol de insectos-plaga en la agricultura, al modificar la cutícula de éstos para la fácil penetración de los hongos patógenos, o bien modificando la estructura de la pared celular de éstos como defensa contra las quitinasas de los insectos (Nahar *et al.* 2004).

Debido a los múltiples usos médicos e industriales de la quitina, la quitosana y sus derivados, la QDA también podría involucrarse en la preparación de quitosana a partir de quitina (Win & Stevens 2001). Sin embargo, la utilización de la QDA para convertir la quitina en quitosana, presenta la inconveniencia de la insolubilidad de la quitina, por lo cual se requiere dar un pre-tratamiento a la quitina para formar un derivado soluble, de modo que sea posible que la QDA pueda acceder a la estructura interna del polisacárido.

1.11. La QDA (o polisacárido desacetilasa) de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis y *B. anthracis* pertenecen al grupo de *B. cereus*. El genoma de estas tres especies es tan parecido, que para muchos autores se trata de una sola especie, cuyas diferencias se dan sólo a nivel fenotípico por la expresión genética de plásmidos particulares, los cuales permiten a *B. thuringiensis* producir cristales proteicos intracelulares; a *B. anthracis* formar una cápsula muy notoria, además de toxinas y factores de virulencia; y a *B. cereus* producir toxinas capaces de provocar diferentes problemas alimentarios. Este comentario viene al caso, porque la QDA más estudiada en este grupo bacteriano es la de *B. cereus*, pero sus características podrían aplicarse probablemente, a la QDA de *B. thuringiensis*.

El primer reporte sobre la QDA de *B. cereus* fue hecho por Araki *et al.* en 1971. Ellos sonicaron células de *B. cereus* AHU1030, cosechadas en la parte media de la fase logarítmica de crecimiento. El lisado suspendido en regulador de Tris-HCl pH 7.2, se sometió a una centrifugación a 13,000 rpm, colectándose el sedimento y la fracción soluble, que luego fueron ensayadas como enzima. Como sustratos se utilizaron la peptidoglicana de la pared celular del propio microorganismo, parcialmente purificada y marcada con acetato-¹⁴C o acetato tritiado, y también la N-acetilglucosamina-6-fosfato. La actividad desacetilante sobre la peptidoglicana se encontró repartida en la fracción soluble y en el sedimento del lisado bacteriano, en tanto que la capacidad para desacetilar el azúcar fosforilado, sólo se encontró en la fracción soluble. Ambas actividades radicaban en enzimas diferentes, que se separaron y purificaron parcialmente en columnas de Sepharosa 6B. También eran diferentes su pH óptimo y requerimientos, por ejemplo la desacetilasa de la peptidoglicana requería iones Co⁺⁺ y actuaba mejor a pH 7.0, mientras que la desacetilasa del fosfoacetilaminoazúcar requería Mn⁺⁺ y tenía un óptimo a pH 9.0. Por otra parte, la desacetilasa de la peptidoglicana tenía muy baja capacidad desacetilante sobre quitina y sobre diversos quitina-oligosacáridos.

Estudios más recientes (Psylinakis *et al.* 2005) han demostrado que los genomas de *B. cereus* y de *B. anthracis* contienen información para sintetizar hasta 10 polisacárido-desacetilasas homólogas, 6 de las cuales desacetilan peptidoglicanas que contienen N-acetilglucosamina. Los genes de dos de estas enzimas fueron clonados (genes Bc1960 y

Bc3618) y expresados en *E. coli*. Las enzimas producidas fueron purificadas hasta homogeneidad molecular y caracterizadas. Ambas fueron capaces de desacetilar peptidoglicanas presentes en la pared celular de bacterias Gram (+) como *B. cereus* y *B. subtilis*, pero también de Gram (-) como *Helicobacter pylori*. También desacetilaban N-acetilquitooligosacáridos con 2 a 6 unidades de NAG, pero con más eficacia a la tetraosa. Una posible función para este tipo particular de desacetilasas, pudiera ser desacetilar la porción de carbohidrato de la peptidoglicana de la pared celular, para evitar su degradación por la lisozima endógena de la propia bacteria. Tal hipótesis se basa en el hecho de que si se acetila químicamente la peptidoglicana, ésta es degradada rápidamente por la lisozima del propio microorganismo. Esto podría sugerir un mecanismo de regulación que permite la hidrólisis o no de ciertos polímeros, dependiendo del contenido de grupos acetilos en su molécula. Por otra parte, el hecho de que puedan formarse hasta 10 desacetilasas homólogas, ha sugerido que éstas podrían estar involucradas en diferentes roles fisiológicos en *B. cereus* y *B. anthracis*, por ejemplo en la esporulación, la germinación de las esporas, el crecimiento vegetativo y en las interacciones huésped-parásito (Psylinakis *et al.* 2005).

Cabe agregar, que se ha identificado el gen de la polisacárido desacetilasa en *Bacillus thuringensis*, la cual ya fue secuenciada y clonada. En este estudio se estableció que esta enzima no afecta el crecimiento vegetativo ni la esporulación, pero sí la germinación de las esporas (Hu *et al.* 2006).

Un estudio más reciente mostró la existencia del gen correspondiente a una QDA en *Bacillus thuringensis* cepa Al Hakam, al secuenciar el genoma completo de este microorganismo. Sin embargo, dicha enzima no se ha aislado, purificado ni caracterizado hasta el momento (Challacombe *et al.* 2007).

En cuanto a la demostración de la actividad de la QDA en *B. thuringiensis*, existe un estudio reciente (Nava Arenas 2009), que podría considerarse el antecedente directo de la presente investigación. El estudio referido se justificó en dos hechos importantes. Primero, al comparar las secuencias patogenómicas de *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* se localizaron 12 genes de enzimas degradadoras de biopolímeros, uno de ellos era similar al de la QDA de *M. rouxii*, pero dicha enzima no se aisló ni caracterizó (Han *et al.* 2006). Segundo,

se conocía que *B. thuringiensis* no producía, o producía niveles muy bajos de quitinasa, sin embargo podía crecer en medios con quitina como única fuente de carbono (Gómez Ramírez 2006). Por lo contrario, un porcentaje significativo de cepas de *B. thuringiensis* secretaba niveles importantes de quitosanas cuando se le cultivaba en medios con quitosana (Cruz-Camarillo *et al.* 2004). Esto permitió suponer que *B. thuringiensis* podría aprovechar la quitina, transformándola en quitosana mediante una QDA, que probablemente era inducible y extracelular (Cruz Camarillo *et al.* 2004). Los resultados obtenidos por Nava Arenas (2009) mostraron que sólo 23 entre 133 cepas de *B. thuringiensis* no producían la actividad de QDA. En otras palabras, esta enzima era producida por el 82% de las cepas estudiadas, luego podría suponerse que tenía una función importante, que muy probablemente no era la de transformar la quitina en quitosana extracelularmente, pues la enzima no era extracelular ni inducible. Su localización probablemente era la pared celular. Su solubilización mediante sonicación fue poco exitosa, obteniéndose mejores resultados utilizando autolizados. La enzima cruda mostró un pH óptimo de 4 y una temperatura óptima de 45 °C. En ese trabajo se propuso que la QDA de *B. thuringiensis* podría ser una enzima no específica, capaz de desacetilar diversos sustratos, requiriendo para ello que la célula estuviera en contacto directo con el sustrato, pues la enzima probablemente estaba asociada a la pared (Nava Arenas, 2009). El presente estudio representa la continuación del trabajo referido, buscando ampliar el conocimiento de la QDA de *B. thuringiensis*, abordando los objetivos que se describen a continuación.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Producir, liberar del soma bacteriano, recuperar, purificar y caracterizar la quitina desacetilasa de la cepa Bt-132 de *Bacillus thuringiensis*.

2.2. Objetivos particulares

2.2.1. Definir si la enzima es una desacetilasa específica y si tiene carácter inducible.

2.2.2. Establecer el medio y las condiciones de cultivo para la mayor producción de la desacetilasa. Averiguar el mejor procedimiento para su liberación a partir de lisados y autolisados celulares.

2.2.3. Purificar la enzima mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y/o con soportes cromatográficos. Monitorizar el proceso mediante electroforesis en gel, y evaluación de la actividad específica y el porcentaje de recuperación.

2.2.4. Caracterizar la enzima cruda y la purificada, evaluando los parámetros moleculares y cinéticos habituales.

3. METAS

- 3.1. Evaluar en placa la capacidad de Bt-132 para producir quitinasa, quitosanasa y QDA, buscando dar sustento a la hipótesis de que Bt puede aprovechar la quitina por una vía alternativa, con participación de la QDA y la quitosanasa.
- 3.2. Instaurar una técnica cualitativa en placa para evaluar la actividad de QDA, visualizando la liberación de ácido acético en presencia de resazurina, un indicador de pH.
- 3.3. Aplicar dicha técnica para estudiar la capacidad de Bt-132 para desacetilar diversas sustancias xenobióticas acetiladas, y aclarar de ese modo si la desacetilasa es o no específica.
- 3.4. Establecer una técnica cuantitativa (espectrofotométrica) para evaluar la QDA, usando la glicol-quitina, un sustrato soluble. En esta técnica se mide la transformación de la acetil-glucosamina en glucosamina.
- 3.5. Estudiar la inducción y represión de la síntesis de QDA en medios de diferente composición, combinando técnicas cuali y cuantitativas.
- 3.6. Establecer el medio de cultivo y la fase de crecimiento apropiados para producir la QDA. Ensayar diversas estrategias para liberar la enzima de células bacterianas lisadas o autolisadas, con la mayor recuperación posible.
- 3.7. Hacer una caracterización de la QDA a nivel de extracto crudo, para conocer aquellas propiedades que deban tomarse en cuenta para instaurar un esquema de purificación.

- 3.8.** Purificar la QDA bajo un esquema que incluya las siguientes operaciones: producción de la enzima; su liberación y máxima recuperación posible; concentración y fraccionamiento con sulfato de amonio y/o en columnas con diversos soportes cromatográficos.
- 3.9.** Monitorizar la purificación de la enzima mediante electroforesis en gel usando las tinciones con nitrato de plata y azul de Coomasie, evaluando además el incremento en la actividad específica y el porcentaje de recuperación.
- 3.10.** Determinar algunas propiedades moleculares y cinéticas relevantes de la QDA purificada.

4. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han confirmado que *B. thuringiensis* posee actividad de QDA, la cual no se secreta, sino que está asociada al soma bacteriano. La presencia de la QDA es muy amplia, pues el 82% de un total de 133 cepas de *B. thuringiensis* produjeron dicha enzima, sugiriendo que su rol metabólico es importante. Sin embargo, se desconoce la regulación de su síntesis y tampoco se ha realizado su purificación, lo cual es imprescindible para abordar su caracterización molecular y cinética. El presente trabajo de investigación básica es una contribución que permitirá aclarar varios de estos aspectos, los cuales son necesarios para la aplicación biotecnológica de la QDA en el campo de la producción de quito-oligosacáridos bioactivos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medios de cultivo

Para conservar la cepa Bt-132 de *B. thuringiensis* se liofilizaron sus esporas. Su reactivación se hizo cultivándola en caldo nutritivo. Para su conservación a corto plazo y confirmación de pureza se utilizó agar nutritivo, vaciado en cajas de Petri o en forma inclinada en tubos con tapón de rosca. Para confirmar la pureza de la cepa se utilizaron tres tipos de tinción: Gram (cultivo de 18-24h); Shaeffer y Fulton para esporas (cultivos de 48-72 h) usando verde de malaquita, y la diferencial para observar células, esporas y cristales empleando fuccina, verde de malaquita y amido negro.

Para el cultivo rutinario de Bt-132 se utilizó el medio sintético descrito por Castañeda Agulló (1956) el cual contiene los siguientes ingredientes (g/L): citrato diamónico 0.625; cloruro de sodio 0.250; fosfato monobásico de potasio 0.375; carbonato de sodio 0.375; sulfato de magnesio anhidro 0.275; además 6.25 mL/L de glicerol. Para los ensayos en placa se añadieron 23 g/L de agar. El pH se ajustó a 6.5.

El medio sintético descrito fue útil para ensayos en medio líquido o sólido, ya fuera para la obtención de inóculos frescos, o para estudiar la producción y regulación de la síntesis de diversas enzimas, según se indica a continuación:

Para visualizar la producción en placa de diversas enzimas extracelulares, se suprimieron el glicerol y el citrato y se añadieron como inductores y únicas fuentes de carbono y nitrógeno las siguientes sustancias: quitosana coloidal al 12% (ph/V) para el caso de las quitosanasas; quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada al 10% (ph/V) para quitinasas. Este mismo ingrediente, complementado con resazurina al 0.015% (indicador de pH) sirvió para visualizar la producción de QDA.

Para observar en placa la desacetilación enzimática de sustancias xenobióticas, al medio basal se le suprimió el glicerol, y se sustituyó por otras fuentes de carbono como EDTA, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, p-fenoxiacetato y acetato de uranilo, a diversas concentraciones que permitieran la sobrevivencia de la bacteria. No se eliminó el citrato

de amonio, en el medio basal, por ser este compuesto la fuente de nitrógeno. Para visualizar el cambio de pH en torno a las colonias, debido a la liberación enzimática del acetato, se adicionó el indicador de pH resazurina al 0.015%.

Cuando interesó estudiar la represión de la síntesis de QDA se adicionaron al medio basal: glucosa, glucosamina y N-acetil-glucosamina al 1%.

Los experimentos en cultivo sumergido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 1/5 de su volumen del medio apropiado, e incubado el tiempo necesario a 28 °C, con una agitación de 180 rpm.

5.2. Preparación de sustratos enzimáticos especiales

En la presente investigación se prepararon quitina (desmineralizada y desproteínizada) y quitosana coloidales, las cuales sirvieron para formular medios de cultivo líquidos y sólidos, y también para propiciar la producción y evaluación de quitinasas, quitosanasas y QDA. Su preparación se realizó como se indica a continuación.

5.2.1. Preparación de quitina desmineralizada, desproteínizada y coloidizada

El proceso se realizó en tres etapas: **1) desmineralización**, donde la quitina nativa, molida (molino Wiley) y tamizada (malla 40) se trató con HCl 0.6 N, en una relación líquido-sólido 11:1, durante 3 h a 28°C. **2) desproteínización**, donde la quitina desmineralizada se trató con NaOH al 1% durante 24 h a 28 °C. El residuo obtenido se lavó con agua destilada y se secó a 32°C (Young *et al.* 1985). **3) coloidización**, a 10 g de quitina desmineralizada y desproteínizada, se le adicionaron 100 mL de H₃PO₄ al 85%, mezclando perfectamente. La pasta resultante se dejó reposar en refrigeración durante 24 h. Posteriormente se añadió agua de la llave hasta la aparición de un material blanco gelatinoso. Después se filtró en papel filtro y el material retenido se lavó con agua corriente hasta la eliminación del ácido. Por último, se realizó un lavado con agua destilada. El material obtenido, de consistencia gelatinosa, se transfirió a un vaso de precipitados, el cual se cubrió con papel aluminio y se esterilizó en autoclave. Luego se conservó en refrigeración hasta su uso (Chávez Camarillo & Cruz Camarillo 1984).

5.2.2. Preparación de quitosana coloidal

A 3 g de quitosana comercial (Sigma), previamente molida en molino Willey con malla 40, se le adicionaron 30 mL de H_3PO_4 al 85%, luego se dejó en reposo bajo refrigeración durante 24 h. El material chicloso obtenido se disolvió adicionando 1L de agua destilada y agitando suavemente. Enseguida se adicionó alcohol de 96°C previamente enfriado (-15 °C), hasta lograr la precipitación de la quitosana coloidal, y se dejó reposar durante 48 h en refrigeración, para propiciar la total floculación. El sedimento se recuperó por centrifugación, y se lavó 5 veces con etanol frío, centrifugando en cada ocasión 10 min a 5,000 rpm. El material gelatinoso obtenido se resuspendió en agua destilada, ajustando el pH a 7 con NaOH 1 N. Finalmente se esterilizó la quitosana coloidal en autoclave, y se conservó en refrigeración hasta su uso (Sánchez-Pérez 2001).

5.2.3. Preparación del sustrato de glicol-quitina

La glicol quitina se preparó por acetilación de la glicol-quitosana, mediante una modificación al método de Molano *et al.* (1979), modificado posteriormente por Trudel & Asselin (1989). El procedimiento incluyó los siguientes pasos:

- a) Se disolvió 1g de glicol-quitosana (Sigma L 127K1366), adicionando gradualmente 20 mL de ácido acético glacial.
- b) Se dejó reposar la solución viscosa resultante durante 8 h a temperatura ambiente.
- c) La solución se transfirió a un vaso de precipitados, y se le adicionaron en agitación 1.5 mL de anhídrido acético.
- d) Se dejó reposar el gel resultante durante 30 min a temperatura ambiente.
- e) Después se cortó el gel en pequeños cuadritos, y se desechó el líquido exudado.
- f) Los cuadritos se transfirieron a una licuadora y se cubrieron con metanol. Luego se homogeneizó durante 4 min a la máxima velocidad.
- g) La suspensión resultante se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 4 °C.
- h) La pastilla gelatinosa obtenida se resuspendió en un volumen igual de metanol. Se homogeneizó y se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm por 15 min a 4° C.

- i) La nueva pastilla gelatinosa resultante se resuspendió en 100 mL de agua destilada, conteniendo 0.02 % de azida de sodio, y se homogeneizó en una licuadora por 4 min a la velocidad máxima.
- j) La suspensión resultante de glicol-quitina se almacenó a 4 °C, hasta su uso.

5.3. Determinación de la quitina desacetilasa (QDA)

Anteriormente se indicó que la QDA se evaluó cualitativamente en ensayos en placa donde el medio solidificado iba adicionado del indicador de pH, resazurina al 0.015%. de este modo la acción desacetilante provocó la liberación de acetato en torno a las colonias bacterianas. La acidez resultante dio lugar a la formación de halos rojizos que contrastaban con el fondo azul del medio de cultivo.

Para la evaluación cuantitativa de la QDA se usó un método basado en el principio de que los residuos de glucosamina formados por la acción desacetilante de la QDA sobre la quitina, son susceptibles a la desaminación con ácido nitroso. Esta reacción produce un aldehído, el cual es determinado colorimétricamente con 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH). El nivel de aldehído cuantificado, equivale a la glucosamina producida enzimáticamente. Para el ensayo se utilizó glicol-quitina como sustrato por su carácter soluble, de acuerdo con la técnica de determinación de hexosaminas, originalmente descrita por Tsuji *et al.* (1969). La técnica empleada fue la siguiente:

- a) Se preparó una suspensión al 1% (v/v) de glicol-quitina (Sigma), a partir de una solución inicial de 1% (p/v), usando una solución amortiguadora de tetraborato de sodio-HCl 50 mM a pH 7.
- b) Luego se mezclaron 400 µL de la suspensión anterior, con 100 µL de la solución enzimática a ensayar.
- c) Después se incubó la mezcla a 33 °C durante 4 h.
- d) Luego se adicionaron 500 µL de una solución de sulfato de potasio al 5 % para detener la reacción y 500 µL de una solución de nitrito de sodio al 5 %, dejando reposar con agitaciones ocasionales durante 15 min.
- f) A la mezcla de reacción se le adicionaron 500 µL de sulfamato de amonio al

12.5 %, y se dejó reposar durante 5 min.

- g) Después se adicionaron 500 μL de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona al 0.5 %, y se dejó reposar durante 60 min.
- i) Por último se añadieron 500 μL de cloruro férrico al 0.5 %. La solución de cloruro férrico es estable hasta por 3 días, si es almacenada a 4 °C.
- k) El color desarrollado después de 30 min se leyó a 650 nm. El valor resultante se interpoló en una curva tipo preparada con glucosamina-HCl, de 0 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La actividad se expresó en unidades, siendo una unidad de QDA la cantidad de enzima requerida para producir 1 μg de glucosamina, bajo las condiciones establecidas.

5.4. Liberación de la QDA

Como ha sido expresado previamente, la QDA de Bt-132 está asociada a la célula, posiblemente en la pared celular, por lo mismo fue necesario ensayar diferentes procedimientos para liberar la enzima con la mayor recuperación posible. En este caso, se ensayaron tres tratamientos de tipo mecánico bajo diversas condiciones de operación, en los que se emplearon células de 12 h de edad. Dicho tiempo fue establecido después de haber realizado una curva de producción de QDA. Por lo tanto las células de 12 h se sometieron a la acción de sustancias abrasivas como la sílica gel, o de pequeñas perlas de vidrio (ballotini), empleando un homogenizador Potter, o mediante agitación en Vórtex respectivamente; también se utilizó vibración sónica y se recurrió a la autólisis que en forma natural se inicia en *B. thuringiensis* Bt-132 a partir de las 36 h; sin embargo, para asegurar el 100 % de dicho proceso, la incubación en condiciones de agitación se prolongó hasta las 96 h.

El procedimiento que dió mejores resultados para liberar y solubilizar la enzima en estudio se describe a continuación. Se tomó aproximadamente 1 g (peso húmedo) de células procedentes de un cultivo de 12 h, y se resuspendieron en 5 mL de regulador de tetraborato de sodio 50 mM pH 7.0. Después se lavaron las células 3 veces con el mismo regulador; centrifugando durante 10 min a 5000 rpm, y resuspendiendo en el mismo volumen de regulador. La última resuspensión celular fue transferida a un matraz

Erlenmeyer de 25 mL y se incubó durante 96 h, a 28°C y 180 rpm en una incubadora (-----), para propiciar la autólisis de Bt-132. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm en una centrífuga (-----), durante 10 min colectándose el sobrenadante, el cual fue filtrado en membranas de 0.22 µm para eliminar las células remanentes en el caso de que las hubiera. El filtrado libre de células fue considerado el extracto enzimático crudo de la QDA, ya que dicha enzima, como ya se ha mencionado está asociada a la célula.

5.5. Caracterización de la QDA cruda y purificada

5.5.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó a diferentes valores de pH, empleando regulador de acetatos, 50 mM (pHs 3, 3.5, 4), y regulador de tetraborato de sodio 50 mM (a los pHs 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9). Los reguladores se utilizaron para preparar el sustrato al 1% (v/v) a partir de una solución de glicol-quitina al 1% (p/v). La enzima se incubó durante 4 h a 30 °C, y posteriormente se le determinó la actividad utilizando el método ya descrito (Tsuji *et al.* 1969).

5.5.2. Efecto del pH sobre la estabilidad enzimática

Se mezclaron en una proporción de 1:1 el extracto enzimático y el regulador correspondiente (ver rubro 6.5.1), cubriendo el intervalo de pH de 3 a 9. Después de una preincubación de 60 min, la actividad enzimática remanente fue determinada bajo las condiciones óptimas (40 °C, pH 4.5, 4 h).

5.5.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la QDA

Se mezcló 0.1 mL de extracto enzimático con 0.4 mL de una solución de glicol-quitina al 0.1% en regulador de tetraborato de sodio 50 mM pH 7.0. Después, se incubó durante 4 h a las temperaturas 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 70 °C, a pH 4.5. La determinación de la temperatura óptima de reacción se realizó por triplicado en un intervalo de 10-70 °C, haciendo la cuantificación enzimática cada 5 °C, mediante el método ya descrito (Tsuji *et al.* 1969).

5.5.4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática

La enzima se preincubó durante 1 h a 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C. Posteriormente, los tubos se transfirieron a un baño a la temperatura óptima (40 °C) durante 15 min, y se evaluó la actividad remanente en la forma acostumbrada (40 °C, pH 4.5, 4 h).

5.5.5. Efecto de reactivos tiol-específicos sobre la actividad enzimática

Se preincubaron durante 1 h a 40 °C muestras de la enzima, con inhibidores tales como el p-hidroximercuribenzoato (p-HMB) y cloruro mercurico (HgCl_2), a concentraciones de 0.001 y 0.01 M, respectivamente. Después se determinó la actividad remanente. El testigo de referencia se preparó mezclando la enzima y el sustrato sin ninguna adición, e incubando bajo las condiciones óptimas (40 °C, pH 4.5, 4 h); la actividad encontrada se consideró como el 100%.

5.5.6. Efecto del EDTA

Para ensayar el efecto de sustancias quelantes la enzima cruda fue dializada contra una solución de EDTA 0.1 M, disuelta en regulador de tetraborato de sodio 50 mM pH 7.0 en una relación 1:10 (v/v). La diálisis se realizó durante 180 min colectando muestras a los 60, 90, 120, 150 y 180 min, evaluándose la actividad remanente bajo las condiciones óptimas establecidas.

5.5.7. Requerimientos iónicos

Después de dializar el extracto enzimático durante 180 min contra EDTA, se tomaron alícuotas de 100 μL de la enzima dializada, a las cuales se les adicionó en forma independiente 400 μL de soluciones de las siguientes sales: ZnCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 y CoCl_2 , de modo que se obtuviera en cada caso una concentración final de 0.01 M, luego se preincubaron durante 1 h. Después se evaluó la actividad bajo condiciones óptimas (40 °C, pH 4.5, 4 h), con el objeto de observar si las sales referidas estimulaban la actividad de la QDA. Como testigo se usó una muestra de la enzima dializada contra EDTA, pero sin adición de las sales en estudio, de modo que podría indicarnos si ocurrió o no una reactivación y cuya actividad remanente se consideró como el 100%.

5.5.8. Inactivación de la enzima por agentes desnaturalizantes

Se estudió el efecto de la urea a concentraciones 1, 3 y 5 M. El extracto enzimático se incubó previamente durante 1 h con las sustancias referidas, y luego se midió la actividad remanente.

5.6. Concentración y fraccionamiento de la QDA con sulfato de amonio

El fraccionamiento de la QDA se realizó en tres etapas sucesivas, adicionando la sal en polvo hasta alcanzar porcentajes de saturación de 40, 60 y 85%. En este caso se utilizaron 5 mL del extracto enzimático, al cual se le determinó previamente la actividad de QDA y contenido de proteína iniciales. Después se añadió poco a poco, con agitación suave, la cantidad de sal requerida para cada etapa de saturación. La agitación se repitió constantemente durante 60 min, excepto al utilizar 85% de saturación, cuando el tiempo se prolongó durante 12 h a 10 °C. Después de cada adición de sal se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min, y se separaron tanto el sobrenadante como el precipitado para ser analizados por separado. Los precipitados obtenidos en cada caso fueron disueltos en regulador de tetraborato de sodio 50 mM pH 7.0. Puesto que la QDA se mantuvo siempre en los sobrenadantes, este tratamiento permitió eliminar una cantidad importante de proteína, de modo que pudo después fraccionarse en columnas cromatográficas hasta obtener la QDA pura.

5.7. Purificación de la quitina desacetilasa

Este proceso se inició con la liberación de la enzima a partir de células jóvenes (12 h de incubación), de acuerdo a lo indicado en el rubro 6.4. Con el extracto crudo obtenido se siguieron después las dos marchas de purificación siguientes.

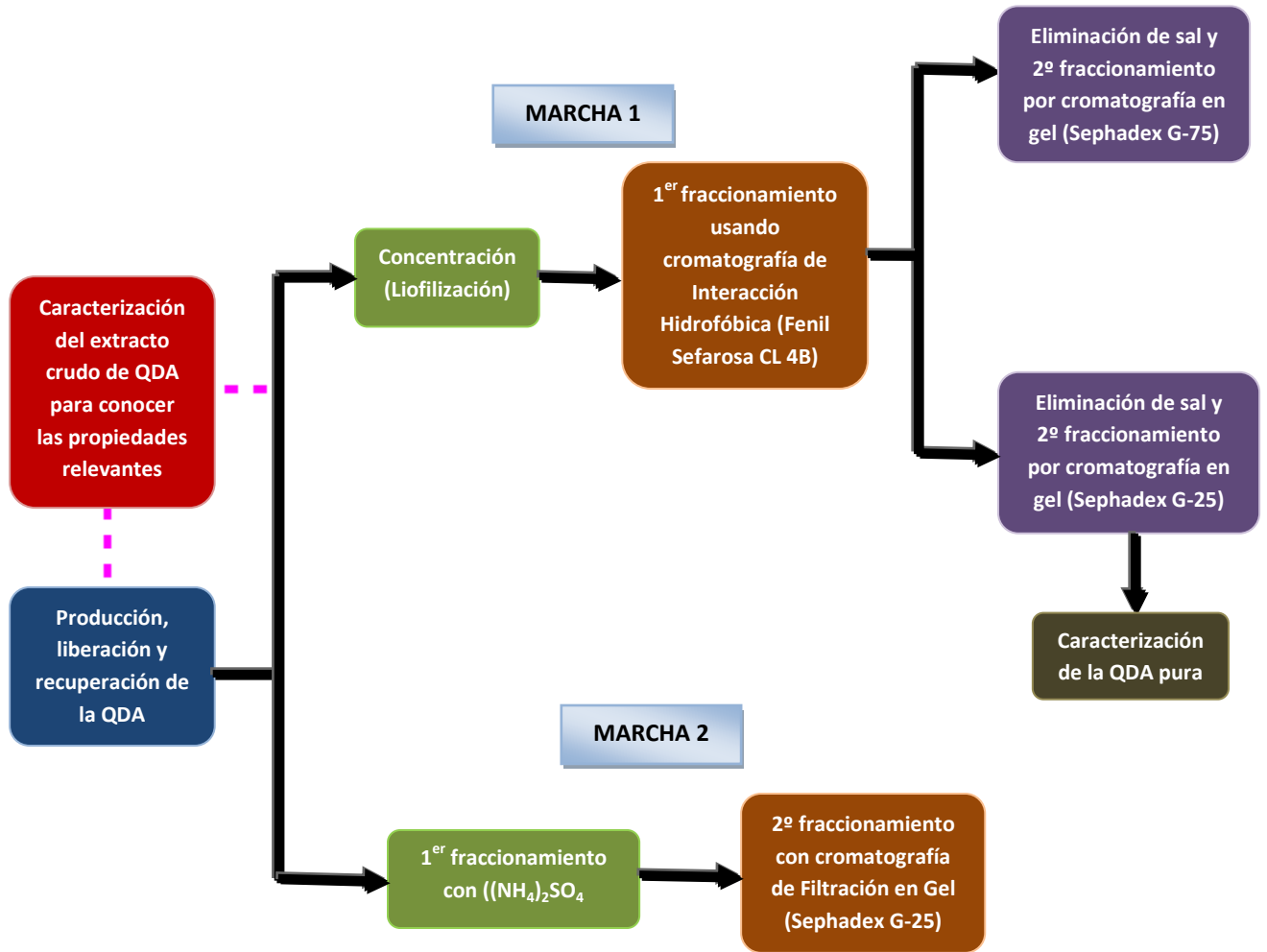


Figura 4. Diagrama de flujo de producción y purificación de la QDA.

A continuación se refieren más detalles sobre las técnicas utilizadas.

5.7.1. Concentración por liofilización de la quitina desacetilasa

Los extractos enzimáticos crudos fueron reunidos y después congelados utilizando hielo seco en etanol para luego liofilizarlos durante 6 h a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 50 mmHg, utilizando una liofilizadora Freeze Dryer 3 LABCONCO mod. 451 F. El material seco obtenido fue guardado en congelación ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su uso posterior.

5.7.2 Fraccionamiento en columna de fenil sefarosa CL-4B

Los extractos enzimáticos crudos, obtenidos por autólisis en condiciones de agitación y temperatura controlada, fueron liofilizados y redisolventes con agua destilada y desionizada, en una proporción 1:8 v/v, para luego ser aplicados sobre una columna para cromatografía de interacción hidrofóbica (marcha 1). Como soporte se utilizó fenil sefarosa CL-4B (Sigma L 123K1083), la cual fue resuspendida al 75% en un regulador de tetraborato de sodio 50 mM, adicionado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M, pH 7.0, por ser éste un regulador que propicia la unión de los solutos proteicos al soporte, pues por su alto contenido de sales refuerza las uniones hidrofóbicas. La columna utilizada (1 x 25 cm) fue empacada con 19.7 cm^3 del soporte hidrofóbico, y después fue equilibrada hasta obtener valores de A_{280} y pH iguales a la entrada y a la salida, eluyendo con el regulador de unión ya referido. Para la elución se utilizó un gradiente discontinuo decreciente, usando el mismo regulador de unión, pero adicionado de sulfato de amonio a concentraciones decrecientes. De este modo, la elución se inició con tetraborato de sodio 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M pH 7.0 (A), finalizando con sólo tetraborato de sodio 50 mM pH 7.0 (B). La regeneración del soporte se realizó en la propia columna, haciendo pasar 3 volúmenes de lecho de isopropanol al 30% y 3 volúmenes de lecho de agua destilada. Para ser reequilibrada se pasaron por la columna 3 volúmenes de lecho del regulador A, quedando así la columna lista para ser reutilizada (instrucciones del fabricante, Amersham Biosciences; Hydrophobic Interaction: Principles and methods; clave: 18-1020-90).

Las condiciones bajo las cuales fue operada la columna fueron: un flujo de trabajo de 0.5 mL/min a temperatura ambiente, colectándose manualmente 120 fracciones de 2 mL

en las que se evaluó la actividad de la QDA, y la concentración de proteína por los métodos de Bradford (1976), Lowry (1951) y absorbencia a 280 nm.

5.7.3. Cromatografía de filtración en gel

Se utilizaron dos tipos diferentes de Sephadex: el G-25 grado fino, y el G-75 grado medio. Los objetivos de esta operación fueron eliminar el sulfato de amonio de la muestra enzimática pasada por la columna de interacción hidrofóbica, así como realizar un nuevo fraccionamiento de la misma. A continuación se ofrecen más detalles al respecto.

5.7.3.1. Fraccionamiento y desalación en columna de Sephadex G-25

Se tomaron 2 g de Sephadex G-25 grado fino (Sigma G-2580), con tamaño de partícula 20-80 μm (límite de exclusión 5000), y se hidrataron con 20 mL de agua destilada, aplicando agitación manual lenta para permitir el hinchamiento de las partículas del gel. La suspensión se dejó 24 h en reposo para asegurar tal acción, luego se decantó para eliminar las partículas de gel que, por su pequeño tamaño, no sedimentaban y permanecían suspendidas. Para el uso del Sephadex G-25 grado fino, se utilizaron dos columnas diferentes, una para desalar la muestra proveniente de la columna de interacción hidrofóbica (columna 1) y otra para desalar y fraccionar dicha muestra (columna 2). Ambas fueron utilizadas como parte de procesos diferentes. Las características de estas columnas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de las columnas empacadas con Sephadex G-25.

Parámetros	Columna 1	Columna 2
Diámetro interior (d, cm)	1.2	1.1
Altura del lecho (h, cm)	13.5	31.5
Volumen de lecho (V_t , mL)	12.24	29.94

Ambas columnas fueron empacadas evitando la formación de burbujas, cumplido lo cual, se procedió a lavar con 3 volúmenes de lecho de agua destilada y filtrada en filtros de 0.44 μm . Posteriormente se equilibró con regulador de tetraborato de sodio 0.05 M pH 7.0, hasta obtener una A_{280} y un pH de salida iguales a los de entrada. Las columnas fueron

operadas a temperatura ambiente. De acuerdo a las especificaciones del fabricante, y según el objetivo de la columna, se colectaron manualmente 20 fracciones de 3 mL para la columna 1 (para sólo desalar) y 60 fracciones de 1 mL para la columna 2 (para desalar y fraccionar). La regeneración del soporte se realizó en la propia columna empleando 3 volúmenes de lecho de NaOH 0.2 M y posteriormente se lavó con agua destilada. Cuando no era utilizado dicho empaque, se mantenía bajo refrigeración en etanol al 20% (instrucciones del fabricante: Amersham Biosciences; Gel filtration: Principles and methods; clave: 18-1022-18).

5.7.3.2. Fraccionamiento y desalación en columna de Sephadex G-75

La utilización de este soporte, se realizó con los mismos objetivos que el G-25, es decir, fraccionar y desalar la muestra. Para la preparación de este soporte, se tomaron 4 g de Sephadex G-75 (Sigma G-75120), con tamaño de partícula de 40-120 μm (límite de exclusión 50 000), los cuales se hidrataron con 120 mL de agua destilada, aplicando agitación manual lenta. Para permitir el hinchamiento de las partículas del gel, la suspensión se dejó 24 h en reposo bajo refrigeración a 4 °C. Enseguida se eliminaron las partículas de gel más pequeñas y no sedimentadas, mediante una decantación. En este caso se utilizó una columna con un diámetro interno de 1.1 cm, y una altura de lecho de 30.5 cm. Dicha columna fue empacada y equilibrada de igual forma que cuando se usó el sephadex G-25. La regeneración del gel y su conservación también se hizo de manera semejante. La columna fue operada a temperatura ambiente, colectándose manualmente 60 fracciones de 1 mL (instrucciones del fabricante: Amersham Biosciences; Gel filtration: Principles and methods; 18-1022-18).

5.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Se utilizó un gel de poliacrilamida al 10%. El regulador de corrimiento contenía 3.03 g de Tris base, 14.42 g de glicina y 1 g de SDS, disueltos en 1000 mL de agua destilada desionizada. El pH se ajustó a 8.3. Las muestras se corrieron durante 4.5 h totales (1 h a 45 V y 3.5 h a 95 V), a temperatura ambiente. Como referencia se utilizó una mezcla de marcadores (Dalton Mark VI, Sigma, Lot80K9283) compuesta por albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), pepsina (34.7 kDa), tripsinógeno (24 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa) y lisozima (14.3 kDa). A los geles ya corridos se les realizó la tinción de Coomasie o la tinción con nitrato de plata, de acuerdo a la metodología propuesta por Wang *et al.* (2007) y Wray *et al.* (1981), respectivamente. Cuando se utilizó la tinción con azul de Coomasie, se aplicaron 54 μ g de proteína de la mezcla de marcadores y 22.5 μ g de proteína de la muestra problema. En el caso de la tinción con nitrato de plata, utilizada para verificar con mayor certeza el número de bandas obtenidas mediante la tinción con azul de Coomasie, se aplicaron 6 μ g de proteína de la mezcla de marcadores y 4.5 μ g de proteína de la muestra problema.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Posible participación de la QDA en la utilización microbiana de la quitina

Resulta interesante que *B. thuringiensis*, la bacteria más ampliamente utilizada para la producción de bioinsecticidas, sea un microorganismo incapaz de producir quitinasas o las produzca en muy poca cantidad, no obstante que los insectos están formados en su mayor parte por quitina. Su acción entomotóxica radica en cristales proteicos intracelulares. No obstante, a pesar de su poca acción quitinolítica, *B. thuringiensis* puede crecer bien en medios con quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada como única fuente de carbono. Por ello se ha propuesto que esta bacteria pueda utilizar la quitina transformándola en quitosana mediante una QDA. Luego este polisacárido podría ser degradado hasta oligosacáridos asimilables mediante una quitosanasa extracelular. Ensayos en placa realizados en el presente estudio (Figura 5) mostraron que en efecto, las cepas de *B. thuringiensis*, son malas productoras de quitinasas pero buenas de quitosanases, creciendo adecuadamente en medios con quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada como única fuente de carbono, produciendo QDA en dicho medio.

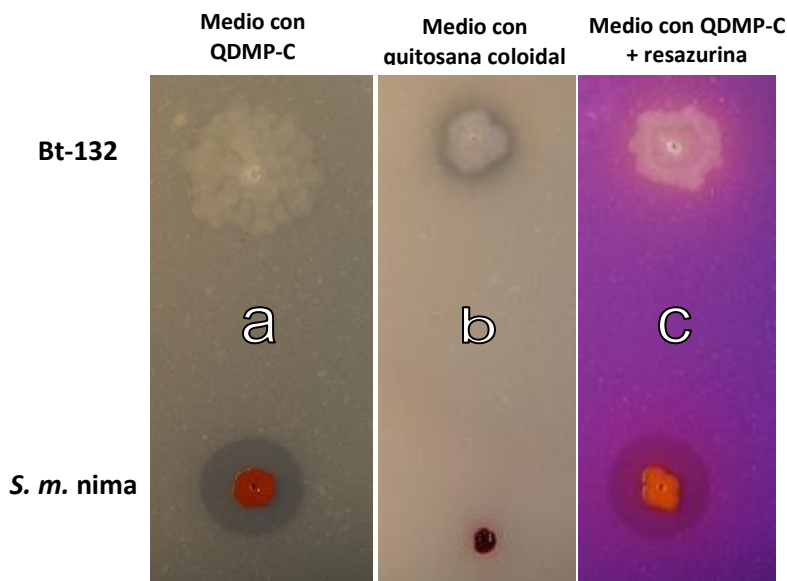


Figura 5. Comparación de *B. thuringiensis* Bt-132 y *S. marcencens* Nima inoculados por picadura en un medio sólido con quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada (QDMP-C) (a), donde se observa que sólo Nima secreta quitinasas, no obstante Bt muestra un buen crecimiento. En b se observan los mismos microorganismos en un medio con quitosana coloidal, donde se observa que sólo Bt secreta quitosanasa, y en este caso Nima muestra un crecimiento muy raquítico. En c se observa que Bt secreta la QDA en un medio con QDMP-C adicionada con resazurina al 0.015 %. En este caso, *S. m.* Nima secreta simultáneamente la QDA y la quitinasa.

Estos datos parecieran avalar la hipótesis de que Bt tiene una QDA, que podría ser la enzima clave de un mecanismo alternativo para la utilización de la quitina. Esta ruta hipotética llamada “chitosan pathway” ha sido mencionada ocasionalmente en la literatura (Zhao *et al.* 2010-b), aunque no ha sido confirmada experimentalmente. Tampoco los resultados de este trabajo son del todo claros al respecto. Lo hubieran sido si se hubiera confirmado que la QDA de Bt-132 mostraba las siguientes características.

- a) Que la enzima desacetilara quitina nativa y quitina modificada estructuralmente.
- b) Que fuera una enzima extracelular, como lo son todas las hidrolasas de biopolímeros.

Con respecto al primer punto se puede comentar que Bt-132 creció bien y produjo la QDA en presencia de quitina desmineralizada, desproteínizada y coloidizada. Tales tratamientos fueron requeridos para hacer más accesible el polisacárido a la acción enzimática, y también para evitar la formación de proteasas, las cuales podrían hidrolizar las proteínas asociadas a la quitina, cuya acción podría producir péptidos y aminoácidos asimilables. Debe recordarse que en la naturaleza, la quitina nativa está en forma de agregados cristalinos, asociados con carbonato de calcio, proteínas y carotenos u otro tipo de sustancias lipídicas. Desde los primeros estudios sobre la QDA, descubierta en *Mucor rouxii*, se demostró que dicha enzima puede desacetilar sólo las cadenas nacientes de quitina, antes de que éstas se organicen en estructuras poliméricas complejas. También puede desacetilar oligómeros solubles, derivados de la quitina, formados por dos y hasta cinco unidades de NAG (Davis & Bartnicki-García 1984; Tsigos *et al.* 1999). Además, se conoce que para evidenciar la actividad de la QDA en el laboratorio, en períodos de tiempo razonablemente cortos, se requiere usar como sustratos derivados solubles como la glicol-quitina, o preparaciones de quitina sometidas a tratamientos físico-químicos que alteran su estructura cristalina, como coloidización y criodesecación (Beaney *et al.* 2007). Sin embargo, se conoce que en la naturaleza muchas moléculas poliméricas complejas y cristalinas son degradadas enzimáticamente, aunque ello requiera largos períodos de tiempo. Los posibles mecanismos involucrados empiezan apenas a ser investigados. Así, recientemente se descubrió una proteína llamada CBP21 (chitin binding protein 21),

considerada inicialmente como no catalítica, la cual podía ejercer una acción descristalinizante sobre la quitina; lo que favorecía la acción degradativa de las quitinasas (Vaaje-Kolstad *et al.* 2005). Muy recientemente, el mismo grupo descubrió que la citada proteína CBP21 era en realidad una enzima oxidativa, que rompía enlaces glicosídicos de la quitina, modificando su estructura. La reacción era favorecida en presencia de ácido ascórbico (Vaaje-Kolstad *et al.* 2010). Estos datos permiten suponer que la QDA podría en teoría, atacar a la quitina cristalina aunque, de una manera muy lenta. Por su parte, la quitina desmineralizada, desproteïnizada y coloidizada, sí es desacetilada enzimáticamente en tiempos cortos, según lo demuestran las evaluaciones en placa mostradas en la Figura 5, o las evaluaciones en tubo realizadas en el presente estudio.

Con respecto a las QDA conocidas, éstas son enzimas extracelulares, sólo que algunas se liberan al medio, como ocurre en *C. lindemuthianum* y *A. nidulans* (Kauss *et al.* 1983; Alfonso *et al.* 1995), y otras permanecen asociadas a la células microbianas, en el espacio periplásmico, como sucede en *M. rouxii* (Araki e Ito 1975). En el caso de Bt-132, la QDA está asociada a la bacteria, aparentemente ubicada en una región accesible al sustrato, ya que las células completas fueron capaces de desacetilar tanto a la quitina desmineralizada, desproteïnizada y coloidizada, como a sustancias de bajo peso molecular con carácter xenobiótico, como el EDTA, el p-fenoxiacetato, el acetato de uranilo y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Estos datos permiten suponer, otra vez, que la QDA de Bt-132 podría estar involucrada en la utilización de la quitina, por una ruta diferente a la de las quitinasas. Esta ruta alternativa o “chitosan pathway”, podría consistir en un ataque lento sobre la quitina nativa, o uno rápido sobre quitina modificada para formar acetato y quitosana. El acetato es una fuente de carbono de fácil asimilación, y la quitosana podría ser degradada después hasta oligómeros asimilables, por la acción de quitosanas extracelulares, cuya presencia está claramente demostrada en el 23 % de las cepas de Bt estudiadas (Cruz Camarillo *et al.* 2004).

6.2. Especificidad de la QDA

En el presente trabajo se logró instaurar una técnica sencilla y sensible para detectar en placa la producción de la QDA, sembrando a Bt-132 en un medio sintético adicionado de quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada como única fuente de carbono y nitrógeno. En estas condiciones la liberación enzimática del ácido acético produjo halos de color rosa en un fondo azul intenso, debido al vire del indicador resazurina contenido en el medio, al incrementarse la acidez en la zona periférica de las colonias bacterianas. Con esta técnica se pudo constatar que la enzima en estudio desacetila no únicamente a la quitina, sino que puede desarrollar una acción similar con sustancias tan diferentes como EDTA, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, p-fenoxiacetato y acetato de uranilo (Figura 6). Se trata pues de una desacetilasa inespecífica, que puede tener interés al menos en dos aspectos. Por una parte explicaría cómo los microorganismos pueden iniciar la degradación de sustancias xenobióticas con estructuras $R_1\text{-CO-CH}_3$ ó $R_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$, efectuando la desacetilación en ambos casos, no obstante que son estructuras diferentes. El acetato liberado en este tipo de reacciones es una fuente de carbono de fácil asimilación, y la degradación podría continuar en los ejemplos citados, de acuerdo a la naturaleza química de los radicales R_1 y R_2 . Otro aspecto interesante a considerar es que la desacetilasa referida podría tener aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, se sabe que los oligosacáridos de tipo quitopentaosa o quitohexaosa tienen importantes acciones farmacológicas, y su acción es más acentuada si son oligosacáridos totalmente desacetilados. Tales compuestos podrían obtenerse por hidrólisis enzimática tanto de quitina (polímero de N-acetilglucosamina) como de quitosana (polímero mixto de glucosamina y N-acetilglucosamina), a condición de que la mezcla de oligosacáridos derivados de las hidrólisis referidas, se traten al final con la desacetilasa en estudio (Olicón Hernández 2011).

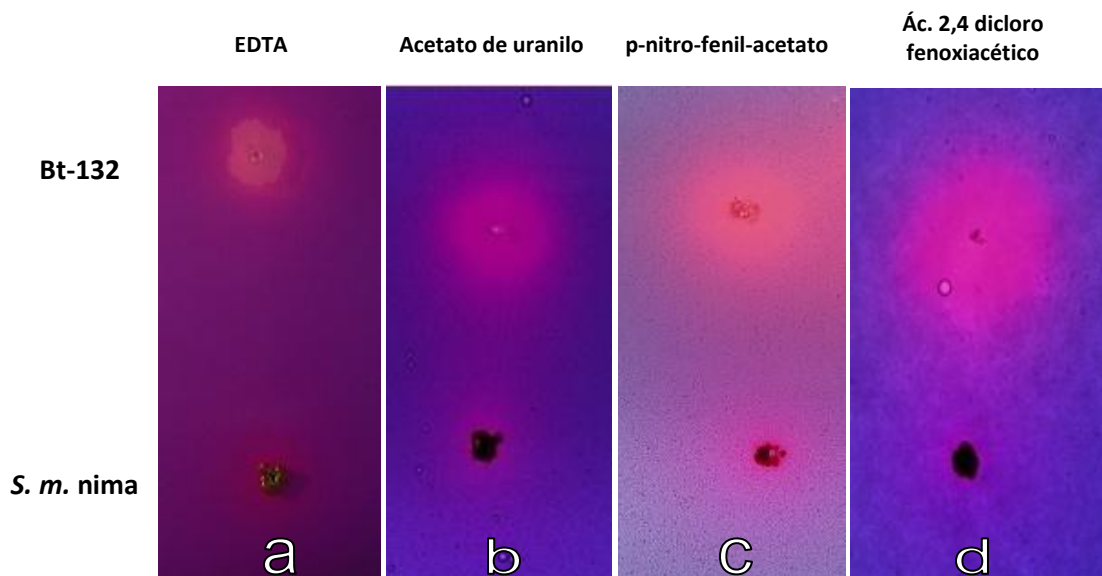


Figura 6. Evaluación en placa de la desacetilación enzimática de sustancias xenobióticas acetiladas, adicionadas como únicas fuentes de carbono a un medio sintético, con nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. EDTA 0.025 g/L (a), acetato de uranilo 0.375 g/L (b), p-nitrofenilacetato 0.125 g/L (c), 2,4-diclorofenoxiacético 0.375 g/L (d).

Volviendo a la Figura 6, donde se muestra claramente que Bt-132, y en menor grado *S. marcescens* Nima, producen una enzima capaz de desacetilar las sustancias xenobióticas ensayadas puede agregarse que este tipo de actividad no ha sido reportado previamente en Bt, aún cuando se conoce que las desacetilasas microbianas pueden estar involucradas en una amplia variedad de eventos. Esto podría deberse, primero, a que un mismo microorganismo tiene la potencialidad de producir varias desacetilasas (Trudel & Asselin 1990; Deising & Siegrist 1995; Nahar *et al.* 2004; Kim *et al.* 2008). Tales desacetilasas pueden producirse en momentos particulares de la curva de crecimiento (Davis & Bartnicki-García 1984; Tsigos & Bouriotis 1995; Christodoulidou *et al.* 1999; Baker *et al.* 2007; Yamada *et al.* 2008). Sus funciones biológicas pueden ser diversas, la más conocida es la formación de quitosana a partir de quitina, mediante una acción concertada entre la quitina sintetasa y la QDA, ubicadas en el espacio periplásmico de *M. rouxii* (Davis & Bartnicki-García 1984). Este mismo mecanismo funciona en *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo la producción de una capa protectora de quitosana para las ascosporas en vías de maduración. En este proceso se involucran dos isoenzimas desacetilantes (Christodoulidou *et al.* 1999). Algo similar se ha demostrado en *Schizosaccharomyces*

pombe y *Cryptococcus neoformas*, donde también se involucra la acción concertada de distintas desacetilasas (Matsuo *et al.* 2005; Baker *et al.* 2007).

También se ha involucrado a la QDA en la protección de las hifas de hongos fitopatógenos, las cuales contienen quitina, que al ser transformada en quitosana por la acción de la QDA, no puede ya ser atacada por las quitinasas secretadas por las plantas infectadas. Este mecanismo de evasión de las defensas del huésped, se ha descrito para explicar el ataque de muchos hongos invasores (Gueddari *et al.* 2002). Sin embargo no todos los hongos fitopatógenos poseen estos mecanismos protectores, de modo que muchas veces deben enfrentar sofisticados mecanismos de resistencia, que incluyen la secreción de diversas hidrolasas como las quitinasas, las quitosanasas y las β 1,3 glucanasas, producidas como enzimas antifúngicas por la mayoría de las plantas. En el caso de las quitinasas, la quitina fúngica es transformada en oligómeros de NAG, que pueden actuar como disparadores de mecanismos de defensa vegetales (Zhao *et al.* 2010-a).

Otras funciones biológicas han sido referidas para las QDA, por ejemplo en la esporulación, la germinación de las esporas, el crecimiento vegetativo y en las interacciones huésped-parásito (Psylinakis *et al.* 2005). Sin embargo ninguna alude a su posible rol en la degradación de sustancias xenobióticas, debido a su poca especificidad como fue el caso de la QDA de Bt-132 ya referida. Esta es una propuesta novedosa que deriva de la presente investigación.

6.3. Ensayos tamiz (screening) para identificar microorganismos productores de QDA

Con base en su multiplicidad de funciones biológicas, como por su posible utilización práctica para convertir la quitina en quitosana, y los quitooligosacáridos acetilados en sus equivalentes desacetilados, sustancias todas de gran interés práctico, y en algunos casos también compuestos de alto valor agregado, hay gran interés por encontrar nuevos microorganismos productores de QDA. Las técnicas más usadas para encontrar tales microorganismos han sido las que ofrece la genética molecular, como es la identificación previa de los genes codificantes para las diversas QDAs conocidas en el genoma microbiano. También se ha propuesto buscar nuevas fuentes de QDA en el material genético de microorganismos no cultivables, presentes en un ambiente determinado, sin necesidad de cultivarlos, usando técnicas metagenómicas (Lorenz & Eck 2005). Cuando ya se ha encontrado el microorganismo productor de QDA, éste debe cultivarse en un medio conveniente, y los niveles de QDA pueden evaluarse por métodos enzimológicos convencionales (Kim *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2010-b). También de acuerdo a la microbiología clásica se ha buscado incrementar los niveles de QDA por mutación con bromuro de etidio, lográndose duplicar los niveles de enzima (Pareek *et al.* 2011). En otras palabras las técnicas utilizadas hasta ahora para identificar y aislar microorganismos productores de QDA son caras, laboriosas y tardadas. Para ilustrarlo podría considerarse un ejemplo relativamente reciente (Amorim *et al.* 2005), en donde se usó la N-acetilquitopentaosa como sustrato para discernir cual, entre las varias cepas comparadas de *Cunninghamella bertholletia*, producía mayores niveles de una QDA intracelular, capaz de desacetilar el pentasacárido mencionado. El proceso iniciaba con el cultivo de los microorganismos durante 5 días a 28 °C; el micelio era colectado y lisado por homogeneización mecánica con perlas de vidrio. El lisado era tratado después con sulfato de amonio, para obtener una preparación parcialmente purificada, la cual se hacía reaccionar con el sustrato durante 30 min a 50 °C, y el ácido acético liberado por la acción desacetilante, se determinaba con un kit particular de reactivos (F-kit) de Boehringer Mannheim.

En el presente trabajo se propone una técnica más sencilla, rápida y económica, la cual permite evidenciar no sólo la QDA, sino otro tipo de desacetilasas, como las lipasas, cuya acción libera ácidos grasos. Tanto el ácido acético liberado por la QDA, como los ácidos grasos que resultan de la hidrólisis catalizada por lipasas, acidifican la zona que rodea a las colonias de los microorganismos en estudio; de modo que si se añade al medio sólido el indicador de pH resazurina, pueden visualizarse como halos de color rosa sobre un fondo azul intenso, los cuales resultan del incremento en la acidez (ver Figura 6). Esta técnica sencilla, económica y más rápida que la referida arriba, permitió demostrar en un trabajo previo (Nava Arenas 2009) que el 82 % de 132 cepas de Bt comparadas, daban positivo el ensayo de QDA. También permitió hacer algunos estudios preliminares de la regulación de la síntesis de QDA.

6.4. Instauration de una técnica cuantitativa para evaluar la QDA

La técnica espectrofotométrica para evaluar la QDA, se basa en la cuantificación de la glucosamina resultante de la desacetilación de los residuos de N-acetilglucosamina presentes en el glicol-quitina. La técnica aunque laboriosa, resultó sensible y reproducible. Los detalles de la misma fueron descritos en el capítulo correspondiente a Materiales y Métodos.

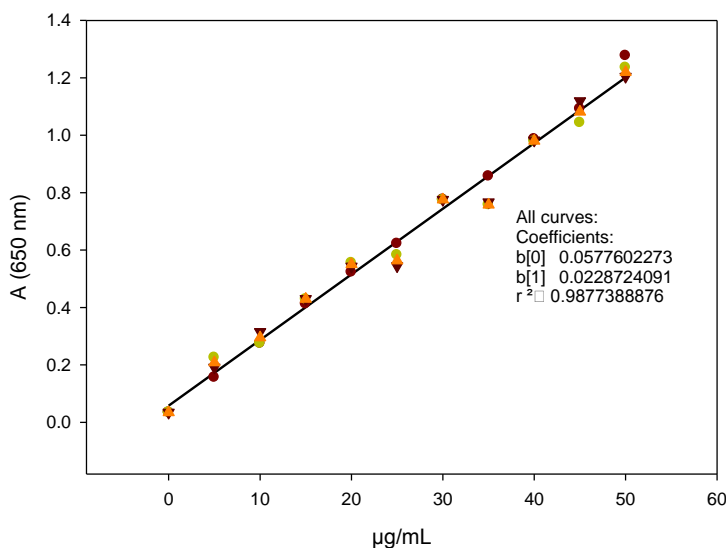


Figura 7. Curva tipo de glucosamina obtenida de cuatro series de datos (arriba). En la parte inferior se muestra el incremento en la coloración azul, conforme aumenta la concentración de glucosamina.

En la Figura 7, se muestra la curva tipo de glucosamina, obtenida a partir de cuatro series de datos, con los cuales se pudo concluir que dicha curva presentaba una linealidad en el rango de trabajo ($r=0.9938$), un límite de detección de $A_{650}=0.1197$ ($2.71 \mu\text{g/mL}$), un límite de cuantificación $A_{650}=0.2641$ ($9.02 \mu\text{g/mL}$), un límite de decisión $A_{650}=0.1815$ ($5.33 \mu\text{g/mL}$), con un intervalo de

trabajo de 4.29 - 50 µg/mL.

Respecto a la metodología utilizada para evaluar la actividad de la QDA, se hizo una indagación bibliográfica que permitió concluir los siguientes puntos.

QDA

- A)** En base a la ecuación: **quitina** -----> **quitosana + ácido acético**, donde se valoran los productos de la reacción, por lo tanto se tienen dos grupos de métodos; en unos se valora la cantidad de glucosamina contenida en la quitosana producida; dicho azúcar resulta de la desacetilación de la N-acetil.glucosamina (NAG) contenida en la quitina sustrato. En las otras técnicas se valora el ácido acético producido en la reacción. Ambas opciones metodológicas coexisten y se emplean ampliamente.
- B)** Los sustratos utilizados para evaluar la QDA son sustancias solubles como la glicol-quitina, o bien oligosacáridos como la quitobiosa (el dímero de NAG), o más usualmente la N-acetil-quitopentaosa o la N-acetil-quitohexaosa. Debe considerarse que los quitoooligosacáridos puros son sustratos caros.
- C)** Los métodos basados en la evaluación de la glucosamina, son de tipo colorimétrico siendo las opciones más simples y económicas, además de confiables y reproducibles, como ocurrió en el presente trabajo. La reacción se inicia con una desaminación de las hexosaminas con ácido nitroso, lo que da lugar a la formación de 2,5 anhidrohexosas, las cuales pueden evidenciarse colorimétricamente a 492 nm cuando se hacen reaccionar con indol (Dishe & Borenfreund 1950), o a 650 nm si se utiliza 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) de acuerdo a Tsuji *et al.* (1969). En un trabajo previo (Nava Arenas 2009), se demostró que la segunda opción ofrece mayores ventajas.
- D)** Los métodos basados en la evaluación del ácido acético producidos por la acción de la QDA, ofrecen un mayor número de opciones. Pueden ser estimaciones radio métricas con contadores de centelleo, cuando se utiliza como sustrato a la glicol-quitina marcada en sus grupos acetilo con ³H o con ¹⁴C. Dicho sustrato se prepara acetilando la glicol-quitosana con anhídrido acético marcado con uno u otro isotopo radioactivo, de acuerdo a la técnica de Araki *et al.* (1971). Estas

evaluaciones radiométricas se han utilizado preferentemente para averiguar las diferentes funciones atribuidas a la QDA.

- E) Para la evaluación rutinaria de la QDA, se han utilizado “kits” comerciales destinados a evaluar el ácido acético. Sus fabricantes son principalmente las casas Boheringer-Mannheim y Roche. Los kits son de dos tipos y en ambos casos el fundamento es el acoplamiento de varias reacciones enzimáticas, en una de las cuales se produce o se consume $\text{NADH} + \text{H}^+$, el cual se evalúa espectrofotométricamente a 340 nm. Ambas determinaciones espectrofotométricas se basan en un artículo publicado por Bergmeyer y Möllemug (1974). Como es fácil imaginar, estos cocteles de enzimas y sustratos son caros y de duración limitada, considerando que la vida media de las enzimas depende de muchos factores físicos y químicos.

Otra forma de evaluar el ácido acético producido por la acción QDA requiere de instrumentación cara como los equipos de HPLC. Al respecto, Joworska y Konieczna (2006) refieren haber usado un instrumento Waters 625 LC con una columna para ácidos orgánicos Hyper REZXP, a 60 °C, eluyendo con H_2SO_4 0.0025M a una velocidad de 0.5 mL/min. Por otra parte, no se encontró referencia alguna donde el acetato fuera evaluado por cromatografía de gases, aunque esta acción es factible. Cabe agregar por último, que en orden de frecuencia, los métodos más utilizados han sido los basados en el uso de “kits” comerciales, luego las técnicas radiométricas, y después las colorimétricas, como la utilizada en el presente estudio.

6.5. Ubicación celular de la QDA

En el presente trabajo se confirmó que Bt-132 no secreta su QDA al medio de cultivo, como fue reportado previamente (Nava Arenas 2009). También se demostró que su actividad puede ser medida eficazmente usando las células completas, lo que sugiere que se encuentra accesible en la envoltura bacteriana. Puede comentarse al respecto que la mayoría de los estudios relativos a la QDA se han realizado en hongos y no en bacterias, y en aquellos se ha encontrado que la QDA es siempre una glicoproteína extracelular, que a veces se queda retenida en el espacio periplásmico, y por eso indebidamente se les denomina “intracelulares”. Para su evaluación y purificación se requiere obtener lisados celulares como ocurre en *M. rouxii* (Kafetzopoulos *et al.* 1993); en *Absidia coerulea* (Gao *et al.* 1995), y también en *Aspergillus nidulans* (Alfonso *et al.* 1995). En otros casos la enzima es secretada al medio y se recupera fácilmente en el sobrenadante de los cultivos, como ocurre en *Scopulariopsis brevicaulis* (Cai *et al.* 2006). A las QDAs ubicadas en el espacio periplásmico se les ha conferido un rol importante en la estructuración y modificación química de la pared celular; a las extracelulares se les ha relacionado con el crecimiento y la autólisis del micelio. También se ha encontrado que las QDA periplásmicas son inhibidas por el acetato, en tanto que esto no ocurre con las extracelulares.

Con respecto a la ubicación de las QDA en bacterias, no se encontraron estudios específicos; sin embargo, el hecho de que se usen lisados celulares obtenidos por sonicación, como la fuente de enzima (Psylinakis *et al.* 2005), hace pensar que en el caso de *B. cereus* y *B. anthracis* se trata de QDAs periplásmicas. Estos datos coinciden con lo encontrado en *B. thuringiensis* en el presente estudio. Ya que es bien conocido que las tres especies bacterianas mencionadas son genéticamente indistinguibles. En cambio en la bacteria marina *Vibrio parahaemolyticus* se encontró un sistema extracelular formado por una quitinasa y una oligosacárido desacetilasa, capaz de desacetilar la N-acetilquitohexaosa (Kadokura *et al.* 2007). La acción sinérgica de esas dos enzimas podía transformar la quitina en una mezcla de oligosacáridos parcialmente desacetilados, llamados hetero-oligosacáridos por contener unidades de NAG y de glucosamina. Dichos

hetero-oligosacáridos podrían tener propiedades reguladoras interesantes, pues se encontró que el disacárido formado por NAG-glucosamina, es un eficaz inductor de la quitinasa en diferentes especies de *Vibrio* (Hirano *et al.* 2009). Este no es el caso de la QDA de Bt-132, pues como se observa en la Figura 8 no es una enzima inducible, dado que se formó en mayor proporción en caldo nutritivo sin adición de quitina. Otro aspecto evidente, como ya se mencionó fue que la QDA está asociada a la célula. Sin embargo quedó claro que al autolizarse la célula, parte de la QDA se solubilizó y otra parte quedó asociada a alguna estructura, que podría ser la pared y/o la membrana celular, como ya fue sugerido por Nava Arenas (2009). Así también, los datos de la Figura 8, obtenidos en cultivos sumergidos, demostraron que las células crecidas en caldo nutritivo poseen una alta actividad específica de QDA, la cual disminuye 50 % si se añade quitina al medio. La producción de QDA en el medio sintético basal con y sin quitina, fue apenas un 10% de la obtenida en caldo nutritivo. Las curvas

de crecimiento (datos no mostrados) en los cuatro medios referidos fueron similares, no obstante su diferente composición. Tampoco se modificó el tiempo de autólisis que en todos los casos fue cercano a 36 h. En vista de estos resultados se adoptó el caldo nutritivo como el medio propicio para producir la QDA, así como un tiempo de 36 h a 28 °C y 180 rpm para obtener las células autolisadas, de modo que podía evaluarse la QDA en los restos celulares sedimentables por centrifugación, así como en el sobrenadante respectivo.

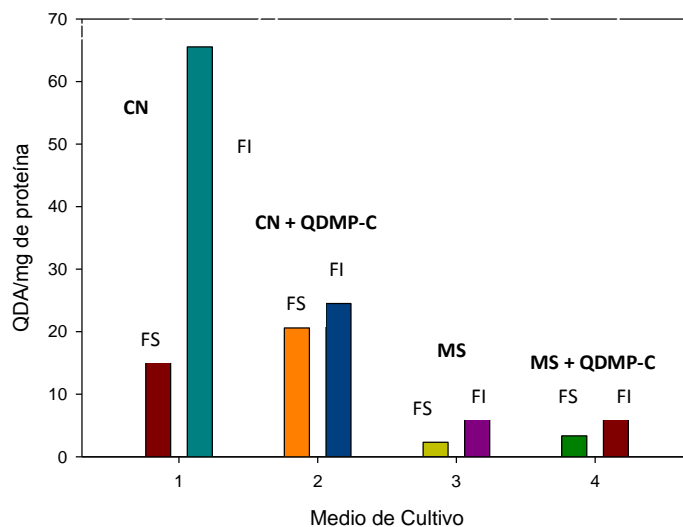


Figura 8. Actividad de QDA en las fracciones soluble e insoluble, recuperadas después de centrifugar cultivos autolisados de Bt-132, obtenidos de diferentes medios de cultivo. Fracción soluble (FS), fracción insoluble (FI), caldo nutritivo (1), caldo nutritivo + QDMP-C (2), medio sintético (3), medio sintético + QDMP-C (4). La abreviatura QDMP-C significa quitina desmineralizada, desproteínizada y coloidizada.

Así pues, el hecho de utilizar células como fuente de QDA, para evaluar su actividad, permite suponer que dicha enzima se encuentra unida a la célula, probablemente a la pared celular.

6.6. Regulación de la síntesis de la QDA

Otro aspecto investigado fue aclarar si la síntesis de la QDA era reprimida por la adición al medio de cultivo, de monosacáridos como glucosa, glucosamina y N-acetilglucosamina. Los primeros ensayos se hicieron en placa, utilizando tanto agar nutritivo como medio sintético adicionados de quitina coloidal desmineralizada y desproteínizada, con y sin glucosa. Además, como microorganismo de referencia se incluyó a *Serratia marcescens* cepa Nima, cuya quitinasa es inducible y reprimible por glucosa. Los resultados (Figura 9) mostraron que Bt-132 produjo la QDA en ambos medios, en presencia o ausencia de glucosa. En cambio, la quitinasa de *S. marcescens* Nima requería la presencia de quitina como un inductor, así como la ausencia de glucosa, ya que en presencia de este azúcar la enzima no se produjo (ver Figuras 9a y 9b). Un inconveniente de esta técnica en placa fue que no permitió visualizar la producción de la QDA en un medio formado sólo por agar nutritivo, pues al no estar presente la quitina coloidizada, no ocurrió su desacetilación, la cual se visualiza por el vire azul a rosa del indicador de pH resazurina. Otro inconveniente de la técnica referida, para visualizar la regulación por glucosa de la síntesis de QDA, fue que el vire de color de la resazurina dio colores amarillos más que rosas al emplear el medio sintético. Este hecho se atribuyó a que dicho medio contenía glicerol y glucosa, compuestos que al ser metabolizados daban lugar a la producción de diversos ácidos orgánicos, y no sólo del acetato producido por la acción de la QDA; lo cual podría acidificar en exceso el entorno que rodeaba las colonias bacterianas (ver Figuras 9c y 9d).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

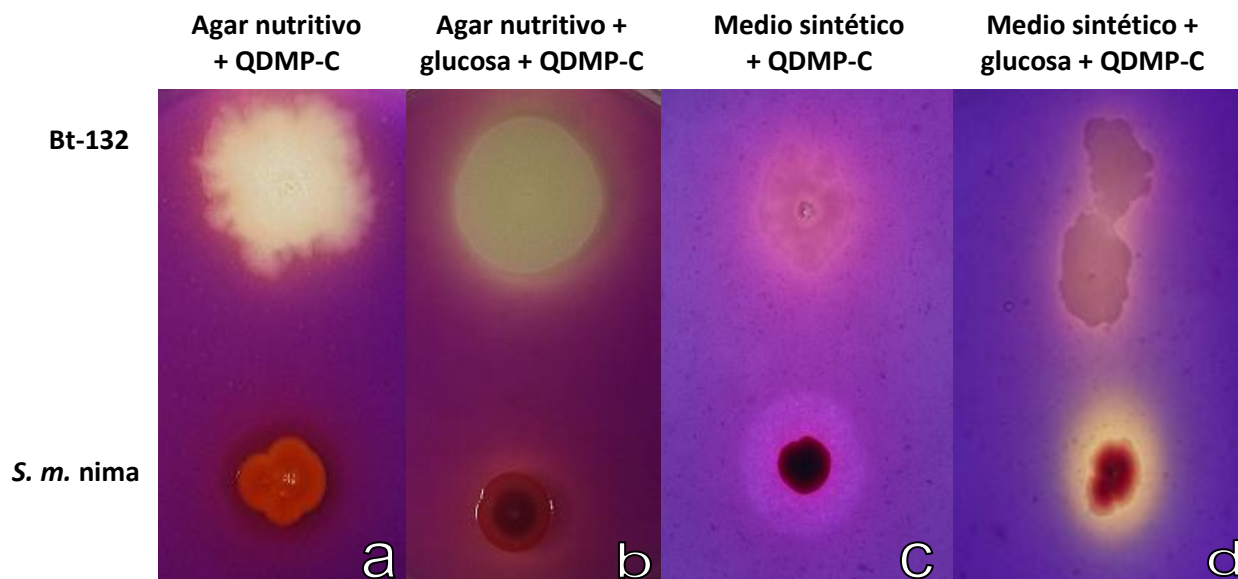


Figura 9. Regulación por glucosa de la síntesis de QDA. En (a) se muestra la producción de quitinasa y QDA en un medio constituido por agar nutritivo y QDMP-C al 10 % (peso húmedo/v). Puede verse que Bt-132 forma la QDA pero no la quitinasa, en cambio *S. marcescens* Nima produce simultáneamente ambas enzimas. En (b) se añadió glucosa al medio anterior y Bt-132 continuó produciendo QDA, lo que indica que no es reprimible por glucosa; en cambio *S. marcescens* Nima ya no produjo quitinasa, pues su sistema quitinolítico sí fue reprimido. En (c) se muestra la producción de quitinasa y QDA en un medio sintético adicionado de QDMP-C al 10% (ph/v). En (d) se muestran los resultados en el mismo medio que en (c) pero adicionado de glucosa al 1 %. Quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada (QDMP-C).

Otro inconveniente de los ensayos en placa, es que sólo dan una respuesta de “sí” o “no” se produce la QDA, pero al no ser un ensayo cuantitativo, no permiten evaluar fluctuaciones porcentuales de la producción de la enzima, por esa razón se realizaron otros experimentos en cultivo sumergido, cultivando a Bt-132 en caldo nutritivo sólo, o adicionado de glucosa, glucosamina o NAG al 1%. El crecimiento bacteriano se evaluó midiendo la turbiedad de los cultivos a 600 nm. Los resultados correspondientes a las curvas de crecimiento en los cuatro medios se muestran en la Figura 10, donde puede observarse que los tres azúcares, particularmente la glucosa estimularon la multiplicación celular; sin embargo los niveles de QDA se vieron disminuidos, según se aprecia en la Figura 11. Cabe aclarar que la enzima fue evaluada en estos casos usando las células completas, dado que a tiempos cortos las células no se han autolizado todavía; y la enzima permanece asociada a la bacteria. Si se considera que la cantidad de QDA producida en caldo nutritivo es 100%, entonces los niveles producidos en presencia de glucosa, NAG y

glucosamina fueron 83.7, 34.8 y 30.2 %, respectivamente. Estos datos permiten concluir que aunque la síntesis de QDA es constitutiva; su síntesis sí puede ser reprimida en diverso grado por los monosacáridos ensayados, siendo el más efectivo la glucosamina, que es el aminoazúcar componente de la quitosana.

Cabe agregar que en este experimento se hicieron también evaluaciones del consumo de NAG y de glucosamina, las cuales reprimieron la síntesis de QDA más eficientemente (65.2 y 69.8 %) que la glucosa (16.3 %). En la Figura 12 se muestra que ambos azúcares fueron consumidos, aunque lo fue más la NAG, no obstante que la glucosamina fue el inhibidor más efectivo. En la misma Figura 12, se muestra que las curvas de crecimiento de Bt-132 fueron muy similares, cuando ambos aminoazúcares sirvieron como fuente de carbono y de nitrógeno.

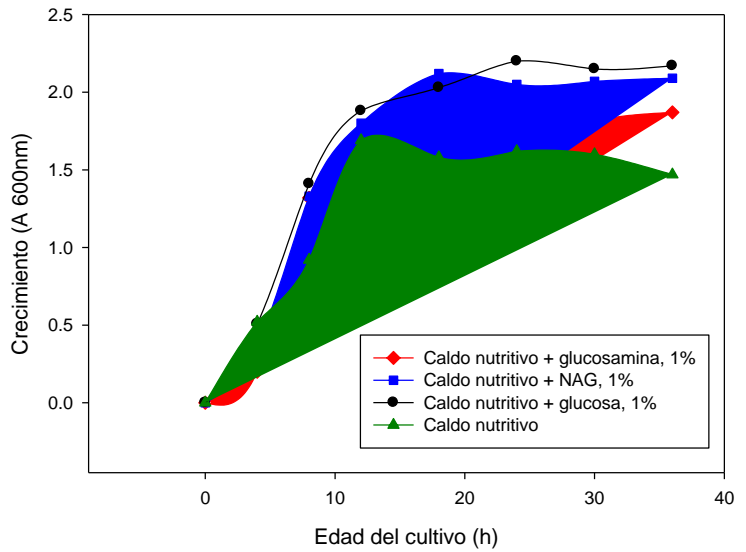


Figura 10. Curvas de crecimiento de *B. thuringiensis* cepa Bt-132 en medios formulados con caldo nutritivo adicionado con diferentes monosacáridos.

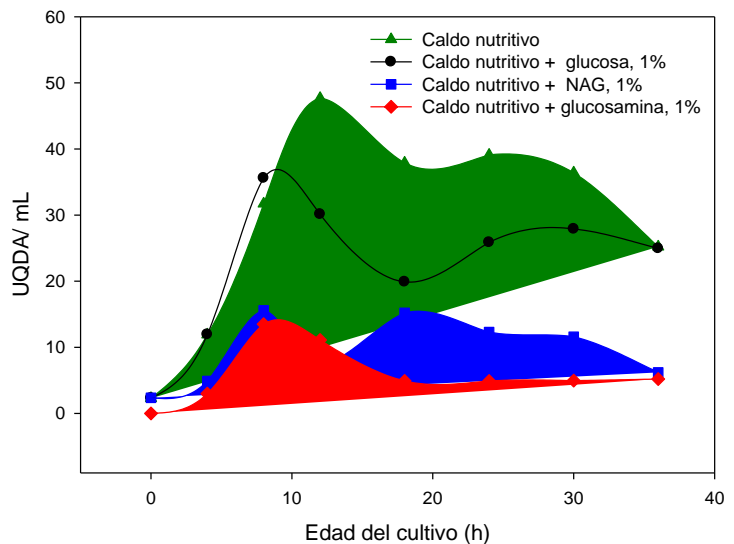


Figura 11. Actividad de la QDA presente en las células cultivadas en caldo nutritivo sólo o adicionado de diferentes monosacáridos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se buscó en la bibliografía información previa sobre la inhibición por aminoazúcares y glucosa, de la síntesis de QDA, no se encontró dato alguno. Todos los estudios se han centrado en el efecto del acetato, aspecto al que se referirá posteriormente.

Con objeto de comentar los datos derivados del presente trabajo, es conveniente puntualizar primero que la QDA de Bt-132 se comportó como una enzima constitutiva, pues su síntesis no requirió la presencia de quitina; por lo contrario, la adición de esta sustancia al caldo nutritivo bajó mucho los niveles de enzima (Figura 8). No obstante su síntesis fue reprimida en diverso grado por la adición de glucosa, NAG o glucosamina al medio de cultivo. La represión por glucosa es un fenómeno muy estudiado, reportado tanto en enzimas inducibles como constitutivas. En nuestro caso, las curvas de crecimiento mostradas en la Figuras 10 y 12, sugieren claramente que los azúcares añadidos se consumieron rápidamente y no parece haber un fenómeno de diauxia.

La represión catabólica, conocida también como “efecto glucosa” se ha observado en múltiples ocasiones, tanto en enzimas inducibles como constitutivas. Se sabe que el fenómeno ocurre a nivel de transcripción, y que es regulado por los niveles de AMP cíclico, un nucleótido requerido para la iniciación de la transcripción. Esta sustancia se une a una proteína alostérica llamada CAP (catabolite activator protein); como resultado de esta interacción, la CAP puede unirse ya a un sitio específico en el promotor (CAP site), lo cual favorece la unión de la RNA polimerasa también al promotor, para que se inicie la transcripción y la síntesis del RNA mensajero correspondiente (Todar K. 2009; <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/regulation.html>). No se conoce si

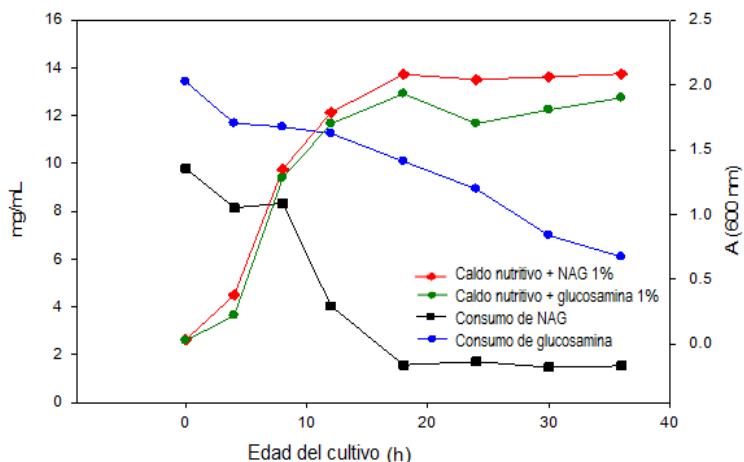


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de Bt-132 en caldo nutritivo adicionado de NAG o glucosamina ambos al 1% así como el consumo de dichos monosacáridos. La glucosamina se evaluó por la técnica de Morgan-Elson (1934) y la NAG por la técnica de Morgan-Elson modificada por Reissig (1955).

para explicar la represión por glucosa y aminoazúcares de la síntesis de QDA, una enzima constitutiva, se requieren sistemas transcripcionales tan sofisticados, como el referido anteriormente. Lo que sí se conoce es que el aprovechamiento anabólico de la NAG y de la glucosamina, ocurre por una ruta común (Yadav *et al.* 2011).

Volviendo al punto de que la QDA de Bt-132 se comportó como una enzima constitutiva, reprimible por glucosa y aminoazúcares, se puede recordar que las enzimas constitutivas típicas se forman en ausencia de un inductor. Dentro de esta categoría se incluyen enzimas de importancia vital, como aquellas involucradas en el ciclo de Krebs y en la glicolisis. La concentración intracelular de dichas enzimas se mantiene constante, o fluctúan muy poco al modificar la composición del medio de cultivo. En el caso de la QDA de Bt-132, la enzima se produjo a alta concentración en un medio rico (caldo nutritivo), pero sus niveles disminuyeron notoriamente al añadir quitina (supuesto inductor), o al usar un medio sintético (ver Figura 8). Esto puede interpretarse como el caso de una enzima constitutiva, cuya síntesis es muy sensible a la composición del medio de cultivo, lo que sugiere que su formación sí está regulada. En plan especulativo se podría pensar que existen dos tipos de enzimas constitutivas, aquellas que tienen una importancia vital, y que participan en rutas metabólicas imprescindibles, como la glicólisis y el ciclo de Krebs, y otras que tienen roles secundarios, como podría ser el caso de la QDA. Al respecto se han hecho estudios en *B. thuringiensis* sobre la función de la QDA, obteniendo mutantes incapaces de producirla. Se ha encontrado que dicha mutación es importante, más no letal en lo inmediato, dado que dichas mutantes producen esporas defectuosas por carecer de una de sus cubiertas (cortex). Esto afecta la esporulación y la germinación (Hu *et al.* 2006). Es indudable que a largo plazo, una mutación de este tipo podría afectar la sobrevivencia de la bacteria. Por fortuna también existen mecanismos reparadores de mutaciones genéticas.

Por último, aún cuando en el presente estudio no se incluyó la regulación por acetato de la QDA de Bt-132, vale la pena referirse a ésta, por ser un aspecto muy recurrente en la bibliografía consultada. Cuando la QDA desacetila a la quitina se forman quitosana y acetato, por lo tanto la inhibición por acetato podría enmarcarse en la modalidad de

“inhibición por producto final”. Se ha encontrado que las QDA de origen periplásmico (como sería el caso de Bt-132) son inhibidas por acetato. Por ejemplo la QDA de *M. rouxii* es inhibida en un 90 % por acetato a 250 mM (Kafetzopoulos *et al.* 1993). Es interesante recordar que los inhibidores competitivos son aquellos que se parecen estructuralmente al sustrato, y en este caso el acetato y la quitina no se parecen si se consideran las estructuras globales de ambas sustancias, pero sí se encuentra parecido cuando el acetato se compara sólo con los radicales N-acetilo, presentes en cada unidad de NAG que conforman a la quitina. Tales radicales son el sitio de la acción hidrolítica de la QDA, que da lugar a la liberación de iones acetato (Jaworska 2010).

El efecto del acetato, sin embargo, puede ser complejo, pues en la mayoría de los casos no se observa ninguna acción, en tanto que en otros, como el de *A. nidulans*, el acetato 0.4-4 mM tiene un efecto activador sobre la QDA (Alfonso *et al.* 1995; Ghormade *et al.* 2010).

6.7. Liberación de la quitina desacetilasa

Como ya se mencionó, los primeros experimentos realizados en la presente investigación confirmaron hallazgos previos que indicaban que la QDA no se secreta, sino que se encuentra posiblemente asociada a la pared bacteriana, por lo cual se procedió a buscar un procedimiento adecuado para su liberación. Con este propósito se exploraron dos alternativas diferentes: liberación mecánica y liberación “natural”, permitiendo que las células llegasen a la fase de autólisis. En estos experimentos se utilizaron células bacterianas cultivadas en caldo nutritivo durante 12 h. Dichas células se colectaron y lavaron tres veces suspendiéndolas en regulador de tetraborato de sodio 0.05 M, pH 7.0, y centrifugando a 5000 rpm/10 min. La muestra a utilizar contenía 1 g de células (peso húmedo) suspendidas en 5 mL del regulador mencionado. Con dicha muestra se procedió como sigue:

Liberación mecánica. Para este propósito, se utilizaron tres dispositivos bajo condiciones diferentes:

A) Homogeneizador Potter, con y sin abrasivo (sílica gel, MERCK, Art. 7744) en una proporción 1:1 (ph/p), con respecto a la cantidad de células empleada. La operación se realizó observando el daño celular al microscopio, y midiendo la actividad de la QDA y la proteína liberada, en un intervalo de 21 min con toma de muestra cada 3 min. El mejor resultado se obtuvo a los 15 min. Cabe mencionar que las muestras se mantuvieron siempre en hielo y cada 3 min se realizaron descansos de 1 min. Los resultados mostraron que este procedimiento fue 50% mejor sin abrasivo, puesto que se obtuvo una actividad específica de 32.46 U_{QDA}/mg, con respecto a las 12.46 U_{QDA}/mg obtenidas al emplear el abrasivo.

B) Sonicador de aguja (Cole Parmer, CP-400), para el cual se probaron tres tiempos (3, 6 y 9 min), así como tres potencias del sonicador (15, 25 y 35%). Los resultados obtenidos mostraron que a mayor tiempo y potencia, más cantidad de proteína liberada y con ello mayor actividad enzimática. Por lo tanto, el mejor dato obtenido se observó a los 9 min con 35% de potencia (22.57 U_{QDA}/mg de proteína, contenidos en 5 mL de tetraborato de sodio 0.05 M, pH 7.0).

C) Vórtex, para su empleo se utilizó una proporción de células: perlas de vidrio de 1:7, y se operó de manera similar a cuando se usó el homogenizador Potter, con la diferencia de que sólo se mantuvo en hielo cuando se realizaron los descansos. Debido quizá a que este fue un proceso menos controlado que los anteriores, y a que también resultó más destructivo, los resultados obtenidos en este caso fueron los menos favorables, ya que en los mismos 5 mL de muestra tratada se obtuvieron 4.18 U_{QDA}/ mg de proteína.

C) Autólisis celular. Continuando con la suposición de que la QDA se encuentra en la zona periférica de la bacteria, y aprovechando la capacidad de *B. thuringiensis* cepa Bt-132 de autolizarse, esta técnica fue empleada como un método más, para la liberación de la enzima. La autólisis se propició bajo dos condiciones diferentes: sin agitación (4 °C, 96 h, pH 7.0) y con agitación a 180 rpm, 28 °C, 96 h utilizando dos pH diferentes 7.0 y 4.5. En todos los casos se utilizó como amortiguador el tetraborato de sodio 0.05 M, según fuera

el pH requerido, utilizando como muestra 1 g de células enteras (peso húmedo), provenientes de un cultivo sumergido de 12 h. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos de liberación y solubilización de la QDA mediante autólisis celular.

Condiciones de autólisis	Muestra colectada	Proteína Total (mg)	Actividad Total (UQDA)	Actividad Específica (U _{QDA} /mg)	Enzima liberada en sobrenadante* (%)	Enzima retenida en las células* (%)
4 °C, 96 h	Sobrenadante, pH 7.0	0.3625	47.132	130.02	24.22	75.78
28 °C, 96 h	Sobrenadante, pH 4.5	0.3147	132.10	419.77	67.88	32.12
	Sobrenadante, pH 7.0	0.2134	126.192	591.34	64.85	35.15

* El 100% representa la actividad enzimática cuantificada en las células enteras, antes de ser procesadas.

Como puede observarse, en la autólisis efectuada en reposo sólo se pudo recuperar el 24.22% de la enzima. Por el contrario, cuando se realizó en condiciones de agitación los resultados fueron más favorables, obteniéndose un porcentaje de liberación y solubilización de la QDA del 67.88% al utilizar pH 4.5, y del 64.85% a pH 7.0. Sin embargo, aunque se obtuvo un 3% más de enzima soluble a pH 4.5, ésta diferencia no se consideró significativa; y por otra parte se obtuvo una mayor actividad específica a pH 7.0, lo cual podría indicar que en estas condiciones la QDA es más estable y/o se encuentra con menos proteína contaminante. Además, al trabajar a pH 7.0 se podrían facilitar las siguientes etapas de purificación. Por lo tanto, se decidió utilizar este procedimiento de extracción y solubilización de la enzima para el resto de la investigación.

A continuación se presentan en forma resumida los resultados obtenidos en esta primera fase de la purificación de la QDA, la cual concierne a su liberación y solubilización. Cabe mencionar además, que en todos los métodos ensayados, la muestra tratada fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante colectado se filtró en membranas millipore con poros de 0.22 µm, antes de determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática.

Tabla 6. Liberación y solubilización de la QDA de *Bacillus thuringiensis* Bt-132, utilizando diferentes técnicas de ruptura.

Técnicas de liberación	Condiciones utilizadas	Proteína Total obtenida (mg)	U _{QDA} totales obtenidas	Actividad Específica (U _{QDA} /mg de proteína)	U _{QDA} en sobrenadante* (% de enzima) solubilizada	U _{QDA} retenidas en los restos celulares* (%)
Células enteras sin tratamiento	12 h, 28 °C, 180 rpm	6.2915	194.60	30.93	-	100
Homogeneizador Potter	Con sílica gel, 1:1	1.74	21.65	12.46	11.13	88.87
Sonicación	9 min, 35% de potencia	5.68	128.20	22.56	65.88	34.12
Vórtex	Con perlas de vidrio, 1:7	9.55	39.95	4.18	20.53	79.47
Autólisis celular	Sobrenadante, pH 7.0	0.2134	126.192	591.34	64.85	35.15

* % de enzima solubilizada de acuerdo a la actividad enzimática obtenida. El 100% representa la actividad enzimática encontrada en las células enteras antes de ser procesadas. Volumen de muestra: 5 mL. Regulador: tetraborato de sodio 0.05 M pH 7.0. Células enteras de 12 h de edad. 1g (peso húmedo) de células.

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 6, la QDA pudo ser recuperada en un 65.88 % en forma soluble en el último sobrenadante ya filtrado, cuando se empleó sonicación. Sin embargo, como se obtuvo también una gran cantidad de proteína, la actividad específica correspondió sólo a 22.56 U_{QDA}/mg, valor inferior al obtenido por una autólisis celular propiciada por agitación a 180 rpm, a 28 °C, durante 96 h, procedimiento que permitió obtener una actividad específica de 591.34 (U_{QDA}/mg). Este dato sugiere que en este caso, la QDA se encuentra en solución, con una menor cantidad de proteínas contaminantes. La Tabla 6 muestra también, que el uso del homogeneizador Potter no es una buena opción para la liberación de la QDA del soma bacteriano, al igual que el agitador vórtex, al menos bajo las condiciones utilizadas.

En relación a esta parte del trabajo, después de una amplia indagación bibliográfica, no se encontró trabajo alguno donde se hubieran comparado diversos métodos para liberar la QDA, como en el presente reporte. Puede agregarse también, que siendo los hongos microscópicos las fuentes de QDA más utilizadas, el proceso seguido para su

liberación incluye en general, lisis mecánica por molienda en mortero, por ejemplo con *M. rouxii* se han usado perlas de vidrio (Araki & Ito 1975). También se ha usado Alumina A-5 (Sigma) en la misma relación para el mismo hongo (Kolodziejska *et al.* 1999). Para el caso de *Colloetrichum lindemuthianum*, se ha usado arena de cuarzo como material abrasivo (Kaus *et al.* 1983). Con menor frecuencia se ha usado un homogeneizador Braun SK, mezclando pesos iguales de micelio y ballotini (Gao *et al.* 1995); en cualquier caso, después de la lisis se realizan dos centrifugaciones sucesivas. El sobrenadante de la segunda centrifugación se emplea como extracto crudo de QDA.

Sin embargo, resulta más apropiado referirse a los métodos de extracción de la enzima, para el caso de las bacterias. Desde luego no existen antecedentes con *B. thuringiensis*, pero sí con *B. cereus*. En este caso Araki *et al.* (1971) usaron vibración sónica de 10 Kc/7 min, seguida de centrifugaciones sucesivas a 5 000 x g/ 15 min y luego 13 000 x g/ 20 min. En otros casos donde también se estudió la QDA de *B. cereus*, sólo se menciona el uso de la sonicación (Psylinakis *et al.* 2005). Lo anterior permite concluir que hasta ahora no se han usado autolisados, como en el presente estudio, lo que representa un método fisiológico y natural de lisis, por lo tanto menos agresivo que aquellos que requieren el empleo de abrasivos o sonicación.

6.8. Caracterización parcial de la QDA a nivel de extracto crudo

Ésta se realizó con el objetivo de conocer algunas propiedades de la enzima, que ayudaran luego a diseñar un protocolo conveniente para su purificación. Los parámetros investigados fueron: temperatura y pH óptimos, así como los efectos de reactivos tiol-específicos, de la urea, de detergentes, del EDTA y de diferentes sales metálicas sobre la actividad enzimática. Los datos obtenidos se concentran en la Tabla 7. Cabe aclarar que tales resultados se obtuvieron siguiendo los pasos referidos en el apartado 5.5 de materiales y métodos.

Tabla 7. Caracterización parcial de la QDA a nivel extracto crudo.

Parámetro	Condiciones	Resultado
Efecto del pH sobre la actividad enzimática	Regulador de acetatos 0.05 M (pH 3-4) Regulador de tetraborato de sodio 0.05 M (pH 4.5-9)	pH óptimo: 4.5 y 6.5
Efecto del pH sobre la estabilidad de la QDA	Intervalo evaluado: pH 3-9 *	El pH afecta la estabilidad enzimática por arriba y por abajo del pH óptimo 4.5
Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	Intervalo evaluado: 10-70 °C pH 4.5	Temperaturas óptimas: 20 y 40 °C
Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la QDA	Intervalo evaluado: 10-70 °C **	QDA termoestable
Efecto de reactivos tiol-específicos sobre la actividad	pHMB 0.001M HgCl ₂ 0.01M	Sin efecto inhibitorio. La actividad no depende de grupos tiol en su sitio activo
Efecto de quelantes	EDTA 0.01 M. Dialisis (durante 180 min) Toma de muestra cada 30 min	Efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. Es una metaloenzima.
Requerimientos iónicos	ZnCl ₂ , CaCl ₂ , CoCl ₂ , MgCl ₂ : 0.01M Temperatura= 40 °C y pH= 4.5	Reactivación del 17% con ZnCl ₂ 0.01 M
Agentes desnaturizantes	<ul style="list-style-type: none"> • Urea: 1, 3, 5 M • Detergentes aniónicos, catiónicos y neutros 	<ul style="list-style-type: none"> • Inactivación del 2, 25 y 59 % • Sin determinar (interferencia de todos los detergentes utilizados con el desarrollo de color)

* Se preincubó la enzima durante 60 min a los pHs indicados, a una temperatura de 40 °C y posteriormente se ajustaron a pH 4.5 para hacer la determinación de la actividad enzimática.

** Se preincubó la enzima durante 60 min a las temperaturas indicadas, a pH 4.5. Después se dejaron durante 15 min a 40 °C para ser evaluadas posteriormente.

Los resultados presentados en la Tabla 7 sugirieron que el extracto crudo de Bt-132 contiene al menos dos QDA, ya que se obtuvieron dos valores óptimos de temperatura y de pH, correspondientes respectivamente a 20 y 40°C, y pH 4.5 y a 6.5. Este hecho puede ser posible, ya que en estudios realizados en *B. cereus* se ha demostrado que en su cromosoma existen al menos 10 copias de los genes con secuencia de bases similares a la QDA de *Mucor rouxii* (Psylinakis *et al.* 2005). Sin embargo, la temperatura óptima adoptada para los experimentos posteriores fue de 40°C, debido a que la actividad enzimática fue mayor a esa temperatura. Igualmente se consideró que el pH de 4.5 podría corresponder al pH óptimo de la enzima mayoritaria, y por eso este valor fue adoptado en lo sucesivo. Otro aspecto importante para el manejo adecuado del extracto crudo enzimático durante el proceso de purificación, fue averiguar su estabilidad respecto al pH.

Los resultados obtenidos demostraron estadísticamente, que la actividad sí era afectada por el cambio de pH ($P < 0.05$), particularmente arriba y abajo del pH 4.5, que como ya fue indicado resultó el óptimo de pH, sugiriendo que en las etapas seleccionadas para la purificación de la QDA había que tener precaución con respecto al pH. Otros datos mostraron que la QDA es una enzima termoestable, lo cual podría deberse a que a nivel de extracto crudo, ésta puede estar protegida por otros componentes del mismo. La termoestabilidad es una característica que podría ser aprovechada para purificar la QDA, propiciando la desnaturalización térmica, con la subsecuente insolubilización de proteínas contaminantes, las cuales serían separadas por centrifugación. Otros autores han encontrado resultados similares (Kafetzopoulos *et al.* 1993, Toharisman & Suhartono 2008).

Por otro lado, al ensayar el efecto de los reactivos tiol-específicos, no se encontró efecto inhibitorio, sobre la actividad de la QDA presente en el extracto crudo, indicando que su actividad no depende de grupos tiol en su sitio activo. Esto concuerda con lo reportado en la mayoría de las enzimas integrantes de la familia CE-4, a la cual pertenece la QDA, donde los grupos catalíticos presentes en su sitio activo comprenden varios residuos de histidina y de ácido aspártico (Blair *et al.* 2006).

Cabe resaltar que la QDA en estudio se comportó como una metaloenzima, lo cual sugiere que debe evitarse durante su purificación el uso de soportes de intercambio iónico. Con base a este antecedente se procedió a investigar cual podría ser el ión requerido por la QDA de *B. thuringiensis*. De acuerdo con los resultados obtenidos fue el Zn^{+2} , el que reactivó a la QDA cruda en un 17%. No se aclaró si el tiempo de contacto hubiera sido superior a 1 h, o si se hubiera incrementado la concentración del ión, se hubiera obtenido una mayor reactivación. Referente a este punto, existen varios reportes realizados principalmente en hongos, donde se encontró que la actividad de la QDA puede ser influenciada por la adición de cationes divalentes. Dicha actividad puede ser mejorada principalmente por Zn^{+2} , Ca^{+2} y Co^{+2} (Zhao *et al.* 2010-a, Blair *et al.* 2005, Ghormade *et al.* 2010). Sin embargo, también se ha encontrado que algunos iones como el Ca^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , no tienen ningún efecto sobre la actividad de la QDA de *M. rouxii* (Kolodziejska *et al.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1999). Y por el contrario, los iones Fe^{+2} , Cu^{+2} y Ni^{+2} principalmente tienen efecto inhibitorio sobre las QDAs (Alfonso *et al.* 1995, Gao *et al.* 1995, Yamada *et al.* 2008, Kim *et al.* 2008, Martinuo *et al.* 2002).

Respecto a la inactivación de la QDA en presencia de urea 1, 3 y 5 M, cuyo efecto al cabo de 1 h provocó una caída de la actividad remanente de 2, 25 y 59%, respectivamente, se puede comentar que la QDA en estudio depende parcialmente de las uniones por puentes de hidrógeno. Por último cuando se investigó si la actividad de la QDA era afectada por la presencia de detergentes de diversos tipos, se encontró que todos ellos interfirieron el desarrollo de color durante la determinación de la actividad de la QDA.

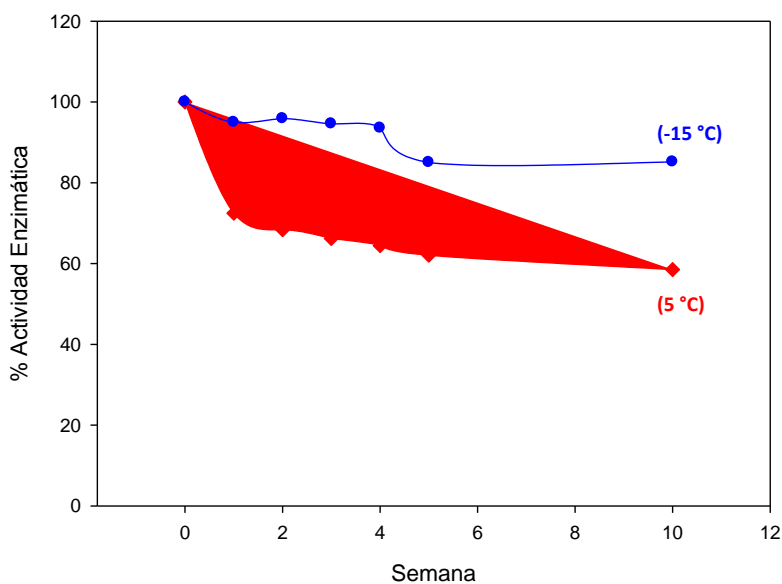


Figura 13. Estabilidad de la QDA de Bt-132 al conservarla a temperaturas de refrigeración (5°C) y congelación (-15 °C).

También se estudió la estabilidad de la QDA bajo condiciones de refrigeración (5 °C) y de congelación (-15 °C), con la finalidad de conocer la permanencia de la actividad en estas condiciones, al paso del tiempo. Los datos obtenidos son mostrados en la Figura 13, donde se puede apreciar que la QDA es

relativamente estable, particularmente en congelación, ya que al cabo de 10 semanas se conserva un 90% de la actividad inicial, en tanto que en refrigeración la actividad se redujo a un 60% del valor inicial. Es posible que estos buenos resultados se deban en parte, a que los extractos enzimáticos crudos fueron previamente filtrados, para eliminar su carga microbiana. Cabe mencionar, que en la literatura el único estudio encontrado sobre el efecto de las condiciones de almacenamiento en la QDA fue el realizado por Farag

(1999) en la QDA de *M. rouxii* presente en el extracto crudo, a 4 °C y -20 °C, cuyos resultados arrojaron que dicha enzima perdió el 30% y 40% respectivamente de su actividad al cabo de 10 días. Con lo cual se puede deducir que la QDA de Bt-132, es mucho más resistente que la de *M. rouxii*. Así pues, las características de la QDA de Bt-132 estudiadas en el presente trabajo, hablan de un modelo de enzima relativamente estable, lo que favorece su purificación.

6.9. Purificación de la quitina desacetilasa

Considerando las características de la QDA como extracto crudo, se prosigió con un protocolo de purificación que comprendió primero una concentración, y luego un fraccionamiento en columna, con dos soportes distintos. Según se indica a continuación, se exploraron cuatro rutas de purificación, las cuales se muestran en la Figura 14.



Figura 14. Alternativas utilizadas para realizar la purificación de la QDA de Bt-132.

En la Figura 14 se plantean cuatro rutas de purificación, basadas en la bibliografía consultada respecto a este punto. Cabe mencionar, que la mayoría de los procesos utilizados involucran un fraccionamiento con sulfato de amonio, seguida de una

recuperación de la muestra concentrada por centrifugación (Kafetzopoulos *et al.* 1993, Farag 1999, Toharisman & Suhartono 2008). La muestra concentrada es fraccionada luego por cromatografía de interacción hidrofóbica empleando fenil sefarosa CL-4B (Kafetzopoulos *et al.* 1993), seguida de una cromatografía de interacción iónica (Kafetzopoulos *et al.* 1993, Farag 1999, Toharisman & Suhartono 2008). Se prefirió utilizar esta técnica, porque se corre el riesgo de inactivar la enzima por un posible secuestro del ión metálico presente en su sitio activo. En otros casos, se ha utilizado cromatografía de afinidad (metal-quelato) según Versali *et al.* (2004), la cual pudiera ser inadecuada por la misma razón comentada arriba. En base a las consideraciones anteriores el proceso de purificación utilizado comprendió las siguientes etapas, cuyos resultados son mostrados a continuación.

6.9.1. Concentración de la quitina desacetilasa

Una vez establecido el método de liberación y solubilización de la QDA de Bt-132, se procedió a investigar dos alternativas para concentrarla; éstas fueron la liofilización y la precipitación con sulfato de amonio.

La técnica de concentración que se utilizó para las primeras tres rutas (ver figura 13) fue la liofilización para concentrar 25 mL de muestra con una actividad total de 615 U_{QDA}. El material liofilizado fue luego resuspendido en 5 mL de tetraborato de sodio 0.05 M, pH 7.0, lográndose recuperar el 99.37%, de la actividad inicial, adoptándose en lo sucesivo este procedimiento para concentrar la enzima, antes de su fraccionamiento en columna.

Para el caso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se consideró que mediante este tratamiento podrían explorarse dos objetivos: la concentración y el fraccionamiento preliminar de la QDA, utilizando la sal al 40, 60 y 85% de saturación. En la sección 6.8.3 se darán más detalles sobre los resultados de esta estrategia.

6.9.2. Fraccionamiento de la QDA (rutas 1, 2 y 3)

Como primer paso de fraccionamiento a la cromatografía de interacción hidrofóbica, se basó en que otros autores la han usado para purificar moléculas de QDA con características similares a la de Bt-132 (Kafetzopoulos *et al.* 1993). Para emplear la fenil sefarosa CL- 4B (Sigma, P-7892), se siguieron las instrucciones del fabricante. En esta operación a las fracciones colectadas se les evaluó su contenido de proteína por los métodos de Bradford (1976), y Lowry (1951), y también por absorbencia a 280 nm. Además se determinó la actividad enzimática en cada fracción. Los primeros dos métodos de cuantificación de proteína presentaron interferencia, debido a la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en las fracciones colectadas, puesto que esta sal va incluida en el regulador usado para la elución cromatográfica; por lo mismo, el método usado finalmente para determinar las proteínas en las fracciones colectadas, fue la absorbencia a 280 nm.

En la gráfica A de la Figura 15, se muestra el gradiente de concentración discontinuo del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contenido en el eluyente. Se observa que la QDA eluye al utilizar sulfato de amonio 1M y al empezar a disminuir su concentración. Esto indica que la molécula de QDA es poco hidrofóbica, y por lo mismo se separa rápidamente del soporte. En la gráfica B de la Figura 15, se observan los perfiles enzimático y proteico, los cuales coinciden parcialmente, puesto que la QDA se encuentra en la primera mitad del pico mayor de proteína. El conjunto de muestras correspondientes al pico mayor (8mL) con 10.10 $\text{U}_{\text{QDA}}/\text{mL}$, fueron luego liofilizadas y el material obtenido fue disuelto 1 mL de agua destilada y desionizada, y luego fue monitoreado electroforéticamente.

Al realizarse la tinción con azul de coomasie se observó una sola banda (dato no mostrado), y para verificar dicho resultado se procedió a realizar la tinción con nitrato de plata. En la Figura 16 se puede observar que el número de bandas se redujo significativamente, con respecto a las encontradas en el extracto crudo de la QDA, que fueron al menos 25. Este dato demuestra la compleja composición proteica del extracto original, como corresponde a un lisado celular; sin embargo, la cromatografía de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

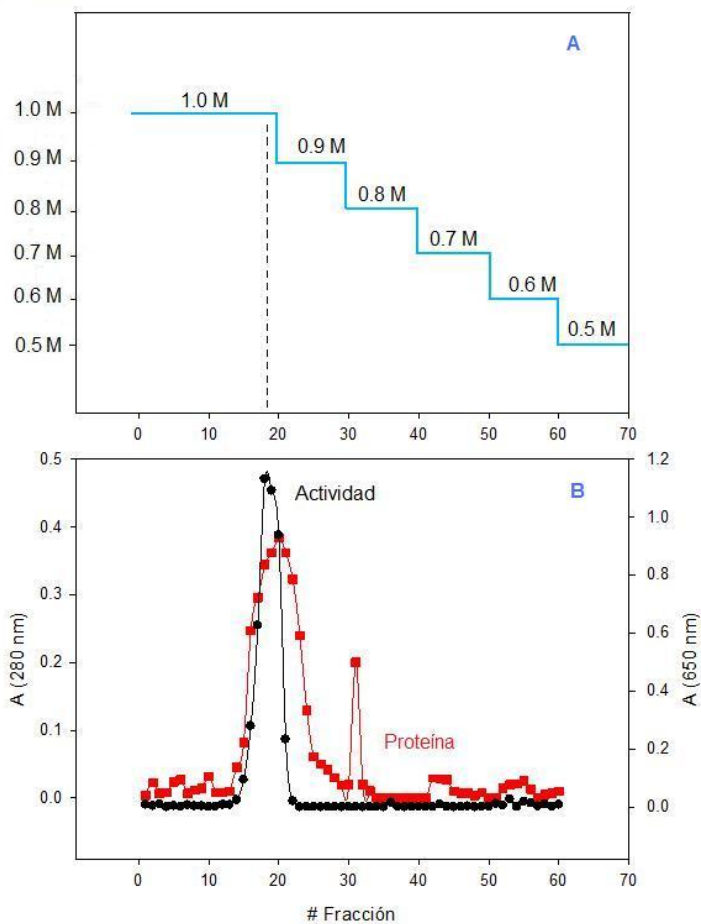


Figura 15. Perfil de elución de la QDA durante su fraccionamiento con fenil-sefarosa CL-4B.

hidrofobicidad no permitió obtener una sola banda, como había mostrado la tinción de azul de Coomasie, puesto que con la tinción con nitrato de plata se observaron 5 bandas, aunque tenues.

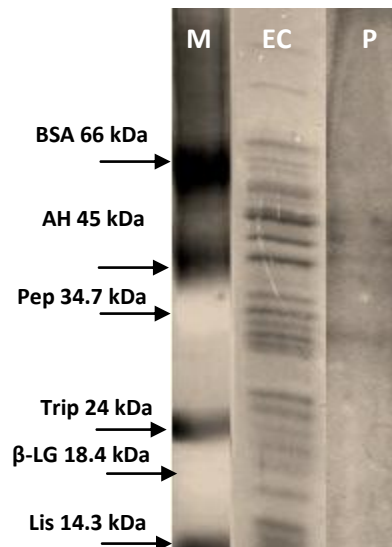


Figura 16. Electroferograma utilizando la tinción con nitrato de plata. En el carril M se muestran los marcadores de peso molecular. En el carril EC se observan las bandas de las proteínas contenidas en el extracto crudo de QDA. El carril P muestra las proteínas presentes en la muestra purificada por cromatografía de hidrofobicidad. Los marcadores utilizados fueron: albúmina bovina (BSA), albúmina de huevo (AH), pepsina (Pep), Tripsinógeno (Trip), β-Lactoglobulina (β-LG) y lisozima (Lis).

El siguiente paso fue eliminar el sulfato de amonio, pero buscando una alternativa distinta a la diálisis, que en experiencias anteriores había inactivado a la QDA. El método más utilizado actualmente es el uso de columnas cromatográficas o jeringas empacadas de fábrica con sephadex G-25, la ventaja de éstas es que el desalado puede realizarse en cuestión de minutos, de acuerdo al tamaño de la jeringa utilizada. En este caso se decidió emplear una jeringa de 12 mL, empacada en el laboratorio con ese soporte. Desafortunadamente, no fue posible eliminar el sulfato de amonio utilizando la ruta 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a éstos resultados, se procedió a seguir la ruta 2 descrita en la Figura 14. Por lo tanto se utilizó una columna empacada con Sephadex G-75 (Sigma) con la finalidad de desalar y purificar una muestra de 1 mL con 75.87 U_{QDA} totales.

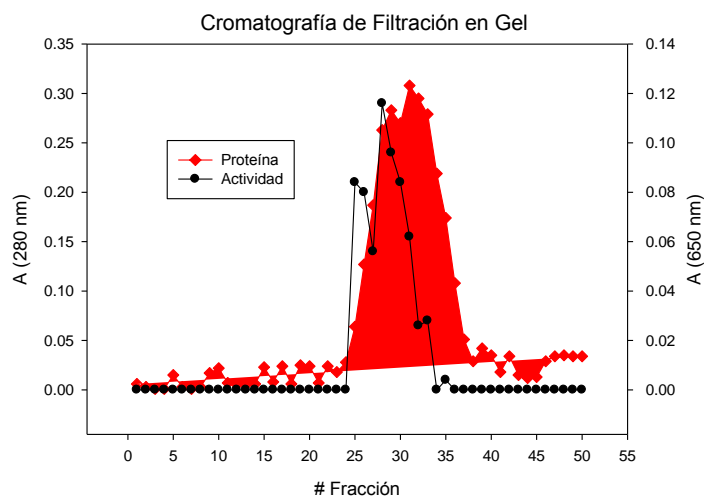


Figura 17. Perfil de elución de la QDA en una columna (30.5 x 1.1 cm) empacada con Sephadex G-75. Se colectaron 60 fracciones de 1 mL, eluidas con regulador de tetraborato de sodio 0.05 M pH 7.0.

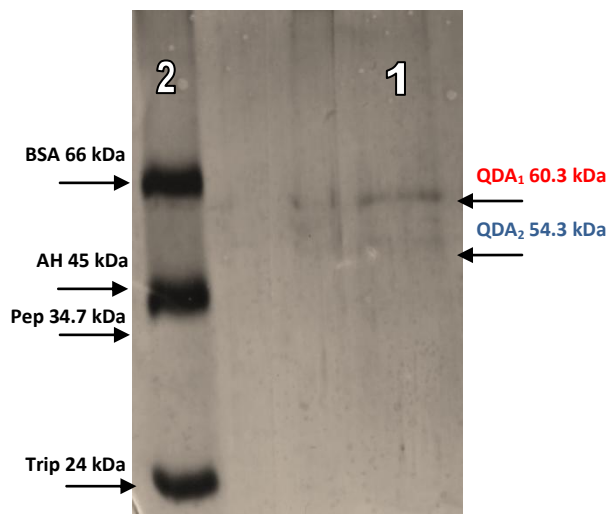


Figura 18. Electroferograma SDS-PAGE, teñido con nitrato de plata. **1.** Fracciones 25-32 obtenidas en Sephadex G-75. **2.** Marcadores moleculares.

Los resultados se observan en la Figura 17, donde queda evidenciado que el perfil de actividad enzimática se define en dos picos, lo cual coincidió con el perfil electroforético (Figura 18) revelado con nitrato de plata, donde se observaron 2 bandas, aunque tenues. Cabe agregar, que no se logró la eliminación total del sulfato de amonio, el cual continuó interfiriendo en la evaluación de la proteína por los métodos de Bradford y Lowry. Por otra parte, la recuperación de la actividad enzimática se vio afectada, ya que se obtuvo un rendimiento del 33.21%, con respecto a las unidades de enzima aplicadas en la columna.

Considerando que el Sephadex G-25 no afectó la actividad enzimática, se volvió a intentar la desalación y simultánea purificación de la QDA, utilizando una columna con este soporte, operada de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para ello se siguieron las mismas condiciones utilizadas al emplear Sephadex G-75, con la única variación de que la altura de la columna fue de 31.5 cm.

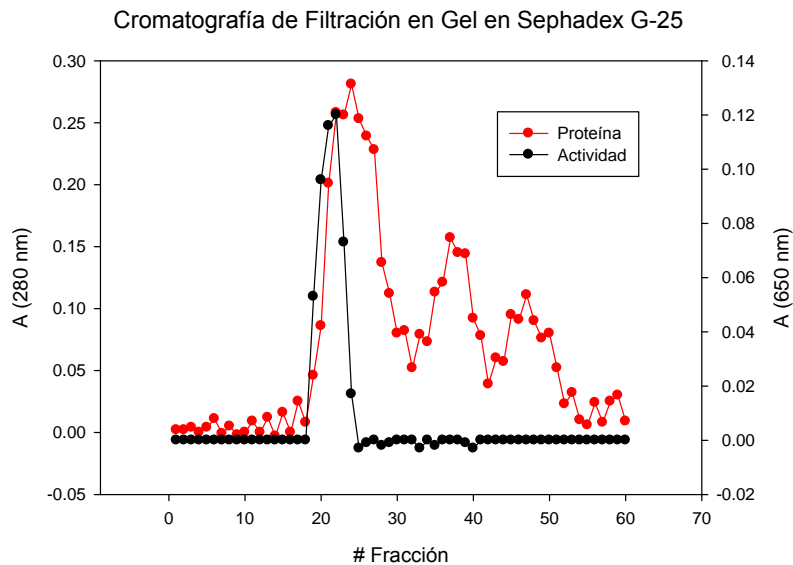


Figura 19. Fraccionamiento de la QDA de Bt-132 en una columna de Sephadex G-25, con objeto de purificar y desalar (eliminación de sulfato de amonio).

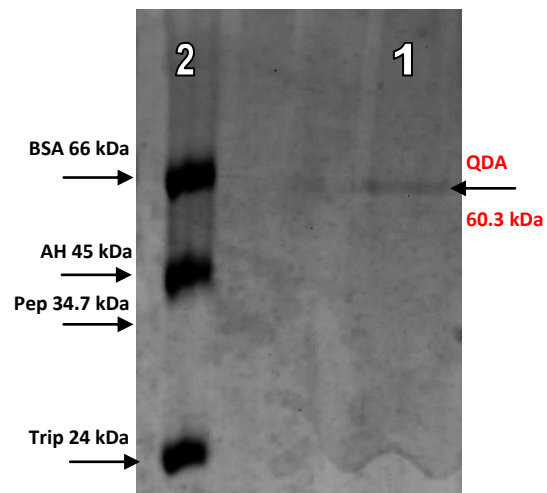


Figura 20. Electroferograma SDS-PAGE con tinción de plata. **1.** Muestra purificada en una columna de Sephadex G-25. **2.** Marcadores moleculares.

Los datos obtenidos son mostrados en las Figuras 19 y 20, en las cuales se aprecia que ocurrió una adecuada separación de las proteínas contaminantes, contenidas en al menos tres picos muy notorios (Figura 19), en los cuales no se encontraron trazas de la actividad de la QDA, ya que ésta se ubicó en la primera porción del primer pico. Las fracciones 19 hasta 23 fueron reunidas y liofilizadas, y después resuspendidas en 0.5 mL de tetraborato de sodio 0.05 M pH 7.0. De esta muestra concentrada se utilizaron 10 μ L para realizar el análisis electroforético mostrado en la Figura 20, donde puede apreciarse claramente una sola banda, aunque tenue, no obstante que se usó la tinción de plata. Cabe señalar que con esta tinción sólo se revelaron tres de los seis marcadores utilizados, como también puede ser observado en la Figura 18.

6.9.3. Concentración y fraccionamiento de la QDA (ruta 4)

En la Figura 21 se resume el proceso de fraccionamiento con sulfato de amonio, seguido en esta estrategia, y los resultados obtenidos. Cabe mencionar que las muestras procesadas fueron los sobrenadantes obtenidos, después de centrifugar a 10, 000 rpm durante 20 min luego de cada precipitación.

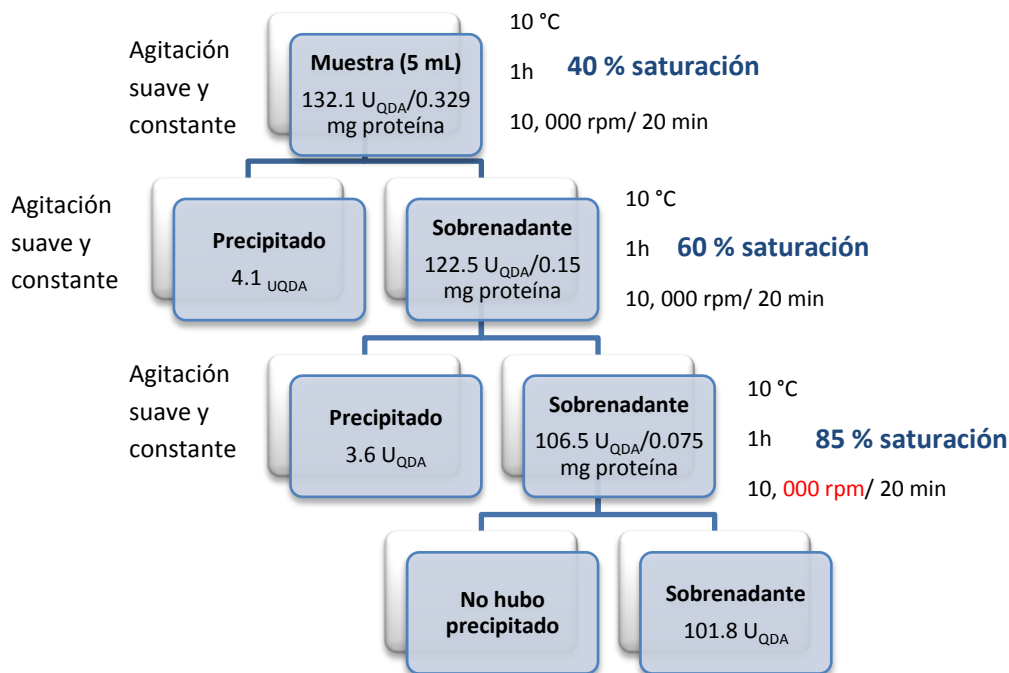


Figura 21. Diagrama del proceso de fraccionamiento de la QDA de Bt-132 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Los resultados mostraron que el uso del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para concentrar y purificar, puede dar un rendimiento final del 77 %, con una actividad específica de 1357 $\text{U}_{\text{QDA}}/\text{mg}$ de proteína, lo que equivale a una purificación de 43.77 veces, respecto a los valores iniciales. Las condiciones empleadas en esta etapa fueron similares a las empleadas por Farag (1999), donde obtuvo un 13 % de recuperación y 1.7 veces de purificación, respecto a sus valores iniciales. Como se puede observar en este trabajo se pudo obtener casi 6 veces más rendimiento y alrededor de 26 veces más purificación de la QDA, respecto a los valores obtenidos por Farag para la QDA de *Mucor rouxii*. Por otra parte, Toharisman & Suhartono (2008) obtuvieron un 86.4 % de recuperación y una purificación de 1.5 veces

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

para la QDA de *Bacillus thermoleovorans*, aunque en este caso la precipitación se realizó sólo al 70 % de saturación, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en tetraborato de sodio 0.05 M pH 7.0 a 4 °C. Es decir, aunque estos últimos, obtuvieron mejor rendimiento, el grado de purificación fue menor. Si bien es cierto que en el presente estudio se obtuvo un cierto rendimiento y una buena purificación al realizar la diálisis para eliminar la sal, y evitar su interferencia en los procesos posteriores de purificación, se perdió el 80% de la actividad. Esto podría deberse a que al dializar no sólo se elimina el sulfato de amonio, sino también algún ión necesario para la actividad de la enzima, la cual es una metaloenzima como fue ya referido. Ante esta circunstancia, se buscó desalar y purificar la QDA mediante cromatografía de filtración en gel, usando una columna con Sephadex G-25. No obstante los resultados no fueron satisfactorios, ya que aunque se logró la purificación hasta homogeneidad molecular, no logró eliminarse la sal totalmente, ya que en esta marcha se usan concentraciones muy altas de sulfato de amonio. Los resultados se muestran en las Figuras 22 y 23.

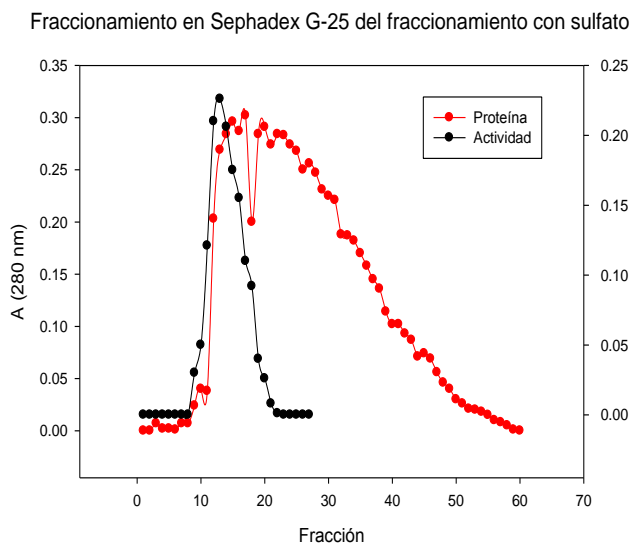


Figura 22. Perfil de elución en una columna de Sephadex G-25, con objeto de eliminar el exceso de sulfato de amonio y conseguir una purificación adicional de la QDA de Bt-132.

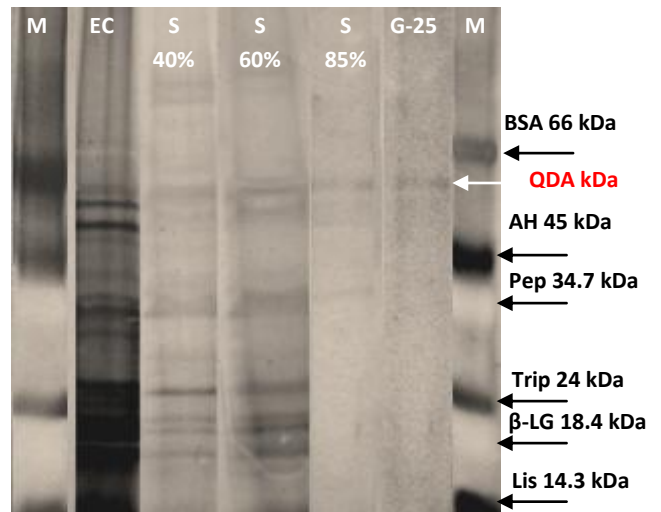


Figura 23. Electroferograma SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, de las muestras colectadas al fraccionar con sulfato de amonio, de acuerdo a la marcha resumida en la figura 20.. Marcadores moleculares (M): albúmina bovina (BSA), albúmina de huevo (AH), pepsina (Pep), Tripsinógeno (Trip), β-Lactoglobulina (β-LG) y lisozima (Lis). Extracto enzimático crudo (EC). Sobrenadante del fraccionamiento al 40 % (S 40 %). Sobrenadante del fraccionamiento al 60% (S 60 %). QDA obtenida del fraccionamiento en columna con sephadex G-25.

Con los datos obtenidos en la electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata a partir de los marcadores moleculares utilizados (Figura 23), respecto a su movilidad electroforética relativa (ver Tabla 8), se construyó la curva de calibración mostrada en la Figura 24, donde fue posible obtener por interpolación un peso molecular de 60.25 kDa para la QDA de Bt-132. Este dato es cercano al de 59 kDa encontrado en una de las isoformas de la QDA en *Mortierella* sp. DY-52 por Kim *et al.* (2008). También es cercano al reportado por Trudel & Asselin (1990) para la QDA de *Mucor racemosus* y *R. nigricans*, cuyo peso molecular es de 64 kDa en ambos microorganismos. Cabe mencionar que la polisacárido desacetilasa de *B. cereus* tiene un peso molecular de 28.57 kDa (Han *et al.* 2006) el cual es casi 2 veces menor que el encontrado en este trabajo en *B. thuringiensis*.

Tabla 8. Movilidad electroforética relativa de seis proteínas de peso molecular conocido y de la QDA de Bt-132.

Proteína	Peso molecular	Log PM	Distancia recorrida (mm)	R _f (65 mm)*
Albúmina bovina	66 000	4.82	18.75	0.288
Albúmina de huevo	45 000	4.65	32.5	0.5
Pepsina	34 700	4.54	38	0.584
Tripsinógeno	24 000	4.38	50	0.769
β-Lactoglobulina	18 400	4.26	55	0.846
Lisozima	14 300	4.16	63.75	0.981
QDA de Bt-132	60 256**	4.78	23	0.354

*La distancia recorrida por el colorante que marcaba el frente del corrimiento fue de 65 mm.

**Obtenido por interpolación en la curva de calibración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

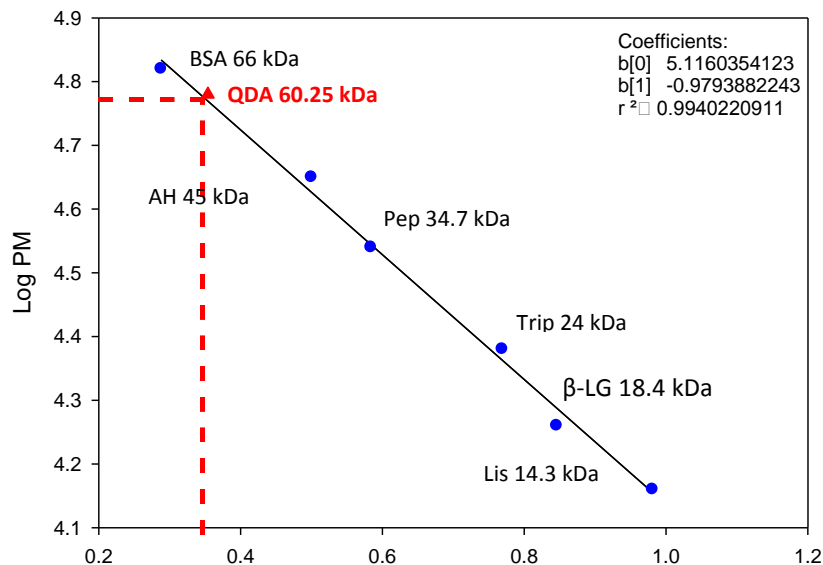


Figura 24. Curva de calibración para el cálculo del peso molecular de la proteína en estudio, mediante PAGE-SDS.

Finalmente, en la Tabla 9 se resumen los datos concernientes a la purificación de la QDA de Bt-132, obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 9. Marcha de la purificación de la QDA de *B. thuringiensis* cepa Bt-132.

Muestra o etapa de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (UQDA)	Actividad específica (UQDA/mg)	Rendimiento %	Purificación (veces)
Muestra original; células enteras*.	6.29	194.60	30.93	100	1
Sobrenadante libre de células del autolisado bacteriano.	0.2134	126.19	591.34	64.85	19.12
Fraciones colectadas por cromatografía de hidrofobicidad en Fenil Sepharosa CL-4B.	0.1105	80.76	730.86	41.5	23.63
Fraciones obtenidas por cromatografía en gel en Sephadex G-25 para desalar y purificar.	0.0210	21	1000	10.8	32.33

* Considerando la QDA antes de ser liberada y solubilizada.

La cromatografía de interacción hidrofóbica mostró que la QDA de Bt-132 es una enzima más bien hidrofílica, ya que eluyó al usar una concentración alta de sulfato de amonio, entre 1.0 y 0.9 M. Además, dicha cromatografía permitió eliminar un 50% de la proteína contaminante presente en el extracto crudo de la QDA. Al final se recuperó la enzima de interés con un alto rendimiento de 64%.

Así pues, respecto a los procesos de purificación de la QDA, se encontraron tres procesos diferentes al explorado en el trabajo presente. Primero, la QDA más estudiada hasta el momento ha sido la QDA periplásmica de *M. rouxii* para la cual, se tienen dos rutas diferentes de purificación. Kafetzopoulos *et al.* (1993), partieron de un extracto crudo enzimático obtenido del micelio congelado de *M. rouxii*, sometido a una lisis mecánica con perlas de vidrio, las cuales fueron removidas y el extracto obtenido fue centrifugado. El sobrenadante obtenido fue utilizado para continuar con el proceso 1 descrito en la Figura 25. Por otro lado, Farag (1999), partió de un homogeneizado de micelio fresco; posteriormente se centrifugó 2 veces sucesivas, y el sobrenadante fue el empleado en el proceso 2 descrito en la Figura 25. Y en lo referente a bacterias, se encontró a la QDA extracelular de *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11, era producida después de cultivar dicha bacteria durante 3 días a 70 °C, y separando las células por centrifugación, el sobrenadante es utilizado para obtener la QDA parcialmente purificada mediante el proceso 3 descrito en la Figura 25. Respecto a la QDA periplásmica de Bt-132, se partió de las células enteras, las cuales fueron sometidas a autólisis (proceso descrito en el apartado 7.6) para propiciar la liberación y la solubilización de la QDA, recuperándose en el sobrenadante obtenido por centrifugación para después liofilizar. La muestra así concentrada siguió el proceso de purificación descrito en la Figura 25.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

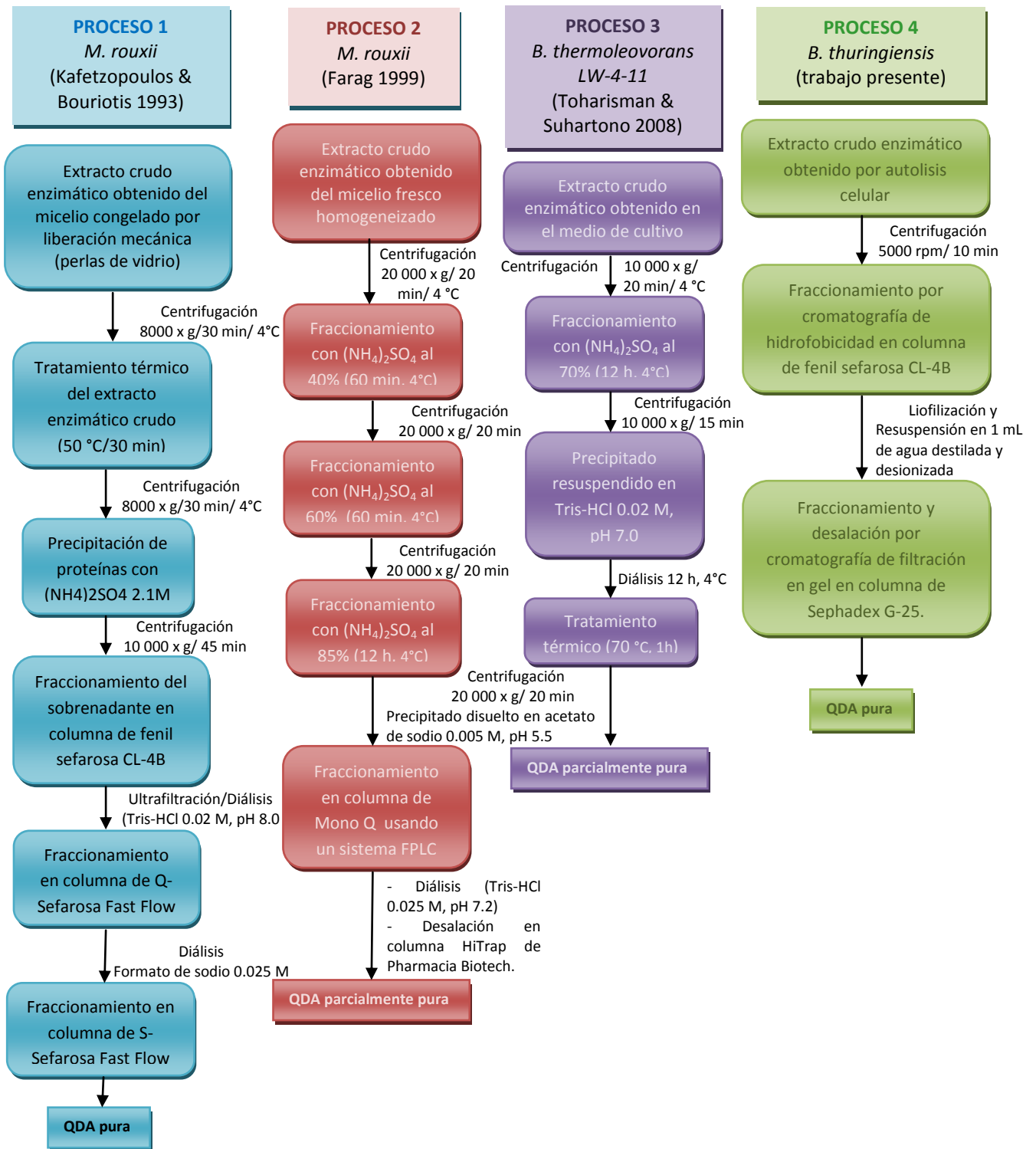


Figura 25. Procesos de purificación de algunas QDAs de origen microbiano.

Como se observa en la Figura 25, el proceso de purificación empleado en este trabajo tiene algunas ventajas sobre el empleado por otros autores, como por ejemplo, una vez

obtenido el extracto crudo enzimático, sólo se realizan dos etapas para obtener la QDA hasta homogeneidad molecular, con un rendimiento del 10.8 % y un índice de purificación de 33 veces. La desventaja respecto al proceso empleado por Kafetzopoulos *et al.* (1993) es que ellos lograron un índice de purificación de 97.3, lo cual muestra que a pesar de ser un proceso largo, resultó mejor para eliminar proteínas contaminantes; sin embargo cabe aclarar que es una QDA periplásmica de origen fúngico.

En el proceso 2 empleado por Farag (1999) se logró un rendimiento del 13%, lo cual no difiere en gran medida del obtenido en este trabajo; además su índice de purificación de 5.13, es 6 veces menor al obtenido en este trabajo para la QDA de Bt-132. Finalmente, en el proceso 3 descrito por Toharisman & Suhartono (2008) se obtuvo un rendimiento de 36.7 %, casi 3 veces superior al obtenido por nosotros (proceso 4), y un índice de purificación de 4.3, que es 8 veces inferior al obtenido en este trabajo.

6.10. Caracterización comparativa de la QDA pura con la del extracto crudo

En la Figura 26, se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad de la QDA en el extracto crudo y en la muestra purificada. Puede verse que en ambos casos la temperatura óptima resultó ser de 40 °C

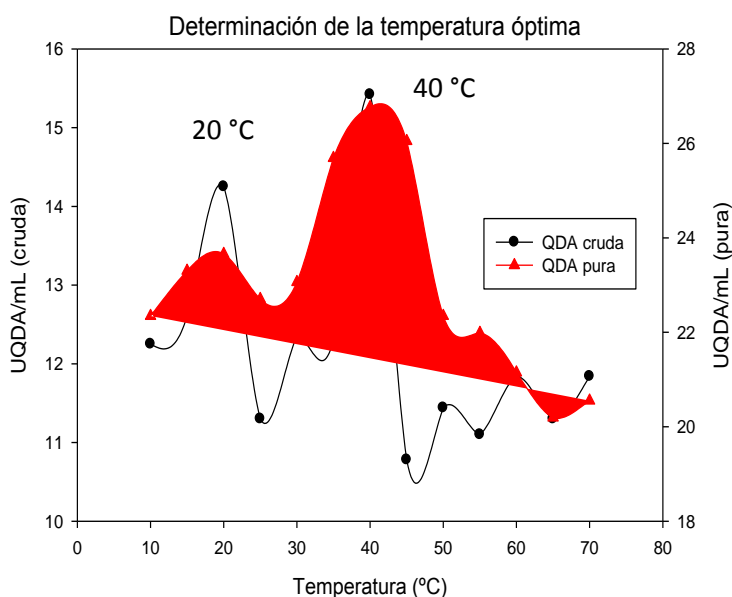


Figura 26. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la QDA de Bt-132.

Estos datos difieren de los que han sido reportados para otras QDA, cuyos óptimos de temperatura se encuentran entre 50-60 °C, aunque esto ha sido con enzimas fúngicas (Zhao *et al.* 2010-a).

Por otro lado, el perfil de pH correspondiente a la QDA pura, muestra claramente un pH óptimo de 4.5, que coincide con el pH óptimo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

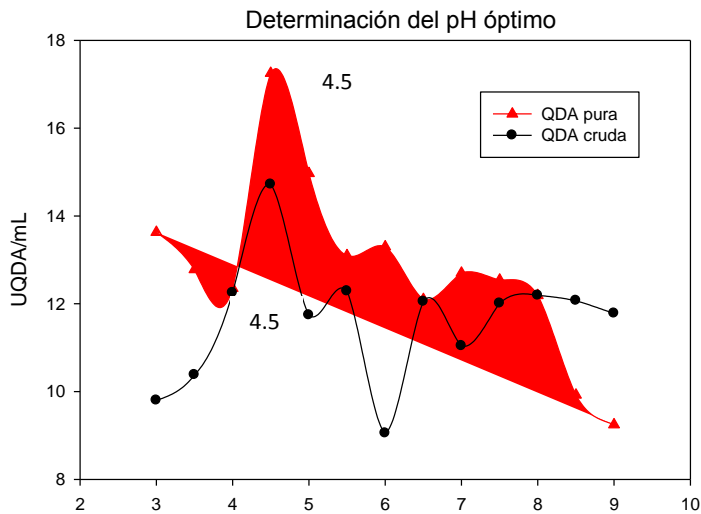


Figura 27. Efecto del pH sobre la actividad de la QDA de *B. thuringiensis* Bt-132.

Anteriormente, Nava Arenas (2009) encontró un pH óptimo de 4.0 y una temperatura óptima de 40 °C.

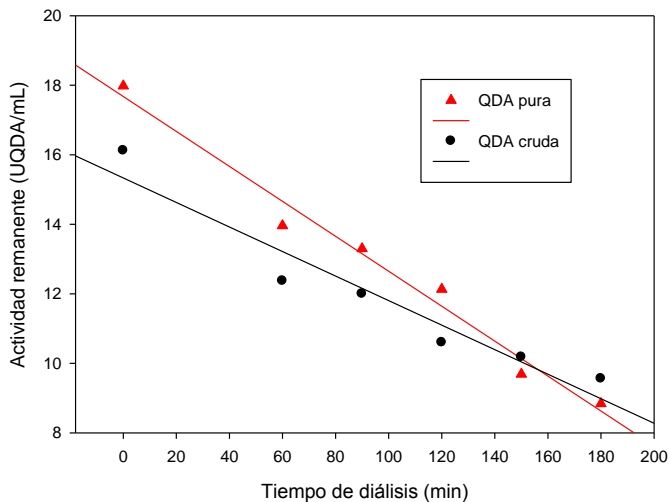


Figura 28. Efecto de sustancias quelantes (EDTA) sobre la actividad de la QDA.

obtenido en el extracto crudo para la QDA mayoritaria (Figura 27). Cabe mencionar al respecto que los resultados reportados para las QDA periplásmicas, como es el presente caso, han mostrado un pH óptimo comprendido entre 4.5 y 6.0 (Zhao *et al.* 2010-a), lo cual es congruente con nuestros resultados. Cabe agregar que, anteriormente, Nava Arenas (2009) encontró un pH óptimo de 4.0 y una temperatura óptima de 40 °C.

Por otra parte, en algunas investigaciones previas, se ha demostrado que las QDA son siempre metaloenzimas, por lo que su capacidad catalítica es altamente influenciada por iones divalentes (Kim *et al.* 2008; Tokuyasu *et al.* 1996; Yamada *et al.* 2008; Farag 1999; y Kafetzopoulos *et al.* 1993). Como se puede observar en la Figura 28,

tratamiento con EDTA. Los resultados son mostrados en la Tabla 10, donde se observa que la QDA cruda se reactivó en un 17%, mientras que la purificada lo hizo en un 80 % al añadir $ZnCl_2$. Es posible que la enzima en estado puro tenga más oportunidad de interactuar con el ión Zn^{++} , sucediendo lo contrario en la cruda. Los datos obtenidos son congruentes con los reportados por Kim *et al.* (2008) y Blair *et al.* (2006), quienes reportaron que la QDA de *Mortierella sp.* DY-52 y *Colletotrichum lindemuthianum* respectivamente, requieren iones Zn^{+2} para su actividad; sin embargo, los datos obtenidos en el presente estudio mostraron que otros iones divalentes pueden reactivar también la QDA, aunque con menor eficacia.

Tabla 10. Incremento porcentual de la actividad de la QDA previamente inactivada con EDTA, por adición de distintas sales*.

Sal metálica	Extracto crudo	Enzima pura
Sin adición	100	100
$ZnCl_2$ 0.01 M	116.7	179.28
$CaCl_2$ 0.01 M	108	141.44
$MgCl_2$ 0.01 M	101	157.66
$CoCl_2$ 0.01 M	100	154.95

* La muestra ensayada fue un lote de QDA previamente inactivado por diálisis contra EDTA 0.01 M, durante 180 min. La actividad mostrada por la enzima inactivada se consideró como 100 %.

7. CONCLUSIONES

- 7.1. *B. thuringiensis* podría utilizar la quitina transformándola en quitosana y acetato mediante una quitina desacetilasa (QDA). La quitosana continuaría su degradación por un sistema quitosanólítico, y el acetato es una fuente de carbono de fácil asimilación.
- 7.2. La considerada quitina desacetilasa, es en realidad una desacetilasa inespecífica capaz de desacetilar diversos sustratos como: quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada; glicol-quitina, EDTA, ácido 2,4 diclorofenoxiacético, p-nitrofenilacetato y acetato de uranilo.
- 7.3. Cuando la desacetilasa referida se ensaya con glicol-quitina, o con quitina desmineralizada, desproteinizada y coloidizada, se considera como quitina desacetilasa (QDA).
- 7.4. La QDA es una enzima periplásmica y no inducible. Su síntesis es reprimida por glucosa, N-acetilglucosamina y glucosamina, sin afectar el crecimiento bacteriano.
- 7.5. El mejor método para la obtención del extracto crudo de la QDA fue la autólisis bajo las condiciones siguientes: pH 7.0, agitación de 180 rpm, temperatura de 28 °C, durante 96 h.
- 7.6. La QDA de Bt-132 presente en el extracto crudo es una metaloenzima, dependiente de Zn^{+2} ; resistente a los inhibidores tiol-específicos, y moderadamente resistente a la acción de la urea. Su estabilidad en refrigeración y congelación fue adecuada por períodos de hasta 10 semanas.
- 7.7. El extracto crudo parece contener dos QDAs (54.3 y 60.3 kDa), las cuales difieren en sus pH óptimos (4.5 y 6.5) y en sus temperaturas óptimas (20 y 40 °C).

- 7.8.** La actividad de QDA presente en el extracto crudo pudo recuperarse en un 77%, al precipitarla con sulfato de amonio, alcanzándose con un grado de purificación de 44 veces; sin embargo, dicha actividad se perdía al dializar para eliminar la sal.
- 7.9.** La mejor forma de concentrar la enzima fue la liofilización, que permitió recuperarla en un 99%.
- 7.10.** Se logró purificar la QDA de Bt-132 hasta homogeneidad molecular, con un 10.8% de recuperación y un índice de purificación de 33.
- 7.11.** La QDA pura es una metaloenzima, dependiente de iones divalentes como el Ca^{+2} , Co^{+2} y Mg^{+2} , pero preferentemente el Zn^{+2} .
- 7.12.** La QDA de Bt-132 tiene unos óptimos en temperatura y pH de 40 °C y 4.5, respectivamente.
- 7.13.** La QDA pura tiene un peso molecular de 60.3 kDa obtenido por SDS-PAGE.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso, C., Nuero, O. M., Santamaria, F. & Reyes, F. (1995). Purification and heat- stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* **30**: 49- 54.
2. Araki, Y., Fukuoka, S., Oba, Sh. & Ito, E. (1971). Enzymatic deacetylation of N-acetylglucosamine residues in peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**: 751-758.
3. Araki, Y. & Ito, E. (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *Eur. J. Biochem.* **55**: 71-78.
4. Amorim, R.V.S., Ledingham, W.M., Fukushima, K. & Campos-Takaki, G.M. (2005). Screening of chitin deacetylase from mucoralean strains (zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 19-23.
5. Baker, L.G., Specht, C.A., Donlin, M.J., Lodge, J.K. (2007) Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell.* **6**: 855-867.
6. Beaney, P.D., Gan, Q., Magee, T. R. A., Flealy, M. & Lizardi-Mendoza, J. (2007). Modification of chitin properties for enzymatic deacetylation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**: 165-173.
7. Bergmeyer, H. U. & Mollering, H. (1974). Acetate determination with preceding indicator reaction. *Methods in Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer (ed). Academic Press, New York. **3**: 1520-1528.
8. Blair, D. E., Schuttelkopf, A. W., MacRae J.I., van Aalten, D. M. F. (2005). Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *PNAS.* **43**: 15429-15434.
9. Blair, D. E., Hekmat, O., Schuttelkopf, A. W., Shrestha, B., Tokuyasu, K., Withers, S. G., Van Aalten, D. M. F. (2006). Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry.* **45**: 9416–9426.
10. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
11. Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J. & Kennedy, J.F. (2006). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Scopulariopsis brevicaulis*. *Carbohydr. Polym.* **65**: 211-217.
12. Calvo-Méndez, C. & Ruiz-Herrera, J. (1987). Biosynthesis of chitosan in membrane fractions from *Mucor rouxii* by concerted action of chitin synthetase and a particulate deacetylase. *Exp. Mycol.* **11**: 128-140.

13. Campbell, P.M., Cao, A.T., Hines, E.R., East, P.D., Gordon, K.H.J. (2008). Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**: 950–958.
14. Castañeda-Argulló, M. (1956). Studies on the biosynthesis of extracellular proteases by bacteria. *J. Gen. Physiol.* **89**: 369-373.
15. Chávez-Camarillo, G., Cruz-Camarillo, R. (1984). El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **26**: 203–216.
16. Challacombe J.F., Altherr M.R., Xie G., Bhotika S.S., Brown N., Bruce D., Campbell C.S., Campbell M.L., Chen J., Chertkov O., Cleland C., Dimitrijevic M., Doggett N.A., Fawcett J.J., Glavina T., Goodwin L.A., Green L.D., Han C.S., Brettin T.S. (2007). The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. *J. Bacteriol.* **189**: 3680-3681.
17. Christodoulidou, A., Briza, P., Ellinger, A., Bouriotis, V. (1999). Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Lett.* **460**: 275–279.
18. Chen J., Wang Q., Hua Z. & Du G. (2007). Reserch and applications of biotechnolgt in textile industries in China. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 1651-1655.
19. Cody, M. R. (1989). Distribution of chitinase in *Bacillus*. *Curr. Microbiol.* **19**:201-105
20. Cruz-Camarillo, R. & Rojas-Avelizapa, L .I. (1999). Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnologicas. *Avances en purificación y aplicaciones de enzimas en biotecnología*. Ed. UAM-Iztapalapa, 1ra. Edición, México D.F. pp 288-324.
21. Cruz-Camarillo, R., Sánchez-Pérez, O., Rojas-Avelizapa, N.G., Gómez-Ramírez, M. & Rojas-Avelizapa, L.I. (2004). Chitosanase activity in *Bacillus thuringiensis*. *Folia Microbiol.* **49**: 94-96.
22. Davis, L. L., Bartnicki-Garcia, S. (1984). Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochem.* **23**: 1065- 1073.
23. Deising, H., Siegrist, J. (1995). Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**: 207–212.
24. Dishe, Z. & Borenfreund, E. (1950). A spectrophotometric method for the microdetermination of hexosamines. *J. Biol. Chem.* **184**: 517-522.
25. Dixit, R., Arakane, Y., Specht, C.A., Richard, C., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Muthukrishnan, S. (2008). Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**: 440–451.
26. Farag Ibrahim, E. (1999). Partial purification and charaterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxi*. Tesis de Maestría en Ciencias. Food Science & Agricultural Chemistry Department, Macdonald Campus, McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Montreal, Canada.

27. Fenton, D. M. & Eveleigh, D. E. 1981. Purification and mode of action of chitosanase from *Penicillium islandicum*. J. Gen. Microbiol. **125**: 151- 165.
28. Gao, X. D., Katsumoto, T., Onodera, K. (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. J. Biochem. **117**: 257-263.
29. Gualtieri, P., Barsanti, L. & Pasarelli, V. 1988. Chitosan as flocculant for concentrating *Euglena gracilis* cultures. Ann Inst. Pasteur/Microbiol. **139**: 717-726.
30. Gueddari, N. E. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M. & Deising, H. B. (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. New phytol. **156**: 103-112.
31. Ghormade, V., Kulkarni, S., Doiphode, N., Rajamohanam, P. R., & Deshpande (2010). Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendez-Vilas (ed). 1054-1066.
32. Gómez-Ramírez, M. (2000). Selección y caracterización de una cepa quitinolítica de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Licenciatura. LEM-ENCB.
33. Gómez-Ramírez, M., Rojas-Avelizapa, L.I. & Cruz-Camarillo, R. (2001). The chitinase of *Bacillus thuringiensis*. En Chitin Enzymology 2001. R.A.A. Muzzarelli (ed). University of Ancona, Italy. pp 273-282.
34. Gómez-Ramírez, M. (2006). Obtención y caracterización de mutantes de *Bacillus thuringiensis* mejoradas en su producción de quitinasas. Tesis Doctoral CQB-ENCB.
35. Han, C., Xie, G., Challacombe, J. F., Altherr M. R., Bhotika, S. S., Bruce, D., Campbell, C. S., Campbell, M. L., Chen, J., Chertkov, O., Cleland, C., Dimitrijevic, M., Doggett, N. A., Fawcett, J. J., Glavina, T., Goodwin, L. A., Hill, K. K., Hitchcock, P., Jackson, P. J., Keim, P., Kewalramani, A. R., Longmire, J., Lucas, S., Malfatti, S., McMurry, K., Meincke, L. J., Misra, M., Moseman, B. L., Mundt, M., Munk, A. C., Okinaka, R. T., Parson-Quintana, B., Reilly, L. P., Richardson, P., Robinson, D. L., Rubin, E., Saunders, E., Tapia, R., Tesmer, J. G., Thayer, N., Thompson, L. S., Tice, H., Ticknor, L. O., Wills, P. L., Brettin, T. S. & Gilna, P. (2006). Pathogenic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. **188**: 3382-3390.
36. Harish-Prashanth K.V. & Tharanathan R.N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential- an overview. Trends Food Sci. Technol. **18**: 117-131.
37. Hekmat, O., Tokuyasu, K., Withers, S.G. (2003). Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*: A investigation using steady-state kinetic analysis and MS. Biochem. J. **374**: 369–380.
38. Hirano, T. Kadokura, K., Ikegami, T., Shigeta, Y., Kumaki, Y., Hakamata, W., Oku, T. & Nishio, T. (2009). Heterodisaccharide 4-o-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)-D-glucosamine is a specific inducer of chitinolytic enzyme production in *Vibrios* harboring chitin oligosaccharide

- deacetylase genes. *Glycobiol.* **19**: 1046-1053.
39. Huang, H. L., Ye, C.Y., & Yao, Y.Y. (2004). Screening and properties of chitin deacetylase from *Bacillus subtilis*. *College of Materials Science and Engineering.* **31**: 31-37.
40. Hu, K., Yan, H., Liu, G. & Tan, H. (2006). Identification and characterization of a polysaccharide deacetylase gene from *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **52**: 935-941.
41. Ibarra, E. J. & Federici, A. B. (1986). Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *J. Bacteriol.* **165**: 527-533.
42. Jaworska, M.M. & Konieczna, E. (2006). Stability of chitin deacetylase. *Polish Chitin Society Monograph XI.* 15-19.
43. Jaworska, M. M., (2010). Chitin deacetylase product inhibition. *Biotechnol. J.* **6**: 244-247.
44. Kadokura, K., Rokutani, A., Yamamoto, M., Ikegami, T., Sugita, H., Itoi, S., Hakamata, W., Oku, T. & Nishio, T. (2007). Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase in the production of heteropolysaccharide from chitin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 357-365.
45. Kafetzopoulos, D., Martinou A., Bouriotis V. (1993). Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 2564-2568.
46. Kauss, H., Jeblick, W. & Young, D. H. (1983). Chitin deacetylase from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Sci. Lett.* **28**:231-236.
47. Kim, Y.J., Zhao, Y., Oh, K.T., Nguyen, V.N., Park, R.D. (2008). Enzymatic deacetylation of chitin by extracellular chitin deacetylase from a newly screened *Mortierella* sp. DY-52. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 759–766.
48. Knorr, D. & Klein, J. (1986). Production and conversion of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* or *Phycomyces blakesleeanus*. *Biotechnol. Letts.* **8**: 691- 694.
49. Kolodziejka, I., Malesa- Ciećwierz, M., Lerska, A. & Sikorski, Z. (1999). Properties of chitin deacetylase from crude extracts of *Mucor rouxii* mycelium. *J. Food Bioche.* **23**: 45–57.
50. Krajewska B. (2004). Application of chitin and chitosan materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 126-139.
51. Lorenz, P. & Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 510-516.
52. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

53. Martinuo A., Koutsioulis D., Bouriotis V. (2002). Expression, purification and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Prot. Express. Purifi.* **24**: 111-116.
54. Matsuo, Y., Tanaka, K., Matsuda, H, Kawamukai, M. (2005). Cda1⁺, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* **579**: 2737-2743.
55. Mitsutomi, M., Ohtakara, A. & Fukamizo, T. (1990). Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partial N-acetylated chitosan. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 871-877.
56. Molano, J., Polacheck, I., Duran, A. & Cabib, E. (1979). An endochitinase from wheat germ. Activity on nascent and performed chitin. *J. Biol. Chem.* **254**: 4901-4907.
57. Morgan, W. T & Elson, L. A. (1934). A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem. J.* **28 (3)**: 988-995.
58. Muzzarelli, R. A. A. (1985). En: *The polysaccharides*, G. O. Aspinall (e). Academic Press. **3**: 417-451.
59. Nahar, P.; Ghormade, V.; Deshpande, M.V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: Possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* **85**: 80-88.
60. Nava Arenas, I., (2009). Demostración de la actividad de quitina desacetilasa en *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría CQB-ENCB.
61. Olicón Hernández, D. R. (2011). Instauración de un proceso químico-enzimático para la producción de quito-oligosacáridos, a partir de desechos de camarón y sustratos comerciales. Tesis de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas. ENCB-IPN.
62. Pacheco Hernández, M. A. (2008). Caracterización y purificación de la endoquitosanasasa de la cepa Bt-132 de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. CQB-ENCB.
63. Pandya, Y. & Koor, D. 1991. Diffusion characteristics and properties of chitosan coacervate capsules. *Process Biochem.* **26**:75-81.
64. Pareek, N., Viveknand, V. Dwivedi, P. & Singh, R. P. (2011). *Penicillium oxalicum* SAEM-51: a mutagenised strain for enhanced production of chitin deacetylase for bioconversion to chitosan. *New Biotechnol.* (En prensa).
65. Pruzzo, C., Vezzulli, L., Colwell, L.L. (2008). Global impact of *Vibrio cholera* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* **10**: 1400-1410.
66. Psylinakis, E., Boneca, I. G., Mauromatis, K., Deli, A., Hayhurts, E., Foster, J., Varum, K.M. & Bouriotis, (2005). Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* **280**: 30856-30863.

67. Reissig, J. L., Strominger, J. L. & Leloir, L.F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* **217**: 959-966.
68. Roberts, W. K., & Selitrennikoff C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* **134**:169-176.
69. Sánchez- Pérez, O. (2001). La quitosanasa extracelular de *Bacillus thuringiensis*. Tesis profesional. ENCB.
70. Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K., Sannan, T. (1989). Screening of Mucoraceae strains for chitosan production. En: *Chitin and Chitosan*. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T. & Sanford, P. (eds), Elsevier Applied Science, New York, pp.171-178.
71. Suzuki, S., Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y. & Suzuki, S. (1986). Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaosa and chitohexaosa. *Carbohydr. Res.* **151**: 403-408.
72. Todar, K. (2009). Regulation of Metabolism in Bacteria. Lectures in Microbiology by Kenneth Todar PhD. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld//regulation>.
73. Tokoro, A. N., Tatewaki, K., Suzuki, T., Mikami, S. & Suzuki, M. (1988). Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 784–790.
74. Toharisman, A. & Suhartono, M. T. (2008). Partial purification and characterization of chitin deacetylase produced by *Bacillus thermoleovorans* LW-4-11. Indonesian Sugar Research Institute. <http://sugarresearch-org/index.php/isri-rouks.htm>.
75. Tokuyasu, K., Mayumi, O. K., Kiyoshi, H. (1996). Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletorichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**:1598- 1603.
76. Trudel, J. & Asselin, A. (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **178 (2)**: 362-366.
77. Trudel, J. & Asselin, A. (1990). Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **189**: 249-253.
78. Tsigos, I. & Bouriotis, V. (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* **270**: 26286–26291.
79. Tsigos, I., Zydowicks N., Martinou A., Domard A., Bouriotis, V. (1999). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitoooligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* **261**: 1-9.
80. Tsuji, A., Kinoshita, T. & Hoshino, M. (1969). Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-metyl-2-benzothiazolone hidrazone hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.* **17**: 1505-1510.

81. Uchida, Y. & Ohtkara, A. (1988). Chitosanase from *Bacillus* species. *Meth. Enzymol.* **161**: 501-505.
82. Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. & Eijsink, V. G. (2005). The non-catalytic-chitin binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* essential for chitin degradation. *J. Biol. Chem.* **280**: 28492-28497.
83. Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* **330**: 219-222.
84. Versali M.F., Fabienne C., Gauthier C., Dumont F., Dommes J. (2004). Method for the production of chitin deacetylase. Patent Application Publication. US 20040229341A1.
85. Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. & Tanaka, H. (1991). Chitinase system of *Bacillus circulans* W1-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**: 4017-4122.
86. Wang X., Li X., Li Y. (2007). A modified Coomassie brilliant blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol. Lett* **29**: 1599-1603.
87. Win, N.N.; Stevens, W.F. (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 334–341.
88. Wray W., Boulikas T., Wray V.P., Hancock R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry.* **118**: 197-203.
89. Yamada, M., Kurano, M., Inatomi, S., Taguchi, G., Okazaki, M., Shimosaka, M. (2008). Isolation and characterization of a gene coding for chitin deacetylase specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes* and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**: 130–137.
90. Yadav, V., Panilaitis, B., Shi, H., Numuta, K., Lee, K. (2011). N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase is required for N-acetyl glucosamine assimilation in *Gluconacetobacter xilinus*. *PLOS ONE* 6 (6):e18099.doi:10.1371/Journal:phone.0018099.
91. Young, M., Bell, R. & Carroad, P. (1985). Kinetics of chitinase production II. Relationship between bacterial growth, chitin hydrolysis and enzyme synthesis. *Biotech. Bioeng.* **27**: 776-780.
92. Zhao, Y., Park, R. D., Muzzarelli, R. (2010)-a. Chitin deacetylases: Properties and Applications. *Mar. Drugs.* **8**: 24-46.
93. Zhao, Y., Kim, Y.J., Oh, K.T., Nguyen, V.N. & Park, R.D. (2010)-b. Production and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Absidia corymbifera* DY-9. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 119-126