



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Producción y purificación de β -N-acetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano.

Tesis

Que para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

PRESENTA

Q.F.B. Ulises Carrasco Navarro.

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto¹

Asesores:

Dra. Raquel Alatorre Rosas²

Dr. Humberto González Márquez³

¹Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa.

²Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo.

³Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa.

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

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACYT No. 105628.

México D.F. a 1 de Agosto del 2011.

El H. jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis: “Producción y purificación de β -N-acetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano”, que presentó: Ulises Carrasco Navarro.

Comité tutorial:

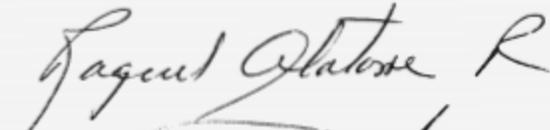
Directora de tesis: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Asesora: Dra. Raquel Alatorre Rosas.
Colegio de Postgraduados, Montecillo, Fitosanidad.

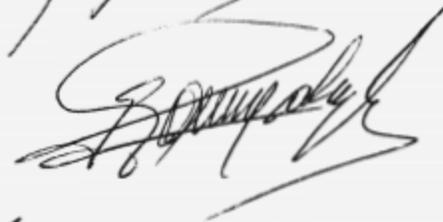
Asesor: Dr. Humberto González Márquez.
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud.

Jurado:

Presidente: Dra. Raquel Alatorre Rosas



Secretario: Dr. Humberto González Márquez



Vocal: Dr. Alberto López Luna



Vocal: M.B. Zaizy Rocha Pino.



AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Keiko Shirai por la confianza, el asesoramiento, la paciencia y toda la ayuda que me ha brindado, gracias por todos los conocimientos adquiridos y por haber confiado en mí para la realización de esta tesis.

Al Dr. Humberto González Márquez por los acertados y valiosos comentarios, por el apoyo incondicional para realizar una parte importante de este trabajo, gracias por los conocimientos transmitidos.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas, por su asesoría y tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la M. en B. Zaizy Rocha Pino, por todo el tiempo y disposición que pacientemente dedico a este trabajo.

Al Dr. Alberto López Luna, por los consejos y comentarios que ayudaron al desarrollo de esta tesis.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros, Dra. Neith, Carolina de Santiago, Alma Guadalupe, Fabiola, Ariana, Betsaida, Dr. Gabriel, Facundo, Alfonso, Andrés, y en especial a Jonathan quien es parte importante de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 248, Ingrid, Marco, Benito.

A mis padres por todo el apoyo y amor recibido durante todos estos años, les agradezco el estar a mi lado en todo momento, gracias por todo su afecto y comprensión, gracias por la oportunidad que me dieron de vivir.

A mi esposa Carmen a quien agradezco todos los momentos maravillosos que hemos compartido, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, gracias por la ayuda que siempre me has brindado, gracias por la oportunidad que me das de ser padre.

No hay que temer a las sombras. Solo indican que en un lugar cercano resplandece luz.

Ruth Renkel

ÍNDICE.

RESUMEN.	xi
ABSTRACT.	xiii
INTRODUCCIÓN.	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Las enzimas quitinolíticas.....	3
<i>β-N-acetylhexosaminidasa</i>	4
<i>Clasificación</i>	4
<i>Estructura</i>	5
<i>Mecanismo de reacción</i>	5
<i>Producción de Nhasas</i>	6
<i>Purificación</i>	9
<i>Aplicaciones</i>	10
<i>Lecanicillium lecanii</i> como productor de quitinasas.	12
Inmovilización de microorganismos.	13
JUSTIFICACIÓN.	15
OBJETIVOS.	16
Objetivo general:.....	16
Objetivos específicos:.....	16
HIPÓTESIS.	16
MATERIALES Y MÉTODOS.	17
Microorganismo.	17
Preparación de quitina coloidal.....	17

Medio de cultivo.....	17
Inmovilización de <i>Lecanicillium lecanii</i> en PUF.....	17
Cultivo sumergido.....	18
Determinación de la actividad Nhasa.	18
Determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson.....	19
Determinación de proteína por el método de Bradford.	19
Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.....	19
Zimograma de actividad Nhasa.	20
Purificación de Nhasa.....	20
<i>Precipitación con (NH₄)₂SO₄</i>	20
<i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	21
<i>Cromatografía de intercambio aniónico</i>	21
Caracterización de Nhasa.....	22
<i>Temperatura óptima</i>	22
<i>pH óptimo</i>	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Cinética de actividad Nhasa del cultivo sumergido.....	23
Purificación de Nhasa: primer protocolo de purificación.....	28
<i>Precipitación con sulfato de amonio</i>	28
<i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	29
<i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	31
SDS-PAGE.....	32
<i>Tabla de purificación</i>	34
Purificación de Nhasa: segundo protocolo de purificación.	37

<i>Precipitación con sulfato amonio</i>	37
<i>Cromatografía de exclusión molecular: uso de Tritón x100 y acetonitrilo</i>	40
<i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	44
Caracterización de Nhasa.....	49
<i>Temperatura óptima</i>	50
<i>pH óptimo</i>	51
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	55
ANEXO I. Curva de <i>p</i> -nitrofenol para la determinación de actividad Nhasa.....	63
Anexo II. Método de Lowry-Peterson y curva patrón para determinación de proteína.	64
Anexo III. Curva estándar para la determinación de proteína por el método de Bradford.....	66
Anexo IV. Análisis estadístico de la determinación de actividad Nhasa acumulada de las fracciones precipitadas a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio, empleando el paquete estadístico SPSS.....	67

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Hidrólisis de la <i>N, N</i> -diacetilquitobiosa por parte de la Nhasa.	4
Figura 2. Probable mecanismo de la catálisis enzimática de las Nhasas (familia 20).....	6
Figura 3. Actividad Nhasa volumétrica de <i>Lecanicillium lecanii</i> inmovilizado en PUF y con esporas en un bioreactor de 3L a pH 6 y a una velocidad de agitación de 102 rpm.....	24
Figura 4. Actividad Nhasa específica de <i>Lecanicillium lecanii</i> inmovilizado en PUF y con esporas en un biorreactor de 3L a pH 6 y a una velocidad de agitación de 102 rpm.	25
Figura 5. Actividad Nhasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> inmovilizado en PUF y con esporas expresada en U/gSSI en un bioreactor de 3L a pH 6 y a una velocidad de agitación de 102 rpm.	27
Figura 6. Determinación de la actividad Nhasa específica de las fracciones a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.	29
Figura 7. Elución de proteínas de la fracción solubilizada al 40% de saturación con sulfato de amonio en una columna de exclusión molecular	30
Figura 8. Elución de proteínas de la fracción resuspendida al 80% de saturación con sulfato de amonio en una columna de exclusión molecular	31
Figura 9. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes de los distintos pasos de la purificación de Nhasa a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación.....	32
Figura 10. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes de los distintos pasos de la purificación de Nhasa a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación.	33
Figura 11. Actividad Nhasa en gel de poliacrilamida de cada uno de los pasos de purificación utilizando como sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucosamina.....	34
Figura 12. Determinación de la actividad Nhasa específica de las fracciones precipitadas a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.	38
Figura 13. Determinación de la actividad Nhasa acumulada de las fracciones precipitadas a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.	39
Figura 14. Concentración de proteína en las fracciones precipitada a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.....	40
Figura 15. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y Zimograma del extracto crudo enzimático y después de la precipitación con 60% de sulfato de amonio.....	41

Figura 16. Elución de proteínas de la fracción precipitada al 60% de saturación con sulfato de amonio (adicionada con 1% Triton X-100, 10% acetonitrilo) en una columna de exclusión molecular.....	42
Figura 17. Actividad específica de las fracciones obtenidas en una columna de exclusión molecular (fracción precipitada al 60% de saturación con sulfato de amonio adicionada con 1% de Triton X-100, 10% de acetonitrilo).....	43
Figura 18. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes de las fracciones con actividad Nhasa después de la cromatografía de exclusión molecular.....	44
Figura 19. Actividad Nhasa volumétrica de la fracción 10 después de cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE-Sepharose.....	45
Figura 20. Electroforesis desnaturalizante de la fracción 10 después de cromatografía de intercambio iónico. .	46
Figura 21. Actividad Nhasa volumétrica de la fracción 11 después de cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE-Sepharose.....	47
Figura 22. Electroforesis desnaturalizante de la fracción 11 después de cromatografía de intercambio iónico. .	47
Figura 23. Electroforesis desnaturalizante de las fracciones con actividad Nhasa después de cromatografía de intercambio iónico.....	50
Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad Nhasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> inmovilizado en PUF.....	51
Figura 25. Efecto del pH sobre la actividad Nhasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> inmovilizado en PUF..	52
Figura 26. Curva patrón de <i>p</i> -nitrofenol empleada para la determinación de la actividad Nhasa	63
Figura 27. Curva estándar para la determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson.....	65
Figura 28. Curva estándar para la determinación de proteína por el método de Bradford	66

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Métodos generales de purificación de β -N-acetylhexosaminidasa de algunos microorganismos	9
Tabla 2. Purificación parcial de una Nhasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> , a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación con sulfato de amonio.....	36
Tabla 3. Purificación parcial de una Nhasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> , a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación con sulfato de amonio.....	37
Tabla 4. Purificación parcial de una Nhasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> inmovilizado en PUF.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

ANOVA: análisis de varianza

Biopartículas: *Lecanicillium lecanii* movilizado en PUF.

Nhasa: β -*N*-acetilhexosaminidasa.

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

KDa: Kilodaltones.

RMN: Resonancia magnética Nuclear.

PUF: Espuma de poliuretano.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

RESUMEN.

El objetivo del presente trabajo fue producir y purificar la enzima *N*-acetilhexosaminidasa (Nhasa) a partir de un cultivo sumergido del hongo *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano, para lo cual se utilizaron las condiciones reportadas por Carrasco y col. (2009) y se probaron dos protocolos de purificación.

Inicialmente, se llevó a cabo la cinética de producción Nhasa, para lo que se utilizaron, como inóculo, biopartículas (hongo inmovilizado) en un biorreactor y como control se utilizaron esporas libres. Se encontró que la actividad volumétrica al utilizar biopartículas fue cuatro veces mayor (48.82 ± 6.14 U/L), con respecto al control (11.2 ± 0.26 U/L). De igual modo la mayor actividad específica se obtuvo al utilizar como inóculo las biopartículas obteniéndose 0.25 ± 0.07 U/mg de proteína, mientras que, al inocular el reactor con esporas, solo fue de 0.028 ± 0.0007 U/mg de proteína. En cuanto a la actividad Nhasa/g de sustratos sólidos iniciales (SSI), la mayor actividad se obtuvo en el cultivo con las biopartículas (2.73 ± 0.34 U/gSSI) a diferencia del cultivo inoculado con esporas (0.62 ± 0.014 U/gSSI).

Posteriormente, se diseñó una estrategia de purificación de una Nhasa a partir del extracto crudo enzimático obtenido del cultivo sumergido inoculado con biopartículas. Para tal fin, se precipitaron las proteínas con 40% de saturación con sulfato de amonio, obteniendo una actividad específica de 4.22 ± 0.6 U/mg de proteína, el sobrenadante se llevó hasta 80% de saturación, obteniéndose en este segundo precipitado una actividad específica de 2 ± 0.18 U/mg de proteína. Los precipitados de 40 y 80% fueron inyectados en una columna de exclusión molecular (Sephacryl™ S-100 High Resolution), separándose fracciones con actividades específicas de 7.92 U/mg y de 0.44 U/mg con factores de purificación de 2.55 y 0.14 para los precipitados al 40% y 80% de saturación, respectivamente. Posteriormente, se procedió a separar cada fracción por cromatografía de intercambio iónico, empleando una columna

Macro-Prep High Q support, con resultados poco satisfactorios al perder la actividad enzimática.

Con base a lo anterior, se modificó el protocolo de purificación, determinándose actividades Nhasa de 88.2 ± 10.78 U/mg de proteína, 16.58 ± 2.26 U/mg y 1.69 ± 0.3 U/mg en 40, 60 y 80% de saturación con sulfato de amonio, respectivamente. La actividad enzimática acumulada en las precipitaciones con sulfato de amonio entre 60 y 80% no presentó diferencia significativa por lo que, en lo sucesivo, se decidió precipitar sólo con 60% de saturación. Ésta fracción precipitada fue disuelta en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50mM, NaCl 0.15M pH 7.8, ultrafiltrada en una membrana de corte de masa molecular de 10 KDa y al concentrado se le añadió 4% (v/v) de Tritón x-100 y 10% (v/v) de acetonitrilo. Se inyectó en una columna de exclusión molecular (Sephacryl™ S-100 High Resolution), obteniéndose en las fracciones 10 y 11 una actividad de 0.88 U/mg de proteína y 1.98 U/mg de proteína respectivamente, con factores de purificación de 72.12 y 162.16, respectivamente. Las fracciones 10 y 11 fueron inyectadas por separado a una columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharose fast-flow). Las fracciones con actividad Nhasa fueron sometidas a SDS-PAGE, mostrando sólo dos bandas entre los 50-75 KDa para las fracciones 20-30, y en las fracciones 31-33 se observa una sola banda para la fracción 10 del paso de exclusión molecular, y una banda en las fracciones 30-36 de la fracción 11, lográndose con ello la purificación de una Nhasa de *Lecanicillium lecanii*, empleando solo tres pasos de purificación. La enzima Nhasa presento una temperatura óptima de 40°C y un pH óptimo de 6.

ABSTRACT.

The aim of this study was the production in submerged culture of the enzyme *N*-acetylhexosaminidase (Nhase) of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* immobilized in polyurethane foam and its purification. In a previous work, the conditions of immobilization and production were established (Carrasco *et al.*, 2009), tested two purification protocols

Initially kinetics of Nhase activity were carried out in a bioreactor using bioparticles and spores (free cells) as inocula, the former yields a maximum volumetric activity of 48.82 ± 6.14 U/L, whereas the latter was 11.2 ± 0.26 U/L i.e. more than fourfold the activity with bioparticules. The highest specific activity was also found when the bioparticles was used as inoculum (0.25 ± 0.07 U/mg protein). Indeed, the highest Nhase/g of initial solid substrates (SSI) activity was determined in the culture using bioparticles (2.73 ± 0.34 U/gSSI), compared with the culture inoculated with spores (0.62 ± 0.014 U/gSSI).

Purification of Nhase from crude enzymatic extract of submerged culture with bioparticles was carried out. Proteins were salted out at 40% saturation with ammonium sulfate obtaining a specific activity of 4.22 ± 0.6 U/mg, the supernatant was brought to 80% saturation with ammonium sulfate (2 ± 0.18 U/mg). Each of these fractions were injected into a size exclusion chromatography column (Sephacryl™ S-100 High Resolution), obtaining specific activities of 7.92 U/mg and 0.44 U/mg with purification factor of 2.55 and 0.14 for the fraction precipitated at 40 and 80% saturation, respectively. Subsequently, the fractions with activity were subjected to ion exchange chromatography (Macro-Prep High Q support), nevertheless there was not a good separation and above all the enzymatic activity was absent.

Based on the above, the purification protocol was modified, Nhase activities were determined as 88.2 ± 10.78 Nhase U/mg protein, 16.58 ± 2.26 U/mg and 1.69 ± 0.3 U/mg for precipitates of 40, 60 and 80% of saturation with ammonium

sulfate, respectively. The accumulated enzyme activity in the precipitates with ammonium sulfate among 60 and 80% did not show significant differences, thus for the further work it was employed 60% saturation. Precipitated fraction was dissolved in Tris-HCl 50mM, NaCl 0.15M buffer pH 7.8 and ultrafiltrate (molecular weight cut off 10 KDa). The retentate was mixed up with 4% (v/v) Triton X-100 and 10% (v/v) acetonitrile and injected into size exclusion chromatography column (Sephacryl™ S-100 High Resolution). The fractions with activity were 10 (0.88 U/mg U/mg protein) and 11 (1.98 U/mg U/mg), with a purification factor of 72.12 and 162.16, respectively. Fractions 10 and 11 were injected in an ion exchange column (DEAE-Sepharose fast-flow). Fractions with Nhase activity were subjected to SDS-PAGE, showing only two bands between 50-75 KDa for fractions 20-30, fractions 31-33 observed a single band for the fraction 10 and also a single band in fractions 30-36 for the fraction 11. The purification of Nhase from a crude enzymatic extract of the immobilized *Lecanicillium lecanii* was achieved after only three steps of purification. The purified Nhase is most active at pH 4.0°C and 6.0.

INTRODUCCIÓN.

Después de la celulosa, la quitina es el polímero más abundante de la naturaleza, es un polisacárido estructural que se encuentra en la pared celular de hongos y en el exoesqueleto de artrópodos y nematodos (Dahiya y col., 2006). Las quitinasas son las enzimas responsables de la degradación de la quitina, estas hidrolizan los enlaces β -(1, 4) del polímero. Las quitinasas presentan un gran número de funciones fisiológicas en diferentes organismos, desde procariontes hasta eucariotes como plantas y animales. En bacterias y hongos, las quitinasas están involucradas en procesos de nutrición, parasitismo y en la morfogénesis, mientras que en plantas proveen resistencia contra hongos fitopatógenos. En vertebrados, forman parte del tracto digestivo favoreciendo la digestión de alimentos ricos en quitina, en humanos la actividad quitinolítica refuerza la defensa contra infecciones por nematodos (Duo-Chuan, 2006; Gummadi y col., 2009).

En general, las quitinasas tienen un gran espectro de aplicaciones biotecnológicas, tanto en la industria como en la agricultura, éstas enzimas pueden ser empleadas para el control de insectos plaga (Patil y col., 2000), localización histoquímica de quitina y quitosano, producción de proteína unicelular, obtención de protoplastos, producción de quitooligosacáridos y *N*-acetilglucosamina (Dahiya y col., 2006), así como en el control de hongos fitopatógenos (Almeida y col., 2007).

Las β -*N*-acetilhexosaminidasas (Nhasas) pertenecen a esta gran familia de enzimas quitinolíticas, las Nhasas catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico de la *N*, *N*-diacetilquitobiosa y otros quitooligosacáridos. En bacterias, dichas enzimas tienden a presentarse como un monómero de proteína, con una masa molecular aparente de 150 KDa, mientras que en hongos, se encuentran en forma de dímeros con una masa molecular en el rango de 11-150 KDa (Scigelova y Crout, 1999). Sus aplicaciones biotecnológicas han llevado a diversos grupos de investigación a producirlas, tratar de purificarlas y

caracterizarlas bioquímicamente (Scigelova y Crout, 1999). Se ha sugerido el uso del cultivo en medio sólido para la producción de Nhasa como una opción al cultivo sumergido (Matsumoto y col., 2004), sin embargo el cultivo en medio sólido presenta problemas en el escalamiento del proceso así como en el control de pH y temperatura (Hölker y col., 2004).

Una alternativa al cultivo sumergido tradicional, es el uso de células inmovilizadas, estas presentan ventajas al compararlos con cultivos en los que se inocula con células libres, entre ellas, mayor densidad celular, reutilización de la biomasa y mayores rendimientos del producto de interés. La inmovilización de microorganismos se ha utilizado en la producción de enzimas, antibióticos, esteroides, aminoácidos, ácidos orgánicos, polisacáridos, pigmentos y vitaminas; además en el tratamiento de agua y la bioremediación (Junter y Jouenne, 2004). Por otra parte, la espuma de poliuretano se ha utilizado como soporte en la inmovilización de hongos filamentosos para la producción de ácido oxálico (Sushil y Pataki, 2005), ácido glucónico (Mukhopadhyay y col., 2005), fosfatasa ácida (Aleksieva y col., 2003) y quitinasas (Fenice y col., 1998).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Las enzimas quitinolíticas.

Las quitinasas pueden ser divididas en dos grandes grupos: las endoquitinasas y las exoquitinasas, las primeras cortan al azar en los sitios internos de la cadena de quitina, produciendo oligómeros solubles de *N*-acetilglucosamina como quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa; las exoquitinasas a su vez se pueden dividir en dos subcategorías: las quitobiosidasas (EC. 3. 2. 1. 29) que liberan progresivamente diacetilquitobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena de quitina, y las β -(1, 4)-*N*-acetilglucosaminidasas (EC. 3. 2. 1. 30) o también llamadas quitobiasas, estas enzimas hidrolizan la diacetilquitobiosa, quitotriosa y quitotetraosa liberando el monómero *N*-acetilglucosamina (Duo-Chuan, 2006). Sin embargo, existe otro tipo de enzimas denominadas β -*N*-acetilhexosaminidasas (EC. 3. 2. 1. 52), estas enzimas se han identificado como quitobiosidasas y β -(1,4)-*N*-acetilglucosaminidasas; esta enzima cataliza la hidrólisis del extremo terminal no reductor de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilgalactosamina (Scigelova y Crout, 1999). Por su parte Seidl, (2008) divide a las enzimas quitinolíticas en dos grupos las quitinasas (endoquitinasas y exoquitinasas) y las β -*N*-acetihexosaminidasas (β -*N*-acetilglucosaminidasas).

De acuerdo con la clasificación hecha por Henrissat y Bairoch, 1993 (citado en: Shirai, 2006), las quitinasas son glicosil-hidrolasas, pertenecientes a las familias 18 y 19, las quitinasas de la familia 18 poseen en común un dominio barril $(\alpha/\beta)_8$, el cual consta de 8 hélices α y 8 hojas β , ésta familia de enzimas se encuentra en una amplia gama de organismos que incluyen virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y mamíferos. Por su parte la familia 19 consta de quitinasas provenientes de plantas y algunas cepas del genero *Streptomyces*, el dominio catalítico de estas enzimas presenta un alto contenido de hélices α , presentando cierta similitud con la lizosima y quitosanasa (Shirai, 2006).

En hongos filamentosos la quitinasas degradan la quitina para poder utilizar los oligómeros producidos como fuente de nutrientes, además, las quitinasas

intervienen en la remodelación de la pared celular de los hongos durante el crecimiento y ramificación de las hifas así como durante su autólisis (Seidl, 2008). Las quitinasas también intervienen en el ataque contra otros hongos (micoparásitos); por ejemplo, *Trichoderma harzianum* produce un serie de enzimas extracelulares como quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas durante el micoparasitismo contra algunos hongos fitopatógenos (Carsolio y col., 1999). Los hongos entomopatógenos producen quitinasas durante la penetración e invasión de la cutícula de insectos, estas quitinasas son fuertemente reguladas por los productos de degradación de la quitina que forma parte de la cutícula del insecto (Shirai, 2006).

β -N-acetilhexosaminidasa.

Clasificación.

Las β -N-acetilhexosaminidasas y β -N-acetilglucosaminidasas, presentan la clasificación EC 3.2.1.52, su nombre sistemático es 2-acetamido-2-deoxi- β -D-hexapiranosida-acetamidodeoxihexohidrolasa, son glicohidrolasas que catalizan el rompimiento del enlace glicosídico de los residuos terminales compuestos de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina de N-acetil- β -D-hexosamidas (ejemplo, N,N-diacetilquitobiosa y otros quitooligosácaridos, figura 1). De acuerdo con la base de datos Carbohydrate-Active Enzymes (<http://www.cazy.org>), estas enzimas pueden clasificarse en tres familias: GH 3, GH 20 y GH 84, siendo la familia 20 la más numerosa y estudiada, compuesta por enzimas encontradas desde bacterias hasta organismos eucariotas. (Slámová y col., 2010).

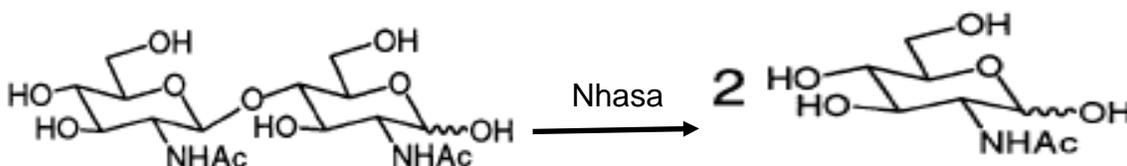


Figura 1. Hidrólisis de la N, N-diacetilquitobiosa por parte de la Nhasa.

Estructura.

La primera estructura de una Nhasa bacteriana fue resuelta en 1996 por Tews y col., (1996), desde entonces, se han logrado obtener estructuras cristalográficas de otras Nhasas bacterianas (Tabla 1). En contraste, sólo se conoce la estructura tridimensional de dos Nhasas eucariotas, las hexosaminidasas HexA ($\alpha\beta$) y HexB ($\beta\beta$), aisladas de placenta humana (Slámová y col., 2010). La determinación de la estructura tridimensional de las Nhasas provenientes de hongos es interesante debido a su gran potencial biosintético (*i. e.* reacciones de transglicosilación), pero hasta el momento no se han obtenido los cristales adecuados para la difracción de rayos X. Sin embargo, ya se ha logrado obtener un convincente modelo de una Nhasa del hongo *Aspergillus oryzae* con base en la homología existente entre Nhasas de bacterias y de humanos (Ettrich y col., 2006). En ese estudio, la arquitectura de la Nhasa de un hongo filamentoso reveló un nuevo mecanismo de regulación de la actividad enzimática *in vivo*, que se basa en el ensamblaje entre subunidades; la forma activa de la Nhasa excretada por el hongo consiste en dos subunidades catalíticas, cada una con un propéptido no enlazado covalentemente, el cual sufre proteólisis a partir de la enzima durante su procesamiento por acción de una proteasa dibásica, la reasociación no covalente de este propéptido con las subunidades catalíticas es esencial para la actividad de la enzima, el hongo es capaz de regular activamente la concentración del propéptido procesado en el retículo endoplásmico y, por lo tanto, la actividad específica de la Nhasa (Slámová y col., 2010).

Mecanismo de reacción.

Las enzimas de la familia 20 de las Nhasas presentan una región conservada formada por los residuos de aminoácidos His/Asn-Xaa-Gly-Ala/Cys/Gly/Met-Asp-Glu-Ala/Ile/Leu/Val, en ésta región se encuentra el par de residuos Aspartato-Glutamato encargados de la catálisis enzimática. El mecanismo catalítico de estas enzimas es una modificación del clásico doble-desplazamiento utilizado por algunas glicohidrolasas (Slámová y col., 2010).

En una Nhasa de *Serratia marcescens* hay evidencia del mecanismo catalítico de la enzima, en el cual, el residuo glutamato 540 actúa como donador de un protón, mientras que el grupo acetamido del sustrato funciona como nucleófilo; el residuo aspartato 539 orienta el grupo acetoamido del sustrato en una posición específica para formar un enlace de hidrógeno con el N2 del glúcido no reductor, en esta familia, el nucleófilo no es provisto por la enzima, sino por el grupo 2-acetoamido del sustrato, dando lugar al intermediario oxazolina (Prag y col., 2000). Experimentos con Nhasas mutadas muestran que el aspartato estabiliza el estado de transición de la oxazolina y ayuda a la correcta orientación del grupo 2-acetoamido para la catálisis (Slámová y col., 2010). En la figura 2 se muestra un mecanismo probable de reacción para las Nhasas.

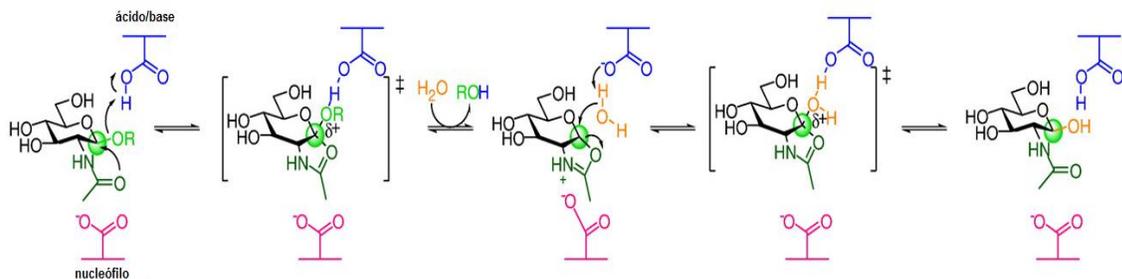


Figura 2. Probable mecanismo de la catálisis enzimática de las Nhasas (familia 20), se observa que la especie nucleofílica no es provista por la enzima sino por el grupo 2-acetoamido del sustrato. (Tomado de Slámová y col., 2010).

Producción de Nhasas.

La producción de Nhasas se ha logrado tanto en cultivo sólido como en cultivo líquido, autores como Matsumoto y col. (2004) mencionan una alta producción en cultivo sólido en comparación al cultivo sumergido, sin embargo, la tecnología de cultivo sumergido (fermentación sumergida) es ampliamente utilizada a nivel industrial, cerca del 90% de las enzimas producidas industrialmente se producen en cultivo sumergido, empleando condiciones optimizadas y microorganismos manipulados genéticamente (Hölker y col., 2004).

Al respecto Ramírez-Coutiño y col. (2006) obtuvieron extractos crudos enzimáticos con actividad Nhasa de 410 U/mg de proteína de actividad Nhasa en cultivo sumergido con *Verticillium fungicola* y fueron utilizados en la hidrólisis enzimática de quitina. Con el mismo hongo, produjeron Nhasas en un medio de cultivo al que se le aumento el pH gradualmente, logrando mejores resultados que un medio en el que se mantuvo un pH constante de 5, en este estudio se identificaron proteínas de 24, 40, 55 y 63 KDa (Ramírez Coutiño y col., 2010). En cultivo sumergido, en un bioreactor de 5 L, los óptimos de agitación y aireación en la producción de quitinasas por *Lecanicillium lecanii* fueron reportados a 150 rpm y 0.6 vvm, respectivamente. La aireación cambió cuando se escaló a 30 L, obteniéndose la más alta actividad enzimática a 0.9 vvm (Bing-Lan y col., 2003).

El cultivo en medio sólido también ha sido utilizado ampliamente en la producción de enzimas, el tipo de microorganismo y la naturaleza del sustrato sólido afectan los rendimientos de producción (Suresh y col., 2011). Matsumoto y col. (2004), produjeron Nhasas de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854, mediante fermentación en medio sólido y sumergido, empleando como inóculo micelio y esporas; la mayor producción de Nhasas se observó en fermentación en medio sólido utilizando micelio. En otro reporte, se estudió el efecto del porcentaje de humedad y la adición de glucosa al medio, utilizando espuma de poliuretano (PUF) como soporte para cultivo en medio sólido en dos presentaciones, en la primera la espuma fue cortada en cubos de aproximadamente 0.5 cm, y en la segunda en su presentación molida, evaluando el tamaño y porosidad de los dos tipos de PUF utilizados. Los mejores resultados en la producción de Nhasas y endoquitinasas se obtuvieron al emplear PUF cortado en cubos que en su forma molida, usando un medio con quitina coloidal sin adicionar glucosa y con porcentajes de humedad por arriba del 85% (Marín-Cervantes y col., 2008). Así mismo, se logró la producción de Nhasas en cultivo sólido del hongo *Fusarium oxysporum*, en este trabajo se empleó un pH inicial de 6 y un contenido de humedad del 65%

obteniendo un rendimiento de 23.6U/g de la fuente carbono, la masa molecular relativa de las dos isoenzimas encontradas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes fue de 67 KDa (Gkargkas y col., 2004),

En un estudio reciente, Rocha-Pino y col. (2011), muestran que la producción de quitinasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* es influenciada por factores como el tipo de cultivo (sumergido o sólido), así como por la fuente carbono, identificando proteínas con actividad Nhasa que están entre los 61, 80, 96 y 111 KDa, respectivamente, obteniendo una actividad específica de 7.58 ± 0.57 U/mg de proteína en caso del cultivo sólido y de 2.73 ± 0.57 U/mg de proteína para el cultivo sumergido.

En otro trabajo, en el que se emplea medio de cultivo sólido, Suresh y col. (2011), producen quitina-desacetilasas y quitinasas (endoquitinasas y Nhasas) del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676, obteniendo una producción de endoquitinasas de 0.28 ± 0.03 U/g de sustrato inicial a las 144h y de Nhasas de 0.79 ± 0.009 U/g de sustrato inicial a las 192h en un medio con salvado de trigo y de 0.49 ± 0.05 U/g de sustrato inicial para endoquitinasas a las 264 h, así como 0.38 ± 0.04 U/g de sustrato inicial para Nhasas en un medio con residuos de camarón. En un estudio similar, dos cepas de hongos fueron evaluadas para la producción de Nhasa en cultivo sólido empleando dos residuos agroindustriales como lo es el salvado de trigo y residuos de camarón, en este trabajo se observó que *Penicillium monoverticillium* produjo más enzima en el medio con salvado de trigo que la actividad obtenida por *Fusarium oxysporum*, los parámetros de cultivo como temperatura, tiempo de incubación, contenido de humedad y concentración de inóculo fueron optimizados empleando el método estadístico de superficie de respuesta (Suresh y col., 2011).

Purificación.

En general, las quitinasas de hongos se han purificado empleando la precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografías de exclusión molecular, afinidad, interacción hidrofóbica, además de isoelectroenfoque. Sin embargo, se obtienen bajos rendimientos durante la purificación, probablemente debido a la acción sinérgica de varias isoformas y a la pérdida de actividad durante el proceso de purificación (Duo-Chuan, 2006).

Un resumen de las estrategias de purificación de Nhasas de hongos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos generales de purificación de β -N-acetylhexosaminidasa de algunos hongos filamentosos.

Microorganismo	Metodología de purificación	Referencia
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.- Precipitación con sulfato de amonio	Ettrich y col. (2007)
	2.- Cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow)	
	3.- Cromatografía de intercambio iónico (SP-Sepharose Fast Flow)	
	4.- Cromatografía de intercambio iónico (MonoQ HR 10/10)	
<i>Penicillium acuelatum</i>	1.- Electroenfoque	Binod y col. (2005)
	2.- Cromatografía de intercambio iónico (DEAE Sephadex A-50)	
	3.- Cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-200 HR)	
<i>Trichoderma asperellum</i>	1.- Ultrafiltración.	Ramot y col. (2004).
	2.- Cromatografía de intercambio iónico (HiTrapQ column).	
	3.- Cromatografía de interacción hidrofóbica (phenyl-Sepharose).	
	4.- Electroforesis preparativa de poliacrilamida bajo condiciones nativas (Prep-cell, Bio-Rad).	
<i>Trichoderma</i>	1.- Liofilización	De Marco y

<i>harzianum</i>	2.- Cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-100 HR) 3.- Cromatografía de interacción hidrofóbica (phenyl-Sepharose CL-4B)	col. (2004)
<i>Stachybotrys elegans</i>	1.- Precipitación con sulfato de amonio 2.- Cromatografía de intercambio iónico (Source 15 Q) 3.- Cromatografía de exclusión molecular (Superose 12 HR 10/30) 4.- Cromatografía de exclusión molecular (Superose 12 HR 16/50)	Taylor y col. (2002)

Aplicaciones.

Las Nhasas son de gran interés en Biotecnología (Williams y col., 2002), éstas enzimas han sido usadas en la síntesis quimio-enzimática de oligosacáridos de interés biológico, basándose en su eficiente mecanismo de transglicosilación (Ettrich y col., 2007). Dvořáková y col. (2001) emplearon la actividad de transglicosilación de una Nhasa de *Aspergillus oryzae* para la producción de quitohexaosa y quitooctaosa a partir de una mezcla de quitoooligómeros preparados por hidrólisis ácida de quitina, en éste trabajo se optimizó la concentración de sustrato, la presencia de sales inorgánicas, la actividad enzimática y el tiempo de reacción para lograr la mayor producción de quitoooligosacáridos. Rauvolfová y col. (2004) investigaron la regioselectividad de distintas Nhasas de hongos en la transferencia de *N*-acetilglucosamina a galactooligosacáridos (D-galactosa, lactosa, 2-acetamido-2-deoxi-D-galactopiranos) para la síntesis de oligosacáridos no reductores, en éste estudio se emplearon Nhasas de los hongos *Aspergillus flavofurcatis*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus tamaritii*.

Lakshmanan y Loganathan, (2005), estudiaron la catálisis de Nhasas de *Aspergillus oryzae* y *Vigna radiata* en la síntesis de disacáridos y oligosacáridos, en éste trabajo, utilizando reacciones de transglicosilación e hidrólisis-reversa, logrando sintetizar los compuestos β -1-*N*-acetamido-2-

acetamido-2-deoxi-3,6-di-O-acetil-4-O-(2-acetamido-2-deoxi-3, 4, 6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-D-glucopiranososa y β -1-N-propionamido-2-acetamido-2-deoxi-3,6-di-O-acetil-6-O-(2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-D-glucopiranososa. El espectro de aceptores durante la transglicosilación catalizada enzimáticamente por Nhasas es prácticamente infinito, contrario a los glicosil-donadores, que son, usualmente, nitrofenil-glucósidos, una de las ventajas de estos compuestos es su alta reactividad, sin embargo, presentan desventajas como baja solubilidad a altas concentraciones y un precio elevado; debido a lo anterior autores como Fialová y col. (2005), estudiaron la catálisis de 20 Nhasas provenientes de hongos de los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hamigera*, *Penicillium*, *Talaromyces* y *Trichoderma*, probando la hidrólisis del sustrato 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosil-azida, que es una glicosil-azida la cual tiene como ventaja una mayor solubilidad, además de que es fácilmente removible de la mezcla de reacción. En éste trabajo, obtienen una alta transglicosilación empleando la glicosil-azida como donador del glúcido. Por otra parte, Zeng y col. (2007), sintetizan *p*-nitrofenil-disacaridos sulfatados, empleando una Nhasa del hongo *Aspergillus oryzae*, utilizando como sustratos α -D-GlcNAc-OC₆H₄NO₂-*p* y β -D-(6-sulfo)-GlcNAc-OC₆H₄NO₂-*p*, cuando estos componentes en distintas concentraciones se ponen en contacto con la enzima logran sintetizar β -D-6-O-sulfo-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-OC₆H₄NO₂-*p*, β -D-6-O-sulfo-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc-OC₆H₄NO₂-*p*, β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-(6-sulfo)-GlcNAc-OC₆H₄NO₂-*p*, β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -DGlcNAc-OC₆H₄NO₂-*p* y β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcNAc-OC₆H₄NO₂-*p*; identificados por HPLC y NMR.

Otra aplicación, de importancia comercial, que presenta ésta enzima es la producción de *N*-acetilglucosamina, el monómero de la quitina, que podría ser usado como fármaco en varias enfermedades (Binod y col., 2007), ya que puede ser utilizado como antiinflamatorio en el tratamiento de la colitis ulcerosa y otras inflamaciones gastrointestinales (Patil y col., 2000), como agente terapéutico en la osteoartritis y algunas alergias causadas por alimentos (Binod

y col., 2007), por este motivo, Binod y col. (2007), estudian la producción de *N*-acetilglucosamina usando quitinasas (endoquitinasas y Nhasas) de cultivos en medio sólido de *Penicillium acuelatum* y *Trichoderma harzianum*. Empleando como sustrato quitina coloidal, éstos investigadores obtienen altos rendimientos de *N*-acetilglucosamina observando la mejor producción con extractos de *Penicillium acuelatum* a las 60 y 90 horas de incubación, y las 150 h con extractos de *Trichoderma harzianum*.

Otras aplicaciones posibles para las Nhasas están en el control de hongos fitopatógenos e insectos plaga, la determinación de la actividad Nhasa puede servir como marcador de cepas patógenas de *Porphyromonas gingivalis* y *Ajellomyces dermatitidis* así como en la biodegradación de desechos ricos en quitina provenientes de moluscos (Scigelova y Crout, 1999).

Las Nhasas, presentan un gran potencial para uso biotecnológico, sin embargo, los precios aun no son lo suficientemente bajos para poderlas aplicar a nivel industrial. De acuerdo con el catálogo de Sigma-Aldrich, solo existe en el mercado un Nhasa de origen fúngico, la cual pertenece a *Aspergillus niger*, el precio de esta enzima es de 21,320.00 pesos/unidad enzimática (www.sigmaaldrich.com). En los años 1970s se publican a detalle las características de una Nhasa aislada de la preparación comercial Takadiastase®, ésta preparación podría servir como fuente de la enzima a un menor costo (Mega y col., 1970; Mega y col., 1972; Yamamoto, 1973).

***Lecanicillium lecanii* como productor de quitinasas.**

Lecanicillium lecanii es un hongo capaz de parasitar un amplio rango de insectos que incluyen Homóptera, Orthoptera, Coleóptera y Lepidóptera. Ha sido aislado de diferentes plagas de importancia agrícola como áfidos, cóccidos, trips y mosquitas blancas como *Trialeurodes vaporarium* y *Bemisia tabaci*, (Kuo-Ching y col., 2002; García-Juárez y col., 1999). *Lecanicillium lecanii* ha sido reportado como un agente en el biocontrol de fitopatógenos como *Oidium*

tingtanium, *Sphaerothoca fuliginea* y *Uncinula necator*, así como del áfido del algodón *Aphis gossypii* (Jeong y col., 2005), este hongo puede infectar a *Ceroplastes japonicus* (Liu y col., 2009) y a la garrapata del bovino *Rhipicephalus microplus* (Angelo y col., 2010).

El parasitismo y penetración de la cutícula de insectos y ácaros por *Lecanicillium lecanii* es el resultado de una hidrólisis enzimática, por la acción sinérgica de quitinasas y una presión mecánica, lo que produce una invasión masiva de tejidos internos y, finalmente la asimilación de nutrientes y el desarrollo del hongo sobre el cadáver del hospedero (Askary y col., 1999). La cualidad natural del hongo, ha llamado la atención para producir quitinasas (endoquitinasas y Nhasas), en cultivo en medio sólido (Barranco-Florido y col., 2002; Matsumoto y col., 2004; Marín-Cervantes y col., 2008, Rocha-Pino y col., 2011), en medio sumergido (Bing-Lan y col., 2003, Matsumoto y col., 2004, Rocha-Pino y col., 2011) y con el hongo inmovilizado en cultivo sumergido (Carrasco-Navarro y col., 2009).

Inmovilización de microorganismos.

La inmovilización es el procedimiento por medio del cual una célula o enzima se confina dentro de un sistema, permitiendo el libre paso de sustratos y productos a través de él (Barranco-Florido. 1996). A pesar del potencial que presenta el uso de células inmovilizadas, hasta ahora es limitado el uso a gran escala (Freeman y Lilly, 1998). Las ventajas que presentan las células inmovilizadas son la fácil separación de las células del medio líquido; la disminución de la viscosidad del medio, mejorando la transferencia de oxígeno, además de que se produce una alta concentración celular en pequeños volúmenes (Wang y col., 2005).

Existen varios métodos de inmovilización entre los que se encuentran: Adsorción, unión covalente, entrecruzamiento y atrapamiento.

El método del atrapamiento, resulta atractivo para microorganismos que desarrollan estructuras filamentosas (*i. e.* hongos filamentosos), por ejemplo, el atrapamiento en espuma de poliuretano (PUF), que ocurre como consecuencia natural del crecimiento celular (Vassilev y col., 2001), de hecho se ha logrado producir quitinasas en cultivo sumergido con *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF (Carrasco-Navarro y col., 2009). En otro trabajo Fenice y col. (1998), inmovilizaron al hongo *Penicillium janthinellum* en PUF y en soportes macroporosos con base en celulosa para la producción de quitinasas en lote y en continuo, la máxima producción enzimática (342 U/L) se logra utilizando los soportes con base en celulosa.

JUSTIFICACIÓN.

Debido a los potenciales usos biotecnológicos de la Nhasa, son de gran importancia los estudios que permitan una mayor producción de la enzima. Se han llevado a cabo estudios en cultivo en medio sólido para la producción de quitinasas de *Lecanicillium lecanii*, sin embargo este tipo de cultivo presenta algunos problemas en el control de pH y temperatura, así como en escalamiento del proceso (Hölker y col., 2004).

Por otro lado los estudios en cultivo sumergido para la producción de quitinasas (Nhasas y endoquitinasas) de *Lecanicillium lecanii*, solo se han centrado en el uso de células libres, por lo que una alternativa al cultivo en medio sumergido tradicional (células libres) es el uso de células inmovilizadas para la producción de enzimas. Por otra parte, no existen estudios enfocados a la purificación y caracterización de Nhasas de *Lecanicillium lecanii*, por lo que resulta muy importante diseñar estrategias de purificación de estas enzimas.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Producir y purificar la enzima Nhasa obtenida a partir de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF.

Objetivos específicos:

- Producir la Nhasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF.
- Diseñar una estrategia de purificación de la Nhasa a partir del extracto crudo enzimático obtenido del cultivo inmovilizado en PUF.
- Determinar la temperatura y pH óptimo de la enzima.

HIPÓTESIS.

Se obtendrá una mayor producción de Nhasa empleando a *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF que utilizando esporas como inóculo en medio líquido, lo que facilitará su purificación.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Microorganismo.

Se utilizó la cepa de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854, la cual fue propagada en agar de papa y dextrosa. La obtención de las esporas que se utilizaron como inóculo se llevó a cabo, mediante agitación mecánica, de cultivos esporulados de ocho días con una solución de Tween 80 (0.01% v/v), obteniéndose una concentración final de 10^7 esporas/mL, determinada mediante conteo directo en una cámara de Neubauer (ecuación 1).

$$N = n \times F \times D \quad (1)$$

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

Preparación de quitina coloidal.

Se disolvió quitina en HCl concentrado a 0°C con agitación continua, hasta obtener una consistencia de jarabe, posteriormente se mezcló con agua helada para precipitar la quitina, a continuación se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos (Beckman J2 – MI, rotor JA – 14). La pasta obtenida fue lavada con NaOH 0.1M a 4°C y centrifugada hasta neutralidad.

Medio de cultivo.

El medio Czapeck modificado fue utilizado como el medio de cultivo para la inmovilización de *Lecanicillium lecanii* en PUF, así como en cultivo sumergido. La composición del medio es (g/L): NaNO₃ 3.73, K₂HPO₄ 3.0, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.096, KCl 0.5, quitina coloidal 10. El pH del medio se ajustó a 6.0 con la adición de HCl o NaOH 0.1M.

Inmovilización de *Lecanicillium lecanii* en PUF.

La inmovilización se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 250mL en donde se esterilizó 0.5 g de PUF (0.125 cm^3) y 100 mL de medio de cultivo a 121 °C

durante 20 minutos. Se inoculó el cultivo con 5×10^7 esporas/g de nutrientes. La inmovilización se llevó a cabo durante siete días a 25 °C y 100 rpm. Al final de la inmovilización se separó el PUF del medio de cultivo por filtración, el PUF con el hongo ya inmovilizado (biopartículas) se lavó con una solución de $MgCl_2$ al 2% (p/v) con el fin de eliminar sustancias del medio de cultivo anterior. Las biopartículas sirvieron como inóculo para el cultivo sumergido en el bioreactor. El filtrado se utilizó como extracto crudo enzimático para análisis posteriores (Carrasco-Navarro y col., 2009).

Cultivo sumergido.

El cultivo sumergido se llevó a cabo en un biorreactor de 3 L (Applikon B. V, Holanda), utilizando como inóculo las biopartículas. El pH, temperatura, velocidad de agitación y aireación fueron controlados durante los cinco días de cultivo a valores de 6.0, 25 °C, 102 rpm y 1vvm respectivamente (Carrasco-Navarro y col., 2009). Se tomaron muestras cada 24 h, estas fueron centrifugadas a 22095 x g durante 10 min (Beckman J2 – MI, rotor JA – 14), el sobrenadante se filtró (papel filtro Whatman No. 40) y se usó como extracto crudo enzimático para la cinética de actividad Nhasa; después de 120 h de cultivo, se recuperó el medio para la purificación de la Nhasa. El medio de un cultivo sumergido inoculado con esporas del hongo en el biorreactor bajo las mismas condiciones que el cultivo con el hongo inmovilizado se utilizó como control.

Determinación de la actividad Nhasa.

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

midió la absorbancia a 400nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, EUA).

La concentración de *p*-nitrofenol se determinó contra una curva patrón (Anexo 1), una vez obtenido el valor de la muestra, esta se expresó como $\mu\text{mol/mL}$ y posteriormente se utilizó la definición:

“Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que libera $1\mu\text{mol}$ de *p*-nitrofenol por minuto (Tronsmo y Harman, 1993)”.

Se reportó la actividad Nhasa volumétrica como U/mL de medio de extracto crudo, la específica como U/mL/mg de proteína y de rendimiento como U/g de sustrato inicial (U/gSSI).

Determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson.

Para la cinética del cultivo sumergido, la determinación de proteína se realizó por el método de Lowry modificado por Peterson (1977), empleando seroalbúmina bovina como proteína estándar (Anexo 2).

Determinación de proteína por el método de Bradford.

La determinación de proteína durante la purificación de la Nhasa fue realizada de acuerdo con la metodología descrita (Bio-Rad, Protein Assay, bulletin 9004), el cual se basa en trabajo reportado por Bradford, (1976), empleando el microensayo, para lo cual $160\mu\text{L}$ de muestra fueron mezclados con $40\mu\text{L}$ del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, número de catalogo 500-0006), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante una curva estándar utilizando albumina bovina (Anexo 3).

Electroforesis de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Se realizaron geles unidimensionales bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli, (1970), el gel de

concentración fue al 5% y el de separación al 12%, con condiciones eléctricas de voltaje constante de 150 V, la muestra fue revelada mediante tinción con azul de Coomasie (Bio-Rad, número de catálogo 161-0786) o con tinción de plata (Bio-Rad, número de catálogo 161-0449EDU), se emplearon marcadores de masa molecular de amplio rango (Bio-Rad, Precision Plus Protein standards).

Zimograma de actividad Nhasa.

La actividad Nhasa del extracto crudo enzimático y de las fracciones de purificación fueron detectadas mediante geles de poliacrilamida usando un sustrato, que por acción enzimática produce un compuesto fluorescente (4-metilumbeliferil), dicho sustrato fue 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- β -D-glucosamina (Sigma-Aldrich, número de catálogo M2133). Al gel de separación de acrilamida (12%, según el procedimiento descrito por Laemmli, 1970), se le adicionó 0.01% p/v del sustrato anterior. La presencia de actividad enzimática se visualizó bajo iluminación ultravioleta (Bio-Rad, UV Transilluminator 2000, EUA) (Rocha-Pino, 2009).

Purificación de Nhasa.

Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$.

Las proteínas presentes en este extracto crudo enzimático se precipitaron con la adición de sulfato de amonio, en un principio se adicionó lo suficiente de la sal para llevar el extracto al 40% de saturación, se dejó toda la noche equilibrándose a 4°C, posteriormente el extracto se centrifugó a 18566 x g durante 35 min. (Beckman J2 – MI, rotor JA – 14), la fracción precipitada fue solubilizada en amortiguador 0.05M Tris-HCl, 0.15 M NaCl pH 7.5, al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta obtener el 80% de saturación, se procedió igualmente que para la fracción al 40%. En una segunda ronda de precipitación se probó un porcentaje intermedio de saturación que fue al 60% de saturación, por lo que se llevó previamente al 40% a continuación se llevó al 60% de saturación y, finalmente, al 80% de

saturación. Se realizaron ensayos de actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993) y proteína (método de Bradford) para cada una de las fracciones después de eliminar el exceso de sulfato de amonio por ultrafiltración.

La fracción resolubilizada fue ultrafiltrada en una membrana con un tamaño de corte de 10KDa (Millipore, Pellicon XL Filter), contra una solución amortiguador de 0.05M Tris-HCl- 0.15 M NaCl pH 7.8, en un segundo protocolo de purificación se adicionó Tritón x-100 hasta alcanzar una concentración de 4% y acetonitrilo, hasta 10% v/v concentración final.

Cromatografía de exclusión molecular.

La fracción proveniente de la precipitación con sulfato de amonio fue inyectada en una columna Sephacryl™ S-100 High Resolution 26/60 (GE Healthcare, EUA), la elución se llevó a cabo aplicando un flujo isocrático de solución amortiguadora de 0.05M Tris-HCl- 0.15 M NaCl pH 7.8, a un flujo de 1.3 ml/min. La cromatografía fue seguida por la absorbencia a 280nm; a cada una de las fracciones se les determinó actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993) y proteína (Bradford 1976).

Cromatografía de intercambio aniónico.

Las fracciones con mayor actividad Nhasa del extracto fueron ultrafiltradas en unidades de ultrafiltración con una membrana de 30 KDa (Millipore, Amicon Ultra), en este paso de ultrafiltración se cambió el amortiguador a Tris-HCl 30mM pH 7.8, la fracción fue inyectada (1mL) en una columna de intercambio aniónico Macro-Prep® high Q (Bio-Rad, EUA). Las fracciones a las cuales se les adiciono TritónX100 y acetonitrilo fueron inyectadas en una columna DEAE-Sepharose™ fast-flow (GE Healthcare, EUA); las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl (0-1 M) en amortiguador Tris-HCl 30 mM, pH 7.8, a un flujo de 1 ml/min a cada fracción eluida se le determinó actividad Nhasa.

Todos los pasos de cromatografía fueron realizados en un equipo de FPLC (Biologic Work Station, Bio-Rad EUA).

Caracterización de Nhasa.

Temperatura óptima.

La temperatura óptima de la enzima se evaluó a diferentes condiciones de temperatura, probando 5, 15, 25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C, mediante el ensayo de actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993)

pH óptimo.

Para determinar el pH óptimo de la enzima se prepararon soluciones amortiguadoras en un intervalo de pH 3-8, se usaron las siguientes soluciones: solución amortiguadora de acetatos 0.1M pH 3 y 4, solución amortiguadora citrato-fosfato 0.2M pH 5-8, la determinación de la actividad Nhasa se realizó siguiendo el protocolo original (Tronsmo y Harman, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Cinética de actividad Nhasa del cultivo sumergido.

Se compararon dos tipos de inóculo para determinar la cinética de actividad de Nhasa, uno, utilizando biopartículas y otro, esporas de *Lecanicillium lecanii*. La figura 3 muestra los resultados de producción enzimática obtenidos durante 120 h de cultivo. La mayor actividad enzimática se obtiene al utilizar biopartículas, obteniéndose un máximo de actividad volumétrica de 48.82 ± 6.14 U/L, más de cuatro veces la actividad obtenida al utilizar esporas (11.2 ± 0.26 U/L). Éste resultado apoya lo encontrado por Carrasco-Navarro y col., (2009), que optimizaron el pH y la velocidad de agitación del cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado para producción de Nhasas y endoquitinasas, en dicho trabajo se reporta una actividad Nhasa de 47.28 U/L a un pH de 6 y 102 rpm, en el presente trabajo se obtuvo una actividad un poco mayor, 48.82 ± 6.14 U/L.

En reportes similares, Bing-Lan y col. (2003), obtienen una actividad enzimática de 19.9 mU/mL por *Lecanicillium lecanii* usando un bioreactor de 30L del tipo airlift, cuando ellos mismos emplean un bioreactor del tipo tanque agitado, la actividad enzimática fue de 18.2mU/mL, estos valores representan sólo el 40 y 37% de la actividad obtenida en el presente trabajo.

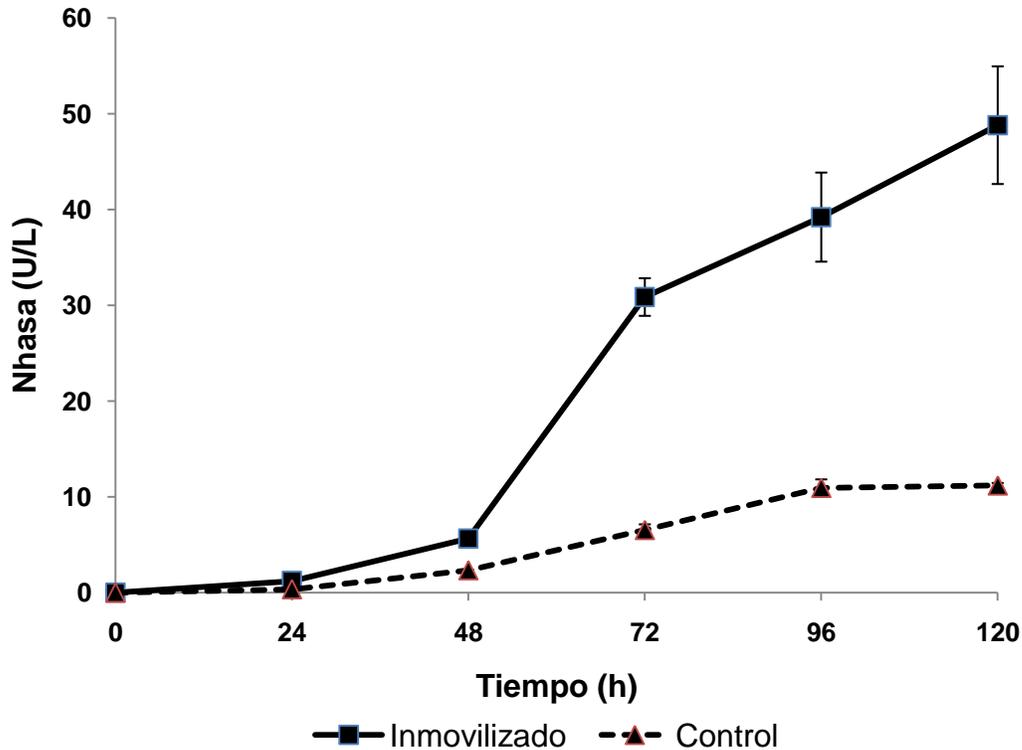


Figura 3. Actividad Nhasa volumétrica de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF y con esporas en un bioreactor de 3L a pH 6 y a una velocidad de agitación de 102 rpm.

La figura 4 muestra los valores de actividad específica obtenidos durante la cinética de producción enzimática de 120 h. Se muestran que la mayor actividad enzimática está presente al utilizar biopartículas, obteniéndose un máximo de actividad específica de 0.25 ± 0.07 U/mg de proteína, mientras que la mayor actividad al inocular el reactor con esporas fue de 0.028 ± 0.0007 U/mg.

En otros reportes empleando cultivos sumergidos con *Verticillium fungicola* se obtienen extractos con actividad específica de 410 U/mg de proteína a pH 6 y 40°C (Ramírez-Coutiño y col., 2006), por su parte Matsumoto y col. (2004) logran obtener actividades específicas de 542.5 U/mg de proteína con esporas de *Lecanicillium lecanii* inoculadas en cultivo en medio sólido, sin embargo, ésta actividad aumenta cuando se inocula con micelio, obteniendo 1025 U/mg en

cultivo sumergido, estos autores reportan actividades de 418.5 y de 732.8U/mg cuando se inocula con esporas y micelio respectivamente, éste aumento de actividad se podría deber a que estos investigadores emplean desperdicios de camarón como fuente de carbono, el cual representa en una fuente de nutrientes más compleja; por otra parte Rocha-Pino y col. (2011) estudiaron la producción de quitinasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivos sólidos y sumergidos, los investigadores consiguen actividades de 7.58 y 2.73U/mg de proteína en cultivo sólido y sumergido respectivamente.

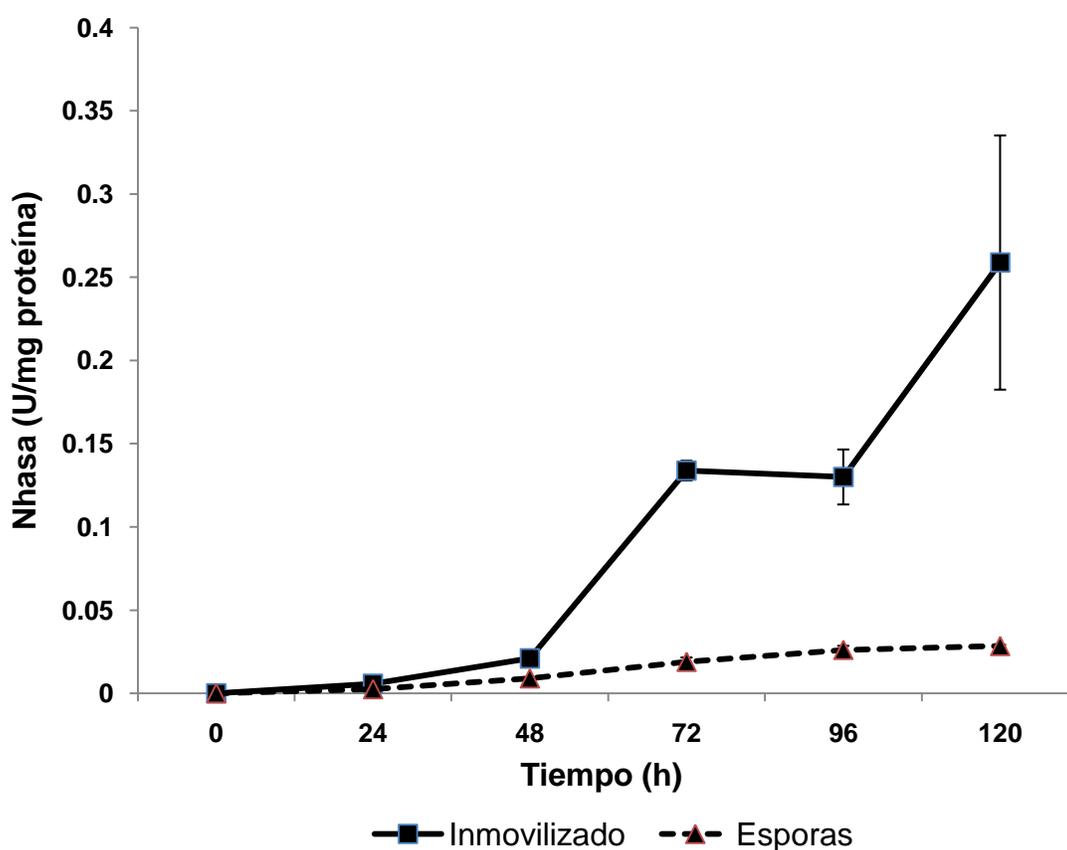


Figura 4. Actividad Nhasa específica de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF y con esporas en un biorreactor de 3L a pH 6 y a una velocidad de agitación de 102 rpm.

La, figura 5 muestra la actividad de la Nhasa/gSSI, la mayor actividad, al igual que en las anteriores, está presente en el cultivo con las biopartículas, alcanzando un valor de 2.73 ± 0.34 U/gSSI, en comparación con el cultivo inoculado con esporas que presentó un máximo de 0.62 ± 0.014 U/gSSI a las 120h de cultivo. El valor de actividad obtenido con las biopartículas es de hecho, mayor que lo reportado por otros autores, por ejemplo Suresh y col. (2011) logran obtener una actividad Nhasa de 0.79 ± 0.009 U/gSSI a las 192 h de un cultivo sólido del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* con un medio con salvado de trigo, lo que representa solo el 28% de la actividad producida con las biopartículas de *Lecanicillium lecanii*, y de 0.38 ± 0.04 U/gSSI en un medio con residuos de camarón, que es solo el 13% de la actividad producida por las biopartículas de *Lecanicillium lecanii*; sin embargo el hongo *Penicillium monovercillium* CFR 2 produce Nhasas en cultivo en medio sólido, obteniendo 70.23 ± 4.14 U/gSSI (Suresh y col., 2011), 25 veces más de lo obtenido con las biopartículas; por su parte Matsumoto y col. (2004) reportaron un valor de actividad de 540 U/gSSI en un cultivo sumergido inoculado con esporas de *Lecanicillium lecanii* y de 965.5 U/gSSI al inocular con micelio, en éste mismo estudio, se probó el cultivo sólido con el mismo hongo, derivando en un aumento de la actividad enzimática, alcanzando 1016 U/gSSI al inocular con esporas y 1673 U/gSSI al inocular con micelio de *Lecanicillium lecanii*.

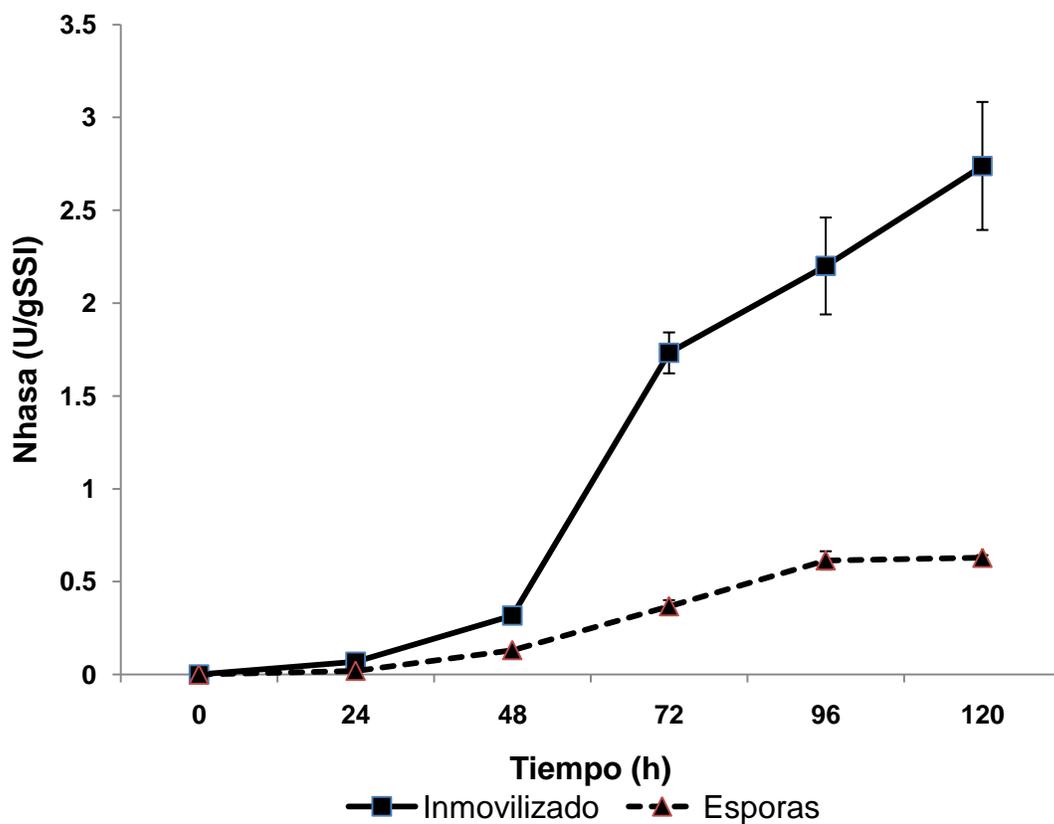


Figura 5. Actividad Nhasa de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF y con esporas expresada en U/gSSI en un bioreactor de 3L a pH 6 y a una velocidad de agitación de 102 rpm.

Los resultados anteriores (figuras 3, 4, 5) muestran que la mayor actividad Nhasa está presente al usar como inóculo biopartículas en comparación a las esporas. En un estudio similar Fenice y col. (1998) reportan las ventajas de utilizar al hongo *Penicillium janthinellum* inmovilizado en comparación a su forma libre para la producción de quitinasas, ya que obtienen una mayor producción enzimática empleando lotes repetidos al reutilizar la biomasa inmovilizada. Es probable que éste aumento de actividad enzimática se deba a que al utilizar esporas como inóculo exista un aumento en la viscosidad del medio, derivando en una ineficiente transferencia de masa, sin embargo un aumento en la velocidad de agitación podría causar daño al micelio afectando la producción de metabolitos de interés (Abd-Aziz y col., 2008), en cambio, en los

cultivos con células inmovilizadas, la viscosidad se ve disminuida mejorando la transferencia de oxígeno en el cultivo (Wang y col., 2005).

Purificación de Nhasa: primer protocolo de purificación.

Precipitación con sulfato de amonio.

En el primer protocolo de precipitación se probaron dos porcentajes de saturación con sulfato de amonio el 40 y 80%, en la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en la precipitación con sulfato de amonio, se puede observar que la máxima actividad Nhasa específica está presente en la fracción precipitada al 40% de saturación, con una actividad específica de 4.22 ± 0.6 U/mg de proteína, por tal motivo se decidió trabajar por separado estas dos fracciones en el segundo paso de purificación mediante exclusión molecular.

Después de la precipitación con sulfato de amonio se logró recuperar el 50.9% del total de la enzima precipitada al 40% y el 60% para la fracción precipitada al 80% (4.19 y 2 U/mg de proteína respectivamente). Estos resultados son similares a lo reportado por Yamamoto y col. (1985), ya que obtienen un rendimiento del 87% en el paso de precipitación con sulfato de amonio durante la purificación de una Nhasa de *Penicillium oxalicum*, sin embargo, estos autores logran una actividad específica de 13.3 U/mg de proteína; por otra parte en la purificación de una Nhasa del hongo micoparasito *Stachybotrys elegans*, se obtiene una recuperación del 83.71% del total de actividad Nhasa, obteniendo una actividad específica de 0.1 U/mg de proteína (Taylor y col., 2002).

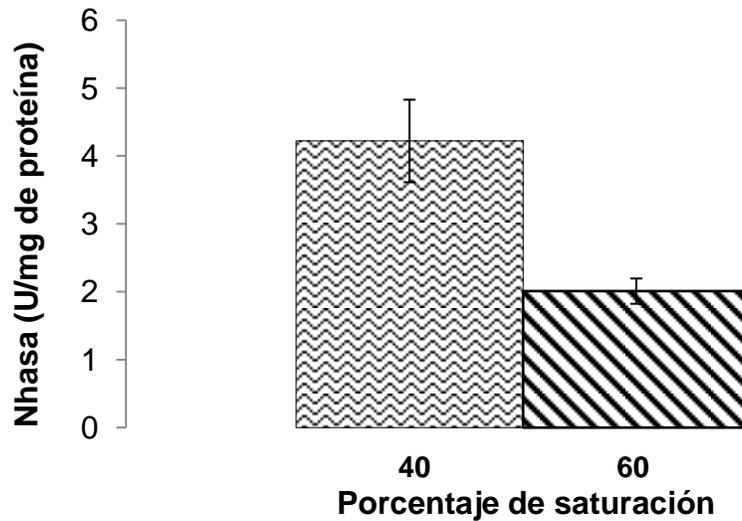


Figura 6. Determinación de la actividad Nhasa específica de las fracciones a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.

Cromatografía de exclusión molecular.

Las fracciones precipitadas con sulfato de amonio fueron inyectadas por separado en una columna de exclusión molecular, los resultados de la elución de proteínas en este paso de purificación se presentan en la figura 7, donde se observan 6 picos de proteína de la fracción precipitada al 40% de saturación, sin embargo solo en los dos primeros se tiene una actividad enzimática alta, la cual está presente en las fracciones que van de la 4 a la 19, por lo que se decidió mezclarlas para obtener una sola fracción; en este paso de purificación se recuperó el 4% del total de la enzima del extracto crudo.

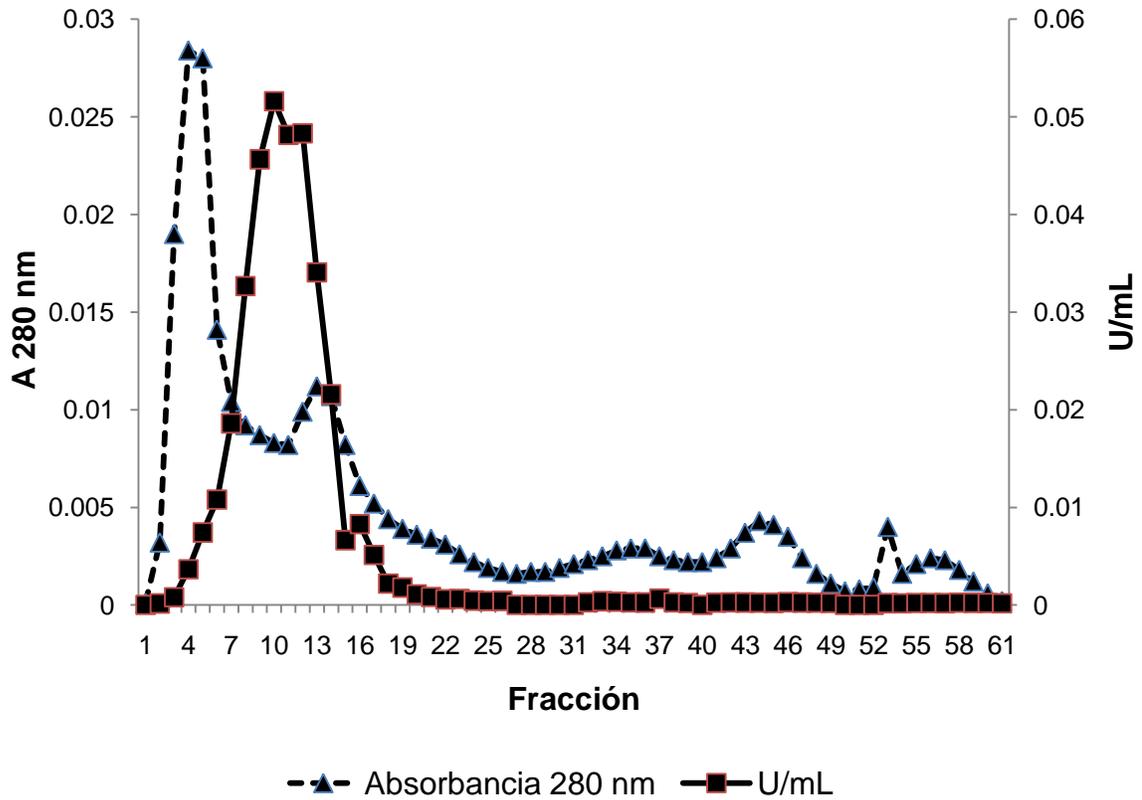


Figura 7. Elución de proteínas de la fracción solubilizada al 40% de saturación con sulfato de amonio en una columna de exclusión molecular, la elución se llevó a cabo aplicando un flujo isocrático de solución amortiguadora de 0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH 7.8 a un flujo de 1.3ml/min.

La elución con la fracción precipitada al 80% de saturación (figura 8) muestra 6 picos de proteína, las fracciones que tienen la mayor actividad enzimática son de la 3 a la 19, con una recuperación de la enzima total del 2.57%, con estos resultados se aprecia que el porcentaje de recuperación de esta fracción es menor en comparación a la fracción precipitada al 40% (4% de recuperación) ya que solo se obtuvo el 2.57%.

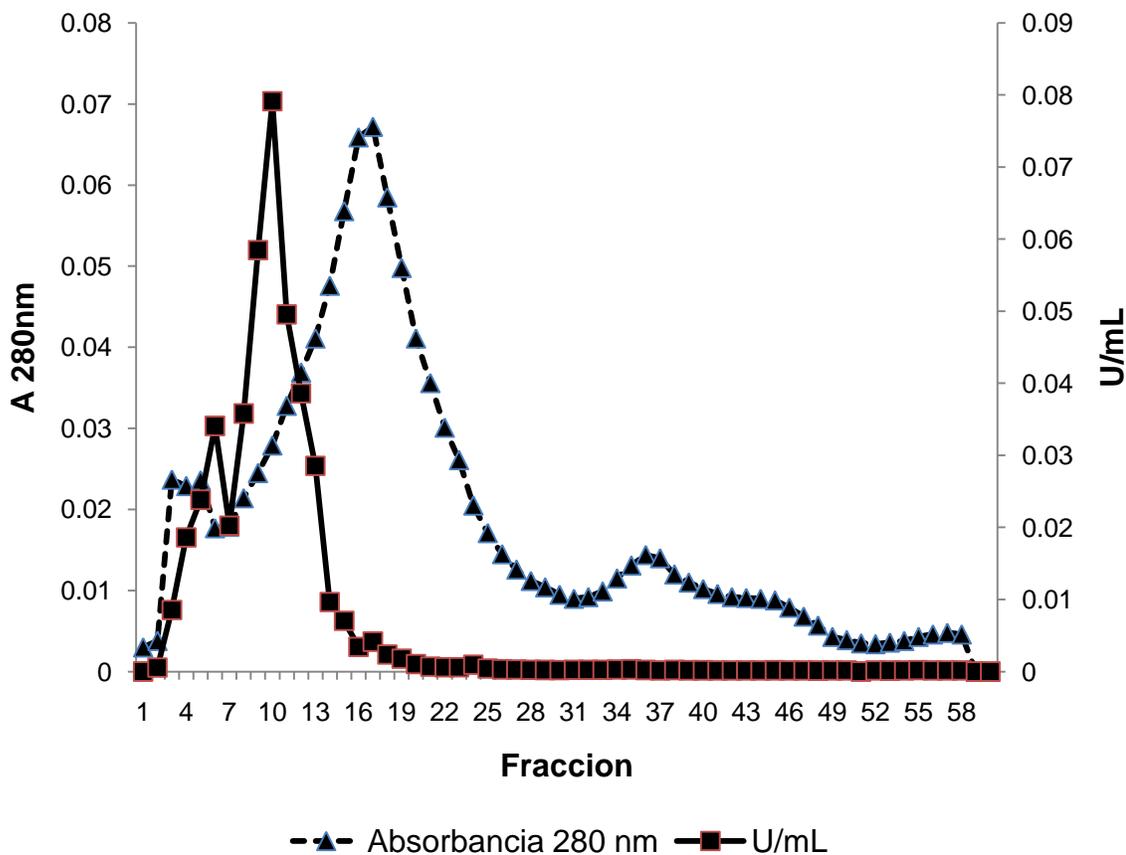


Figura 8. Elución de proteínas de la fracción resuspendida al 80% de saturación con sulfato de amonio en una columna de exclusión molecular, la elución se llevó a cabo aplicando un flujo isocrático de solución amortiguadora de 0.05M Tris-HCl, 0.15M NaCl pH 7.8 a un flujo de 1.3ml/min.

Cromatografía de intercambio iónico.

Las fracciones con mayor actividad Nhasa fueron inyectadas en una columna de intercambio aniónico (Macro-prep High Q Support), sin embargo no se logró la resolución deseada, ya que al analizar las fracciones con actividad Nhasa después de éste paso de cromatografía en un gel de electroforesis (figura 9) se observó que el número de proteínas era muy similar al paso anterior (cromatografía de exclusión molecular); por lo que se decidió probar una columna diferente, la cual fue una DEAE-Sepharose Fast-Flow.

SDS-PAGE.

Se realizaron geles de electroforesis con el fin de observar las proteínas presentes en los distintos pasos de purificación, la figura 9 A muestra las proteínas separadas en gel de poliacrilamida, en ésta figura se pueden apreciar las proteínas que fueron concentradas durante la precipitación con sulfato de amonio y que no podían observarse en el extracto crudo dada su baja concentración, sin embargo después de la elución en la columna de exclusión molecular siguen observándose algunas proteínas presentes en la fracción precipitada con sulfato de amonio, la fracción eluída después de la cromatografía de intercambio iónico muestra más de una sola banda, probablemente no hubo una buena resolución en la columna; en la tinción con azul de Coomassie (figura 9B) se pueden apreciar dos bandas concentradas que corresponden a un masa molecular de entre 38.7 y 54.2 KDa y entre 54.2 y 100.2 respectivamente.

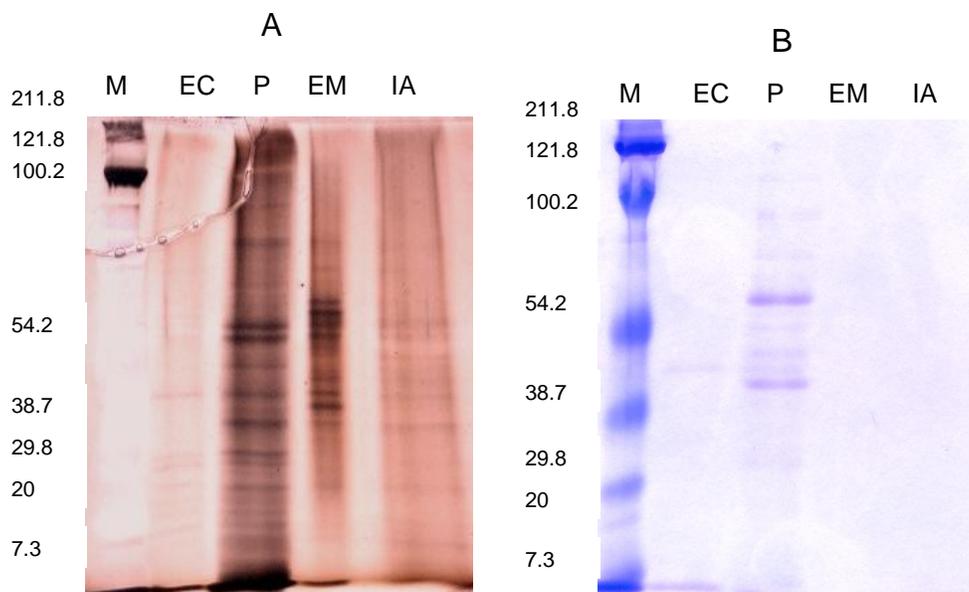


Figura 9. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes de los distintos pasos de la purificación de Nhasa a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación, A: tinción de plata, B: tinción con azul de Coomassie. M: marcador de masa molecular, EC: Extracto crudo, P: fracción obtenida después de precipitación con sulfato de amonio, EM: fracción obtenida

después de cromatografía de exclusión molecular, IA: fracción obtenida después de cromatografía de intercambio aniónico.

En la figura 10 se aprecia el electroferograma de la electroforesis desnaturizante de los diferentes pasos de purificación con la fracción precipitada al 80% de saturación, en ésta se puede observar el efecto de la precipitación con sulfato de amonio, ya que se observan bandas más concentradas que en el extracto crudo (figura 10A), sin embargo, después de la cromatografía de intercambio iónico se siguen observando más de una banda de proteína, estos resultado son similares a la fracción precipitada al 40%; al realizar la tinción con azul de Coomassie (figura 10B) se aprecia una banda concentrada de la fracción separada por cromatografía de exclusión molecular, el efecto de concentración de la cromatografía de intercambio iónico se puede observar al emplear esta tinción, ya que se observan al menos tres bandas concentradas.

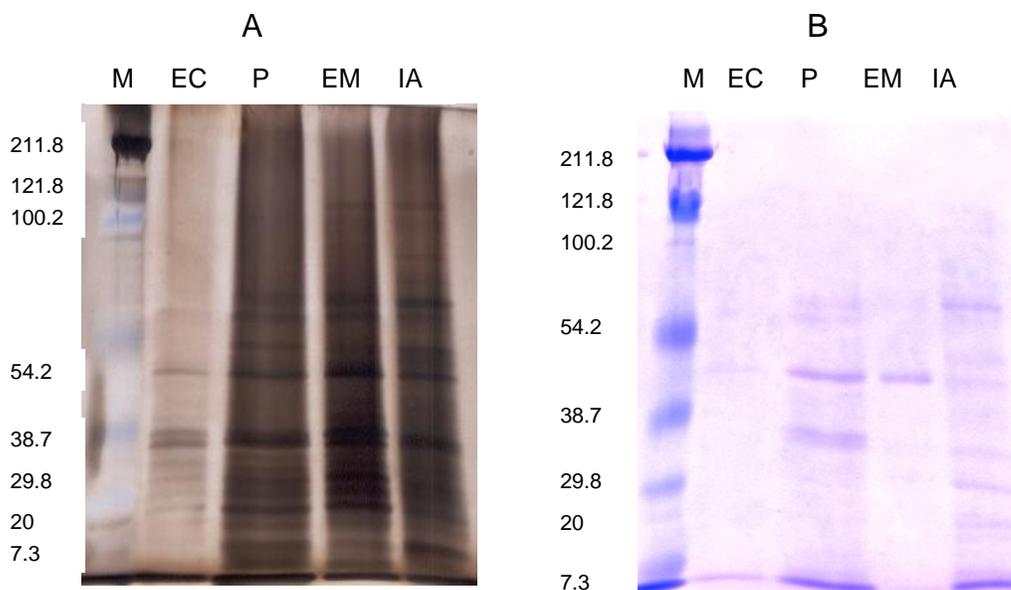


Figura 10. Electroforesis bajo condiciones desnaturizantes de los distintos pasos de la purificación de Nhasa a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación, A: tinción de plata, B: tinción con azul de Coomassie. M: marcador de masa molecular, EC: Extracto crudo, P: fracción obtenida

después de precipitación con sulfato de amonio, EM: fracción obtenida después de cromatografía de exclusión molecular, IA: fracción obtenida después de cromatografía de intercambio aniónico.

En la figura 11 se muestra el zimograma de cada uno de los pasos de purificación.

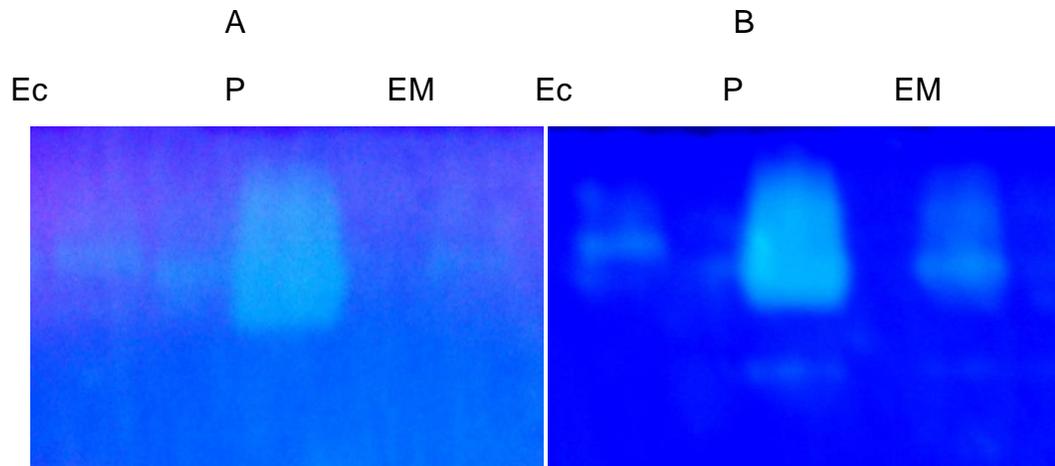


Figura 11. Actividad Nhasa en gel de poliacrilamida de cada uno de los pasos de purificación utilizando como sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucosamina, A: fracción precipitada al 40% de saturación, B: fracción precipitada al 80% de saturación. Ec: extracto crudo, P: precipitación con sulfato de amonio, EM: Exclusión molecular.

Tabla de purificación.

Durante la purificación de una proteína es necesario llevar a cabo un registro que contenga los diferentes pasos de purificación, la actividad enzimática, los factores de purificación y el rendimiento de la enzima, ésta información es de gran ayuda para comparar diferentes protocolos y para conocer la eficiencia de cada paso de purificación (García Carreño y Navarrete del Toro, 1999). Este registro se recopila en una tabla llamada Tabla de Purificación, se realizaron dos tablas de purificación, una para cada una de las fracciones precipitada con sulfato de amonio. En la tabla 2 se resumen los resultados de la purificación parcial de una Nhasa de la fracción precipitada al 40% de saturación (por la

baja resolución de la cromatografía de intercambio iónico, esta no se incluye en la tabla), al inicio de la purificación se tenía una concentración de proteína de 23.48mg y una actividad total de 73.02 U, obteniéndose una actividad específica de 3.11 U/mg; durante el primer paso de purificación (precipitación con sulfato de amonio) se recuperó el 50.9% de la enzima, con un factor de purificación de 1.35, autores como Taylor y col. (2002) obtienen un factor de purificación de 1.25 durante la purificación de Nhasa de *Stachybotrys elegans*, estos autores también utilizan la precipitación con sulfato de amonio como primer paso de purificación; Othakara y col. (1981) recuperan el 95% de la actividad Nhasa del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*, con un factor de purificación de 5.6. Después de la segunda etapa de purificación que corresponde a la cromatografía de exclusión molecular solo se recuperó el 4% de la enzima proveniente del extracto crudo, sin embargo la actividad específica aumento casi un 90% con respecto al paso anterior, en este paso se logró un factor de purificación de 2.55, que comparado con los resultados de Taylor y col. (2002) resulta un valor bajo dado que estos investigadores obtienen un factor de purificación de 7.5 para el paso de cromatografía de exclusión molecular, así mismo Ogawa y col. (2006) logran un factor de purificación de 20 en el mismo paso, estos autores emplean la cromatografía de exclusión molecular como último paso de purificación de Nhasa, lo que probablemente explicaría estos valores.

Tabla 2. Purificación parcial de una Nhasa de *Lecanicillium lecanii*, a partir de la fracción precipitada al 40% de saturación con sulfato de amonio.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Recuperación (%)
Extracto crudo	1300	23.48	73.02	3.11	1	100
Precipitación 40% de saturación	40	8.87	37.18	4.19	1.35	50.91
Exclusión molecular (fracciones 4-19)	80	0.37	2.92	7.92	2.55	4

En el caso de la fracción precipitada al 80% de saturación, la tabla 3 muestra los resultados obtenidos durante la purificación de Nhasa, con esta fracción se obtienen factores de purificación muy bajos, ya que la actividad específica disminuye en cada paso de purificación, recuperándose solo 2.57% del total de la enzima después de la cromatografía de exclusión molecular.

Tabla 3. Purificación parcial de una Nhasa de *Lecanicillium lecanii*, a partir de la fracción precipitada al 80% de saturación con sulfato de amonio.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Recuperación (%)
Extracto crudo	1300	23.48	73.02	3.11	1	100
Precipitación 40% de saturación	40	22.1	44.35	2	0.65	60.74
Exclusión molecular (fracciones 3-19)	85	4.24	1.88	0.44	0.14	2.57

Purificación de Nhasa: segundo protocolo de purificación.

Precipitación con sulfato amonio.

En la primera ronda de purificación solo se probaron dos porcentajes de purificación: al 40 y 80% de saturación, estas dos fracciones se decidieron tratar independientemente, sin embargo, con el propósito de manejar una sola fracción y emplear el menor sulfato de amonio posible, se decidió probar un porcentaje de saturación intermedio, el cual fue al 60% de saturación. En la figura 12 se muestra la actividad Nhasa específica con respecto al porcentaje de saturación con sulfato de amonio, en la cual se observa que la fracción que precipitó al 40% se obtuvo una actividad Nhasa de 88.2 ± 10.78 U/mg de proteína, para la fracción precipitada al 60% se logró un actividad de 16.58 ± 2.26 U/mg y de 1.69 ± 0.3 U/mg para fracción precipitada al 80%. Al 40%

de saturación se obtiene la mayor actividad enzimática, siendo el 80% de saturación el porcentaje en el cual se obtuvo la menor actividad específica.

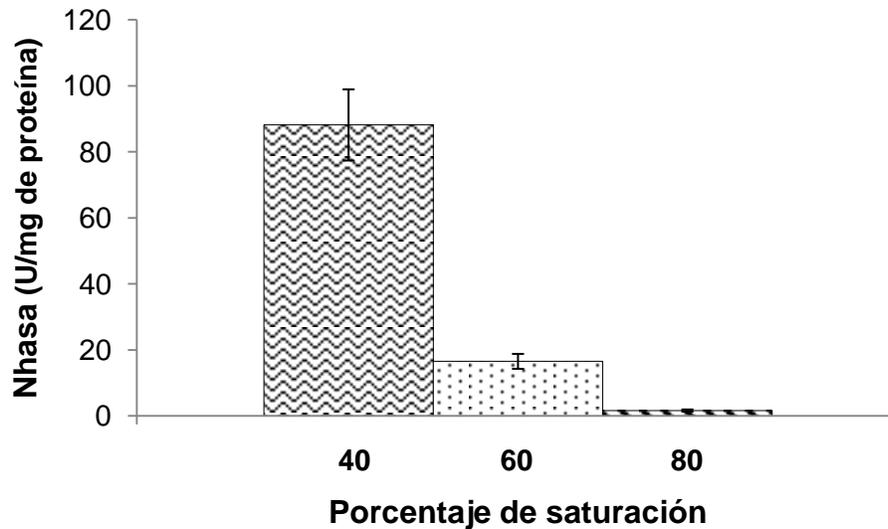


Figura 12. Determinación de la actividad Nhasa específica de las fracciones precipitadas a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.

Por otra parte en la figura 13 se muestra la actividad total acumulada a los distintos porcentajes de saturación, donde se aprecia que la fracción precipitada del 40-60% de saturación muestra la mayor actividad acumulada, no existiendo diferencia significativa con respecto a la fracción que precipito del 60-80%, por lo cual se decidió llevar al 60% de saturación los siguientes extractos enzimáticos, estos resultados son similares a lo reportado por Taylor y col. (2002), éstos autores observaron que la fracción precipitada del 40-60% de saturación con sulfato de amonio presentó la mayor actividad Nhasa, por su parte, Ulhoa y Peberdy, (1991), desde un inicio llevaron al 75% de saturación con sulfato de amonio durante la purificación de una Nhasa de *Trichoderma harzianum*, estos autores reportan una recuperación del 100% del total de actividad enzimática; por otra parte Othakara y col. (1981) recuperan el 95% de la actividad Nhasa del hongo *Pycnoporus cinnabarinus*, empleando una saturación del 75%. Autores

como Yamamoto y col. (1985) llevan al 80% de saturación con sulfato de amonio 12 litros de extracto crudo producido por el hongo *Penicillium oxalicum*, logrando una recuperación del 87% de la actividad Nhasa.

Hay que decir que en el presente trabajo se partió de un volumen de 1.125 L, lo que representa solo el 9.37% del volumen inicial reportado por autores como Yamamoto y col. (1985), el 4% comparado con Taylor y col. (2002), el 11% en comparación con Ramot y col. (2004) y 9.37 % con lo reportado por van Tilburg y Thomas (1994), que purifican Nhasas a partir de cultivos de hongos.

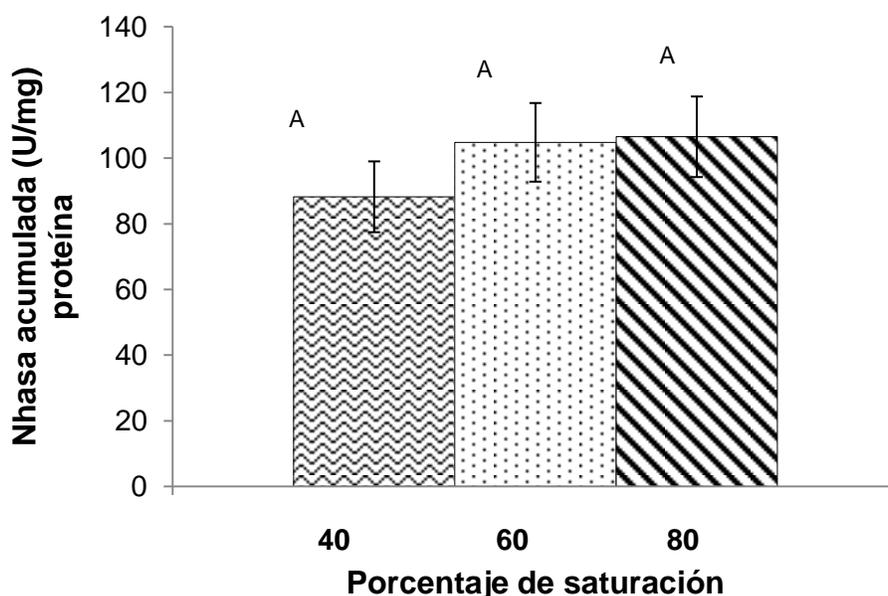


Figura 13. Determinación de la actividad Nhasa acumulada de las fracciones precipitadas a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio, grupos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

La figura 14 muestra la concentración de proteína que se obtuvo a lo largo de la precipitación con sulfato de amonio, en ésta se puede observar que la mayor concentración detectada estuvo presente en la fracción que precipitó al 40% (0.7 ± 0.06 mg), sin embargo al 80% de saturación aún se cuantificó proteína, ésta última fracción presentó poca actividad Nhasa, esto se puede corroborar con la

actividad específica (figura 11), las proteínas que precipitaron al 80% de saturación difieren en sus características de solubilidad respecto de la fracción precipitada al 40% de saturación; tal y como lo sugiere García y Navarrete, (1999), quienes reportan que la precipitación salina se basa en inducir un cambio en la solución donde se encuentran disueltas las proteínas con el fin de provocar que la proteína de interés (o contaminantes) precipiten.

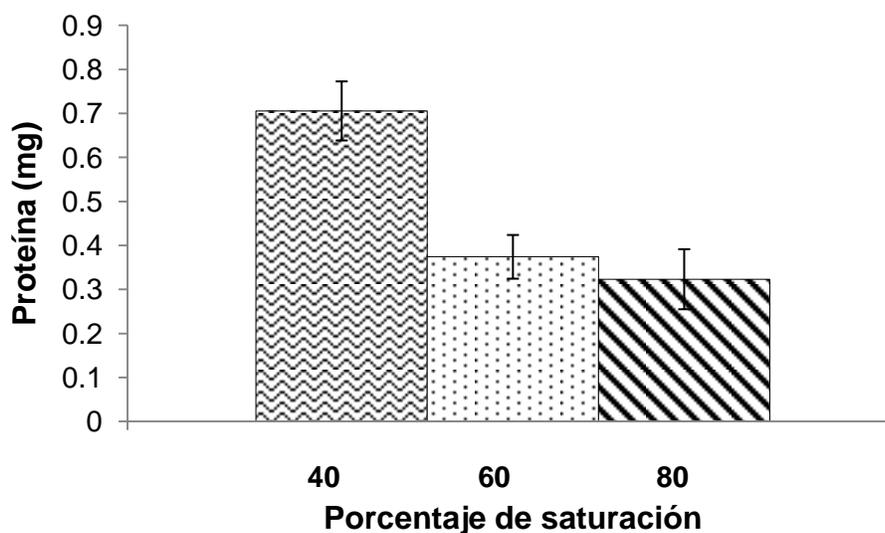


Figura 14. Concentración de proteína en las fracciones precipitada a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio.

Cromatografía de exclusión molecular: uso de Tritón x100 y acetonitrilo.

En una segunda ronda de purificación se recurrió al uso del detergente Tritón x-100 y de acetonitrilo, con el fin de coadyuvar en la solubilización de mayor cantidad de proteína y mejorar la resolución de las técnicas de purificación, dado que durante la precipitación con sulfato de amonio, muchas proteínas crean interacciones entre ellas, modificando algunas de sus propiedades en estado nativo, (*i.e.* masa molecular relativa); a medida que la concentración de una sal aumenta, el agua que rodea a la proteína es secuestrada, entonces las proteínas exponen sus partes hidrofóbicas dando como consecuencia la interacción proteína-proteína, es cuando se observa el fenómeno de agregación

(Prado, 1999). La figura 15 A muestra las bandas de proteínas presentes en el extracto crudo y después de la precipitación, se puede apreciar la concentración de dos bandas entre los 50 y 75 KDa. El zimograma muestra actividad Nhasa de cada fracción (figura 17 B).

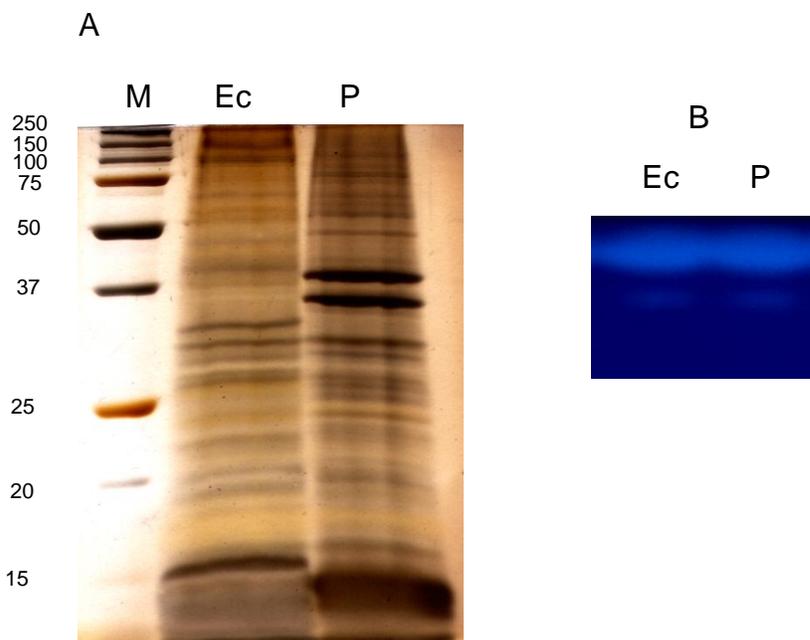


Figura 15. A) Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes del extracto crudo enzimático y después de la precipitación con 60% de sulfato de amonio, B) Zimograma. M: marcador de masa molecular, Ec: extracto crudo, P: precipitación con sulfato de amonio.

Después de la precipitación con sulfato de amonio, la fracción fue ultrafiltrada con una membrana de 10 KDa (Millipore, Pellicon), se le adiciono 4% (v/v) de Tritón X-100 y 10% de acetonitrilo, fue entonces cuando la fracción fue inyectada en la columna de exclusión molecular.

En la figura 16 se muestra la actividad Nhasa (A) y la concentración de proteína (B) después de la cromatografía de exclusión molecular, como se puede apreciar, la mayor actividad Nhasa se encuentra entre la fracciones 7-13,

mientras que la más alta concentración de proteína se encuentra en las fracciones 15-18, observándose dos picos de proteína entre estas fracciones, hay que aclarar que no fue posible determinar la concentración de proteína a 280 nm por la presencia del Tritón X-100, el cual causó interferencia en la lectura de absorbancia; la fracción 11 fue la que mayor actividad Nhasa volumétrica presentó 0.41U/mL, por su parte, en la fracción 18 se encontró la concentración más alta de proteína pero una baja actividad Nhasa (0.17U/mL.).

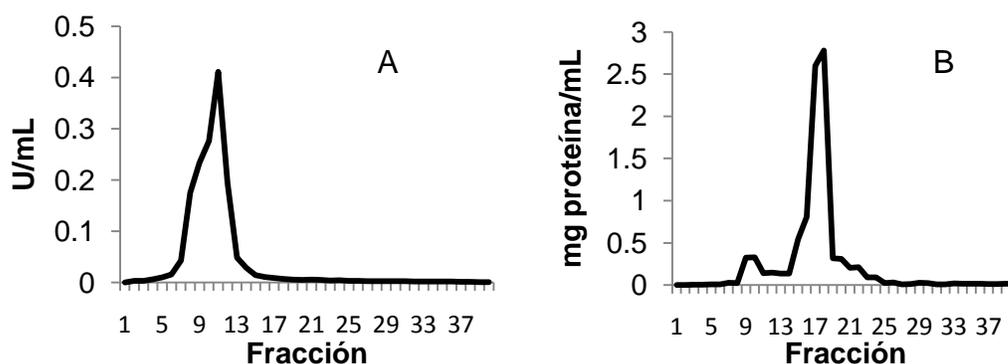


Figura 16. Elución de proteínas de la fracción precipitada al 60% de saturación con sulfato de amonio (adicionada con 1% Triton X-100, 10% acetonitrilo) en una columna de exclusión molecular. A: Actividad Nhasa volumétrica, B: Concentración de proteína.

La figura 17 muestra la actividad específica de las fracciones en el paso de exclusión molecular, en ésta se observa que la mayor actividad se encuentra en las fracciones 2-14; dado que la actividad Nhasa está presente en más de una fracción, es probable que existan más de una enzima con actividad Nhasa; cabe señalar que en otros hongos filamentosos es común encontrar sistemas enzimáticos con actividad Nhasa; Taylor y col. (2002), mediante una técnica de zimografía encontraron dos proteínas con actividad Nhasa (NAG 1 y NAG 2), logrando aislar solo una Nhasa de 68 KDa; por su parte, Ramot y col. (2003) logran purificar dos Nhasas (designadas como EXC1Y y EXC2Y) del hongo *Trichoderma asperellum*, por su parte *Trichoderma harzianum*, produce 7 quitinasas: dos de estas son Nhasas y una quitobiosidasa (Dahiya y col. 2006).

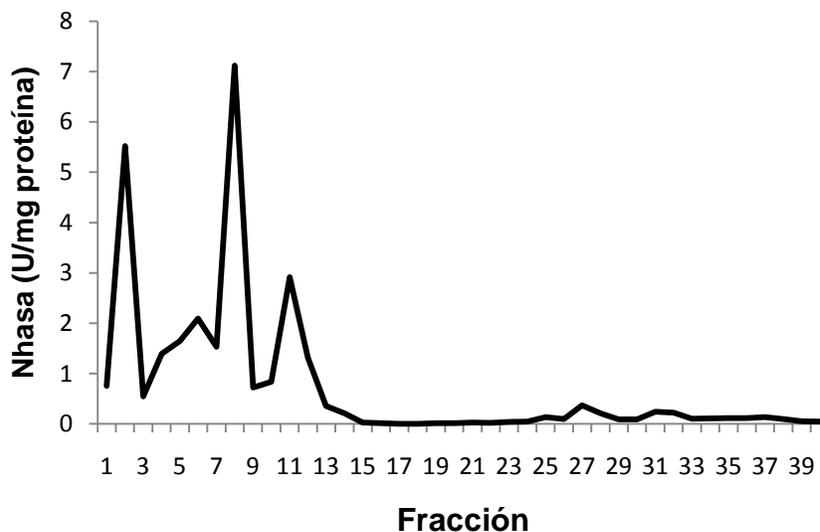


Figura 17. Actividad específica de las fracciones obtenidas en una columna de exclusión molecular (fracción precipitada al 60% de saturación con sulfato de amonio adicionada con 1% Triton X-100, 10% acetonitrilo).

Para observar el patrón de proteínas presentes en las fracciones se procedió a correr una electroforesis desnaturalizante, la figura 18 muestra las bandas de proteínas de las fracciones después del paso de exclusión molecular, observándose proteínas muy concentradas de bajo masa molecular, puesto que se había obtenido una buena recuperación de la enzima se decidió inyectarlas por separado a la columna de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose).

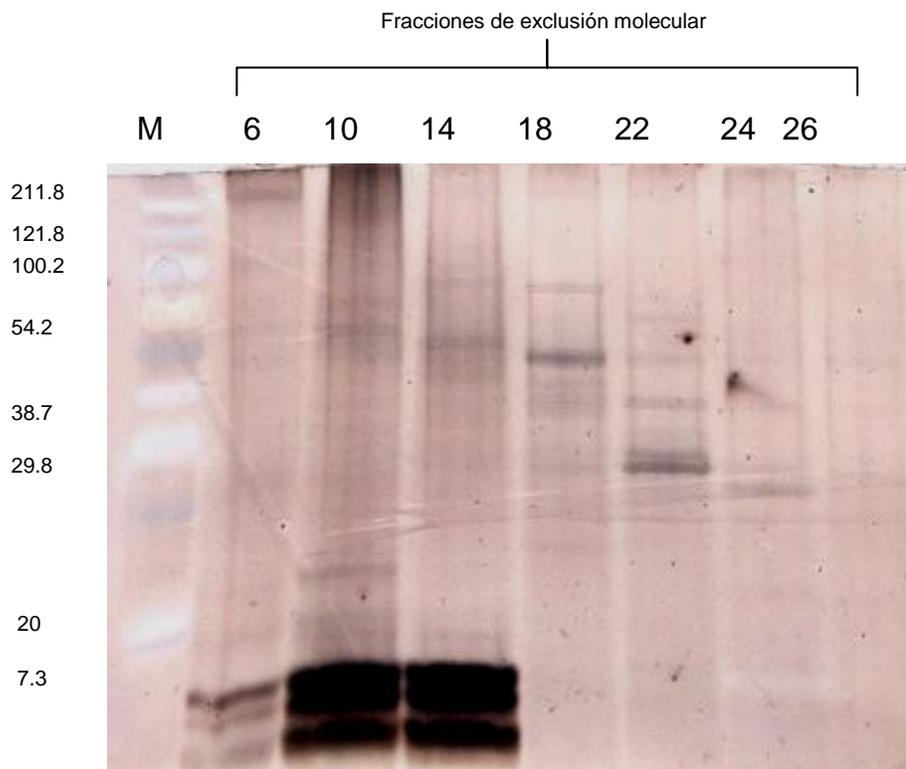


Figura 18. Electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes de las fracciones con actividad Nhasa después de la cromatografía de exclusión molecular, las proteínas fueron visualizadas con tinción de plata, M: marcador de masa molecular).

Cromatografía de intercambio iónico.

En la figura 19 se observa la actividad Nhasa volumétrica de la fracción 10 proveniente de la cromatografía de exclusión molecular después de ser inyectada en una columna de intercambio aniónico, la columna elegida fue una DEAE Sepharose fast-flow, la cual a diferencia de la Macro-Prep High Q, es un intercambiador débil, en esta figura se observa que la mayor actividad Nhasa se encuentra en las fracciones 20-33, siendo la fracción 30 fue la que presentó la mayor actividad Nhasa con 5.47mU/mL. Como se puede apreciar en la figura 20, la actividad Nhasa está presente en más de una fracción, por lo que es probable que aun en este paso eluya más de una enzima con actividad Nhasa debido a que presentan puntos isoeléctricos similares.

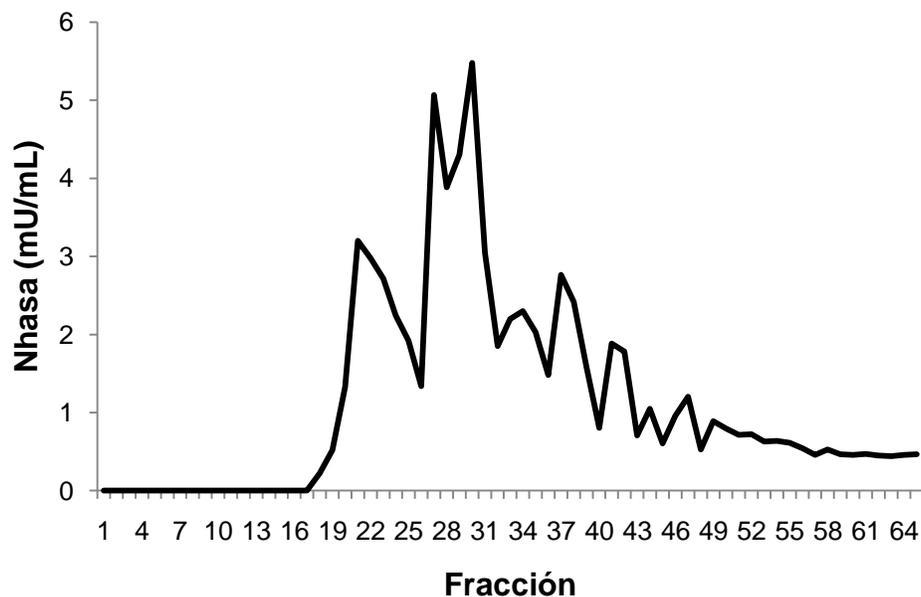


Figura 19. Actividad Nhasa volumétrica de la fracción 10 después de cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE-Sepharose.

Al realizar la electroforesis bajo condiciones desnaturizantes, en la figura 20 se observa que en las fracciones 20-27 se observan dos bandas de proteína entre los 50-75 KDa y una entre los 25-37 KDa, sin embargo en la fracciones 31-32 es más clara una sola banda entre los 50- 75 KDa. Se ha reportado que el masa molecular de la Nhasas de origen fúngico se encuentra entre los valores de 11-150 KDa, presentándose en su mayoría en forma de dímeros de proteína, por mencionar algunos ejemplos se ha encontrado dos Nhasas del hongo *Aspergillus oryzae*, una con una masa molecular de 146 KDa y otra de 117 KDa, cada una con dos subunidades, así mismo una Nhasa de *Mucor fragilis* presenta un masa molecular de 125 KDa en forma de dímero, *Pycnoporus cinnabarinus* también produce una Nhasa en forma de dímero con un masa molecular de 120 KDa; estos valores son muy similares a lo obtenido ya que la banda que se observa presenta un masa molecular en rango de entre 50 y 75 KDa en condiciones desnaturizantes, que bajo condiciones nativas (figura 16 A), estas proteínas presentan un masa molecular mayor.

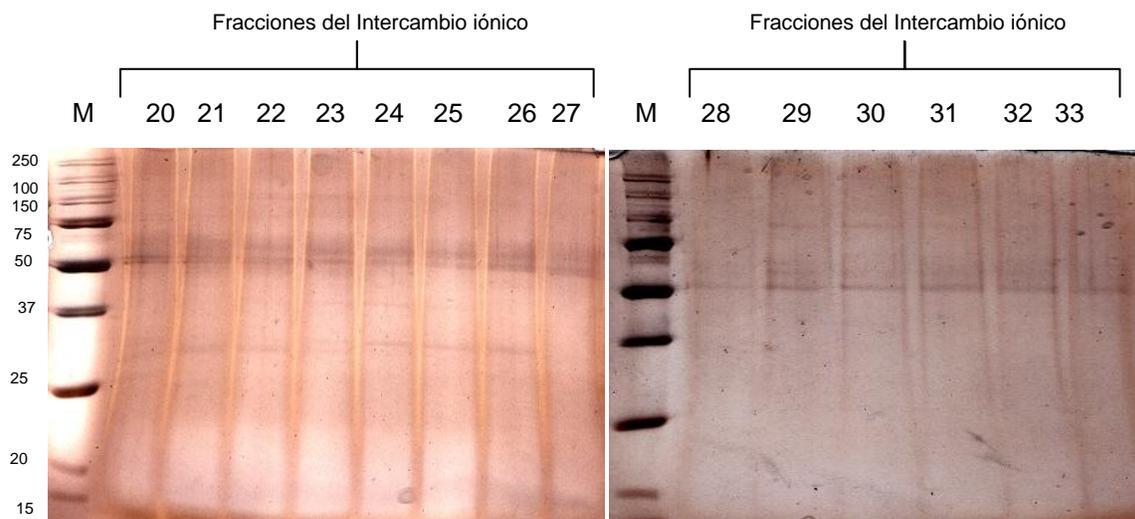


Figura 20. Electroforesis desnaturizante de la fracción 10 después de cromatografía de intercambio iónico. (M: marcador de masa molecular).

La fracción 11 después de la cromatografía de exclusión molecular también fue ultrafiltrada para posteriormente ser inyectada en la columna de intercambio iónico, la figura 21 muestra la actividad Nhasa de las distintas fracciones de este paso de purificación, se puede observar que la mayor actividad Nhasa se encuentra en las fracciones 23-36, estos resultados son similares a la fracción 10 obtenida en la exclusión molecular.

En la figura 22 se pueden observar las bandas de proteínas de las fracciones con actividad Nhasa después del paso de intercambio iónico, en esta se puede apreciar una cierta similitud con la figura 20, se observa un sola banda en las fracciones 34-36, con un masa molecular de entre 50-75 KDa, sin embargo en las fracciones 23-29 se observa una mayor contaminación ya que hay presentes más de una banda de proteínas.

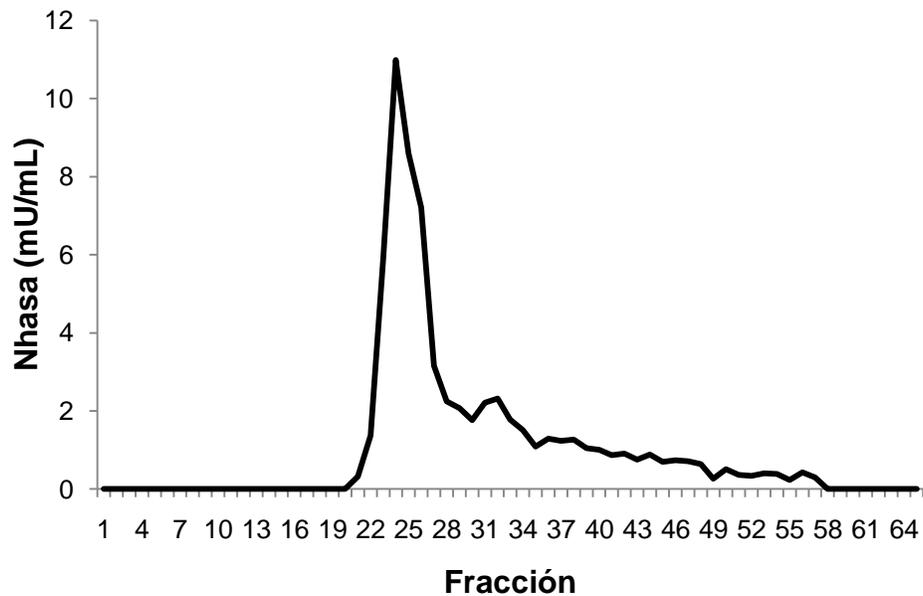


Figura 21. Actividad Nhasa volumétrica de la fracción 11 después de cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE-Sepharose.

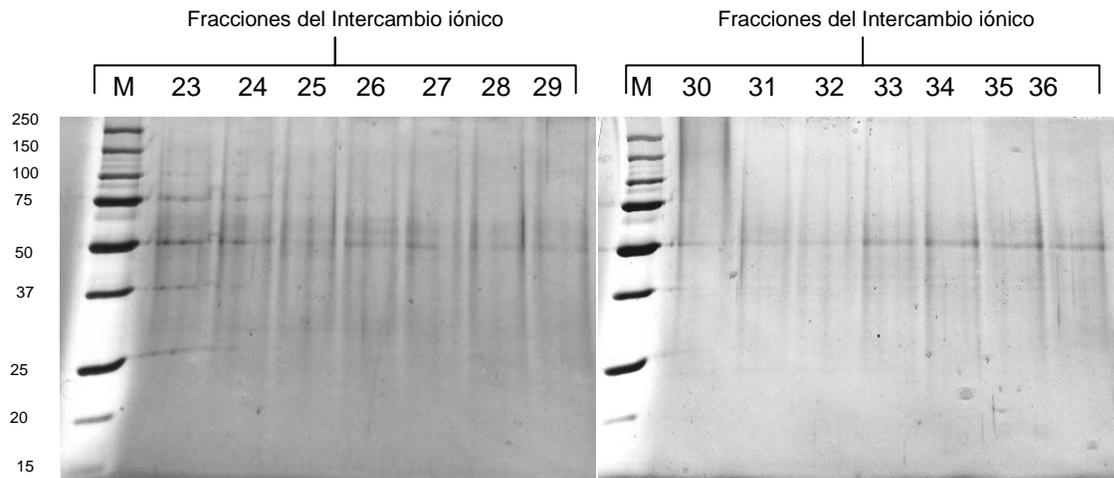


Figura 22. Electroforesis desnaturante de la fracción 11 después de cromatografía de intercambio iónico. (M: marcador de masa molecular).

La tabla 4 resume los pasos de la purificación de una Nhasa de *Lecanicillium lecanii*, en dicha tabla se muestra el rendimiento obtenido después del paso de precipitación con sulfato de amonio, obteniéndose una recuperación de más del 98% del total de la actividad Nhasa, con un factor de purificación de 240.10. Autores como Taylor y col. (2002) recuperan el 83.71% del total de actividad enzimática con un factor de purificación de 1.25 en el paso de precipitación con sulfato de amonio durante la purificación de una Nhasa del hongo *Stachybotrys elegans*, lo que es un valor bajo respecto a los resultados obtenidos en este trabajo; por su parte Souza y col. (2008) logran un factor de purificación de 14 durante la precipitación con sulfato de amonio para la purificación de una Nhasa de *Palythoa caribaeorum*; en otro estudio Sanon y col. (2001) utilizan la precipitación con sulfato de amonio como tercer paso de purificación, logrando así un factor de purificación de 2.7, con un rendimiento del 37.7%; en otro reporte Sakai y col. (1994) obtienen un rendimiento del 86.6% en la precipitación con sulfato de amonio con un factor de purificación de 3.74 durante la purificación de una Nhasa de *Bacillus stearothermophilus*.

En el paso de exclusión molecular se logró una recuperación del 3.71% para la fracción 10 y un 5.51% para la fracción 11, Ulhoa y Peberdy, (1991) logran una recuperación 20 y 18% del total de la actividad Nhasa del hongo *Trichoderma harzianum* al emplear dos pasos de exclusión molecular con las columnas Sephadex G-100 y Sephacryl S-300, obteniendo un factor de purificación del 4.7 y 36.5 respectivamente, lo que representa valores bajos en comparación a los factores obtenidos en el presente trabajo (72.12 y 162.16 para las fracciones 10 y 11 de exclusión molecular respectivamente). En un resultado similar Taylor y col. (2002) obtienen un rendimiento de 4.23% de una Nhasa del hongo *Stachybotrys elegans* después del paso de exclusión molecular, con un factor de purificación de 42.63.

Tabla 4. Purificación parcial de una Nhasa de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF.

Paso de purificación	Volumen total	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1125	3040.5128	37.2935	0.01226	1	100
Precipitación con sulfato de amonio (60%)	40	12.4143	36.5607	2.9450	240.1061	98.03492
Fracción 10 (exclusión molecular)	5	1.5646	1.3837	0.8843	72.1288	3.71054
Fracción 11 (exclusión molecular)	5	1.0338	2.0553	1.9881	162.1616	5.5111

Caracterización de Nhasa.

Para determinar el efecto de la temperatura y pH sobre la actividad Nhasa se repitió el segundo protocolo de purificación dado que con este se obtuvieron los mejores resultados, la figura 23 muestra las bandas de proteína que presentaron actividad Nhasa después del paso de intercambio iónico. Con el fin de obtener un mayor volumen de muestra se mezclaron las fracciones 30-32, obteniendo una actividad específica de 18.3 ± 1.38 U/mg de proteína, esta nueva fracción fue empleada para la caracterización de la Nhasa.

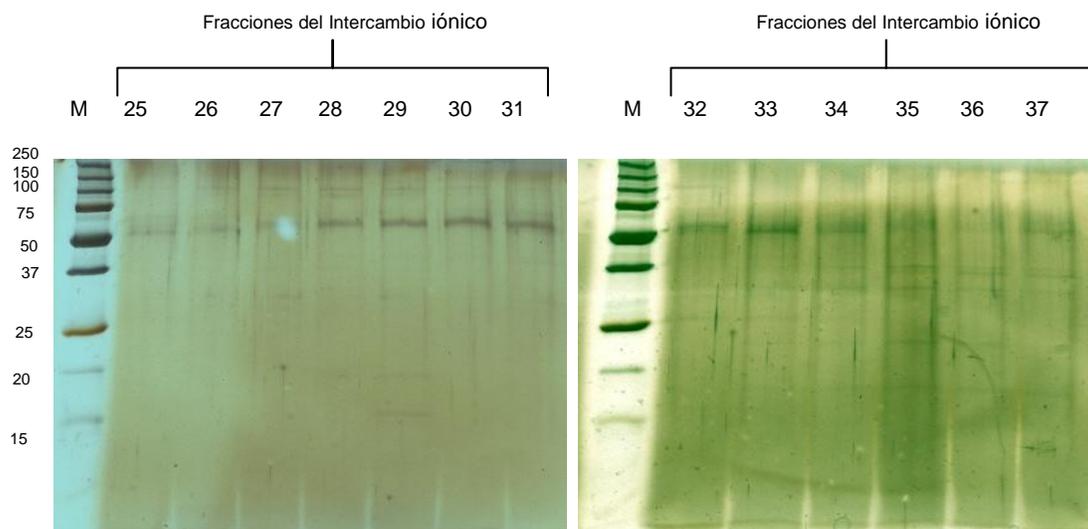


Figura 23. Electroforesis desnaturalizante de las fracciones con actividad Nhasa después de cromatografía de intercambio iónico.

Temperatura óptima.

Al evaluar la actividad Nhasa en el intervalo de temperatura de 5-80°C, se encontró la mayor actividad a 40°C (figura 24). Esta temperatura es similar a la óptima de una Nhasa del hongo *Paecilomyces persicinus* (35-37°C), así mismo Taylor y col. (2002) encontraron una temperatura óptima de 40°C para una Nhasa de *Stachybotrys elegans*. La temperatura óptima para la Nhasa de *Lecanicillium lecanii* es menor a la de otros hongos, como por ejemplo la de *Aspergillus niger* (65°C), *Aspergillus tamarii* (60°C), *Talaromyces emersonii* (75°C) y *Trichoderma harzianum* (60°C) (Scigelova y Crout, 1999).

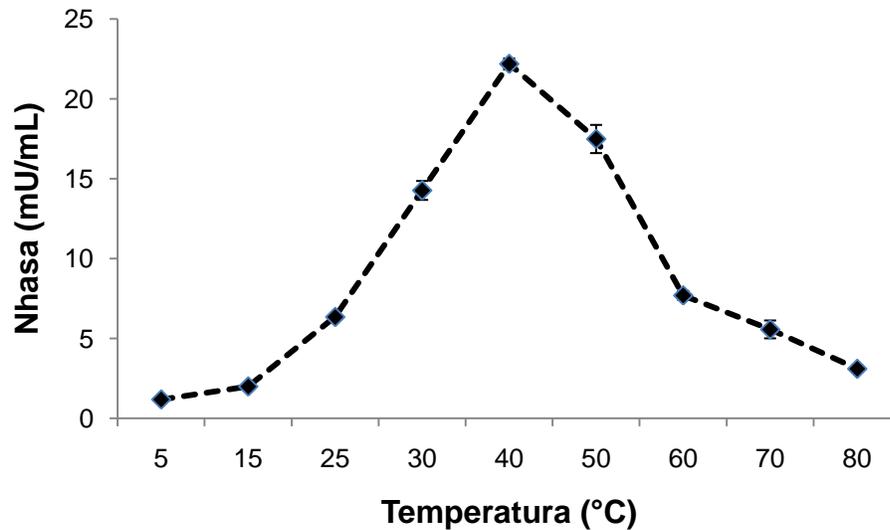


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la actividad Nhasa de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF.

pH óptimo.

El efecto del pH sobre la actividad Nhasa se muestra en la figura 25; en esta figura se observa que la enzima muestra la mayor actividad a pH 6, este resultado es comparable con otras Nhasas de hongos como *Aspergillus tamarisii* que muestra un pH óptimo de 5.5-6.5, de *Candida albicans* (pH 6.5), *Gliocladium virens* (pH 6), *Metarhizium anisopliae* (pH 4.5-5.5) y *Trichoderma harzianum* (pH 5-5.5) (Scigelova y Crout, 1999). Otros resultados similares son lo obtenido por Koga y col. (1991) ya que ellos reportan un pH óptimo de 4-5.5 para una Nhasa del hongo *Trichoderma harzianum*, por su parte Harman y col. (1993) obtienen un intervalo de pH óptimo de 4-7 de una quitobiosidasa de *Trichoderma harzianum*.

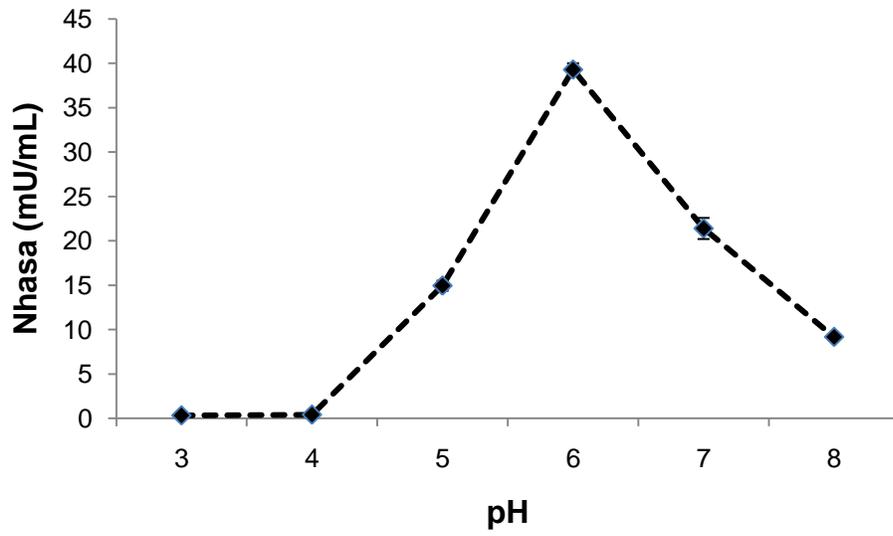


Figura 25. Efecto del pH sobre la actividad Nhasa de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF.

CONCLUSIONES.

La producción de la enzima Nhasa, utilizando al hongo *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano, fue mejor comparada con un cultivo con células libres (esporas).

En el cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano se produce la suficiente cantidad de enzima para su purificación; se logró la purificación parcial de la enzima empleando tres pasos de purificación, precipitación con sulfato de amonio, exclusión molecular e intercambio iónico.

La adición de Tritón X-100 y acetonitrilo coadyuvan con la re-solubilización de la enzima y otras proteínas después de la precipitación con sulfato de amonio.

PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo muestran las ventajas de utilizar células inmovilizadas, sin embargo resultaría viable llevar a cabo una reutilización de la biomasa inmovilizada para la producción de quitinasas u otro tipo de enzimas por parte de *Lecanicillium lecanii*. Otros hongos filamentosos podrían ser inmovilizados en PUF para la producción de quitinasas.

Sería recomendable estudiar la producción de quitinasas por hongos inmovilizados en diferentes tipos de reactores, por ejemplo Air-Lift y Columna de burbujas, así como probar otros soportes

El diseño de nuevas estrategias de purificación, que permitan mayores rendimientos enzimáticos, siempre es útil, además de que se podrían identificar otras quitinasas del hongo *Lecanicillium lecanii*.

La clonación y posterior sobreproducción de quitinasas en otros organismos como bacterias y levaduras, permitiría su posterior aplicación en distintos campos Biotecnológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aleksieva P, Tchorbanov B, Michailova L, Nacheva L. 2003. Improvement of acid phosphatase production by immobilization of *Humicola lutea* mycelium in polyurethane sponge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 247-253.
2. Angelo I. C, Fernandes É. K. K, Bahiense T.C, Perinotto W. M, S, Moraes P. R. A, Terra A. L. M, Bittencourt V. R. E. P. 2010. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus Microplus*. *Veterinary Parasitology*. 171: 317-322.
3. Almeida F, Cerqueira F, Silva R, Ulhoa C, Lima A. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 1189-1193.
4. Askary H, Benhamou N, Brodeur J. 1999. Ultrastructural and Cytochemical Characterization of Aphid Invasion by the Hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 1-13.
5. Barranco-Florido J. E. 1996. Caracterización del sistema de inmovilización de *Kluyveromyces marxianus* en alginato de Bario. México: Universidad Autónoma Metropolitana; Tesis de Maestría en Biotecnología.
6. Barranco-Florido J. E, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 910-915.
7. Bing-Lan L., Pao-Min K., Yew-Min T., Kuo-Ching F. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 410-415.
8. Binod P, Sandhaya C, Suma P, Szakács G, Pandey A. 2007. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamina from colloidal chitin. *Bioresource Technology*. 98: 2724-2748.

-
9. Binod P, Pusztahelyi T, Nagyc V, Sandhya C, Szakács G, Pócsi I, Pandey A. 2005. Production and purification of extracellular chitinase from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 880-887.
 10. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*., 72: 248-254.
 11. Carrasco-Navarro U. 2009. Inmovilización de *Lecanicillium lecanii* para la producción de quitinasas en cultivo sumergido: Universidad Autónoma Metropolitana; Tesis de Especialidad en Biotecnología.
 12. Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortés C, Gutiérrez A, Chet I, Herrera-Estrella Alfredo. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 929-935.
 13. Dahiya N, Rupinder T, Singh-Hoondal G. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 773-782.
 14. De Marco J. L, Valadares-Inglis M. C, Felix C. R. 2004. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis perniciosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 70-75.
 15. Duo-Chuan L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161: 345–360.
 16. Dvůráková J, Schmidt D, Huňková Z, Thiem J, Křen V. 2001. Enzymatic rearrangement of chitin hydrolysates with β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 225-232.
 17. Ettrich R, Kopecký V, Hofbauerová K, Baumruk V, Novák P, Pompach P, Man P, Plíhal O, Kutý M, Kuliki N, Sklenář J, Ryšlavá H, Křens V, Bezouška K. 2007. Structure of the dimeric N-glycosylated form of fungal β -N-

-
- acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spectroscopy, and biochemical studies. *BMC Structural Biology*. 7:3.
18. Fenice M, Di Giambattista R, Raetz E, Leuba J-L, Federici F. 1998. Repeated-batch and continuous production of chitinolytic enzymes by *Penicillium janthinellum* immobilized on chemically-modified macroporous cellulose. *Journal of Biotechnology*. 62: 119-131.
 19. Freeman A, Lilly M. D. 1998. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:335–345.
 20. Fialova P, Carmona A. T, Robina I, Etrich R, Sedmera P, Příkladová V, Petrásková-Hušáková L, Křen V. 2005. Glycosyl azide—a novel substrate for enzymatic transglycosylations. *Tetrahedron Letters*. 46: 8715–8718.
 21. Fukui S, Tanaka A, 1982. Immobilized Microbial cells. *Annual Reviews Microbiology*. 36:145-72.
 22. García-Juárez M, Ramírez C, Rivera F, Mier T. 1999. Evaluación en campo de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas para el control de *Trialeurodes vaporariorum* (West.) (Homóptera: Aleyrodidae) en un cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Micología*. 15: 1-9.
 23. Gkargkas K, Mamma D, Nedev G, Topakas E, Christakopoulos P, Kekos, Macris B. J. 2004. Studies on a N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Fusarium oxysporum* F3 grown in solid-state fermentation. 39: 1599–1605.
 24. Gummadi S. N, Sunil Kumar D, Dash S. S, Kumar Sahu S. 2009. “Industrially Important Carbohydrate Degrading Enzymes from Yeasts: Pectinases, Chitinases, and β -1,3-Glucanases”. En: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. T. Satyanarayana, G. Kunze (Eds.). Springer Science + Business Media B.V. pp. 673-688.23.
 25. Gohel V, Maisuria V, Chhatpar H.S. 2007. Utilization of various chitinous sources for production of mycolytic enzymes by *Pantoea dispersa* in bench-top fermenter. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1608-1614.
 26. Harman G. E, Hayes C.K, Lorito M, Broadway R. M, Di Pietro A, Peterbauer C, Tronsmo A. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification

-
- of Chitobiosidase and Endochitinase. *Molecular Plant Pathology*. 83: 313-318.
27. Hölker U, Höfer M, Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175-186.
28. Jeong-Jun K, Kyu-Chin K, Donald W. R. 2005. Impact of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on development of an aphid parasitoid, *Aphidius colemani*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 254-256.
29. Jones C. S, Kosman J. D. 1980. Purification, Properties, Kinetics, and Mechanism of β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*. 255: 11861-11869.
30. Junter G. A, Jouene T. 2004. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome. . . or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*. 22: 633-658.
31. Koga K, Iwamoto Y, Sakamoto H, Hatano K, Sano M, Kato I. 1991. Purification and Characterization of Nhasa from *Trichoderma harzianum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55: 2817-2823.
32. Kuo-Ching F, Bing-Lan L, Yew-Min T. 2002. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 217-224.
33. Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
34. Lakshmanan T, Loganathan D. 2005. Enzymatic synthesis of N-glycoprotein linkage region disaccharide mimetics using β -N-acetylhexosaminidases from *Aspergillus oryzae* and *Vigna radiata*. *Tetrahedron: Asymmetry*. 16: 255-260.
35. Levente K. 2003. A review of fungal antagonist of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*. 59: 475-483.

-
36. Liu W, Xie Y, Xue J, Gao Y, Zhang Y, Zhang X, Tan J. 2009. Histopathological changes of *Ceroplastes japonicus* infected by *Lecanicillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 96–105.
37. Maier T, Strater N, Schuette C, Klingenstein R, Sandhoff K, Saenger W. 2003. The X-ray Crystal Structure of Human β -Hexosaminidase B Provides New Insights into Sandhoff Disease. *Journal of Molecular Biology*. 328: 669-681.
38. Marín-Cervantes M, Matsumoto Y, Ramírez-Coutiño L, Rocha-Pino Z, Viniegra G, Shirai K. 2008. Effect of moisture in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochemistry*. 43: 24-32.
39. Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, Shirai K. 2004. Production of N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*. 39: 665-671.
40. Mukhopadhyay R, Chatterjee S, Chatterjee B.P, Banerjee P.C, Guha A.K. 2005. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*. 15: 299-303.
41. Ogawa M, Kitagawa M, Tanaka H, Ueda K, Watsuji T, Beppuc T, Kondo A, Kawachi R, Oku T, Nishio T. 2006. A β -N-acetylhexosaminidase from *Symbiobacterium thermophilum*; gene cloning, overexpression, purification and characterization. *Enzyme and Microbial technology*. 38: 457-464.
42. Ohtakara A, Yoshida M, Murakami M, Izumi T. 1981. Purification and Characterization of β -N-acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45: 239-247.
43. Patil R, Ghormade V, Deshpande M. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 473-483.
44. Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay which is more generally applicable. *Analytical Chemistry*. 83: 346-353.
45. Prag G, Papanikolau Y, Tavlas G, Vorgias C. E, Petratos K, Oppenheim A. B. 2000. Substrate Di-N-acetyl-D-glucosamine: the Catalytic Role of the

-
- Conserved acidic Pair, Aspartate 539 and Glutamate 540. *Journal Molecular Biology*. 300: 611-617.
46. Ramot F, Viterbo A, Friesem D, Oppenheim, A, Chet I, 2004. Regulation of two homodimer hexosaminidases in the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* by glucosamine. *Current Genetics*. 45: 205-213.
47. Rauvolfoá J, Kuzmab M, Wergnerová L, Fialová P, Příkladová V, Pišvejcová A, Macková M, Křen V. 2004. β -N-Acetylhexosaminidase-catalyzed synthesis of non-reducing oligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29: 233-239.
48. Ramírez-Coutiño L, Marín-Cervantes M, Huerta S, Revah S, Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola*. *Process Biochemistry*. 41: 1106-1110.
49. Ramirez-Coutiño L, Espinosa-Marquez J, Peter M. G, Shirai K. 2010. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. *Bioresource Technology*. 101: 9236-9240.
50. Rocha-Pino Z. 2009. Estudio de la producción de quitinasas, proteasas e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivo líquido y sólido utilizando diversas fuentes de carbono: Universidad Autónoma Metropolitana; Tesis de Maestría en Biotecnología.
51. Rocha-Pino Z, Viguera B, Shirai K. 2011. Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. En prensa. DOI 10.1007/s00449-011-0517-z
52. Sanon A, Lawrence F, Bories C, Loiseau P. 2001. Purification of N-acetyl- β -D-hexosaminidase from *Trichomonas vaginalis*. *Experimental Parasitology*. 97: 169-172.
53. Scigelova M, Crout D. 1999. Microbial β -N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 3-14.
54. Scheidgen-Kleyboldt, Kuchta G. K, Kiy T, Tiedtke A. 2003. Production of secreted hydrolytic enzymes by continuous high-cell-density cultivation of *Colpidium campylum*. *European Journal of Protistology*. 39, 455–460

-
55. Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*. 22: 36-42.
56. Shirai K. 2006. Fungal chitinases. En: Guevara-González RG, Torres-Pacheco I (editores). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Kerala: Research Signpost. 289-304.
57. Slámová K, Bojarová P, Petrásková B, Křen V. 2010. β -N-acetylhexosaminidase: What's in a name...?. *Biotechnology Advances*. 28: 682-693.
58. Sobrinho I. S, Mendes L. A, Ribeiro V, Ulhoa C. J. 2005. Purification and properties of N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces cerradoensis*. *Biotechnology Letters*. 27: 1273-1276.
59. Souza D, Grossi-de-Sa M, Silva L, Franco O, Gomes-Junior J, Oliveira G, Rocha T, Malgalhã C, Marra B, Grossi-de-Sa M, Romano E, Martins de Sá C, Kombrink E, Jiménez A, Abreu L. 2008. Identification of a novel β -N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea). *Protein Expression and Purification*. 58: 61-69.
60. Suresh P. V, Sachindra N. M, Bhaskar N. 2011. Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of Food Science and Technology*. 48: 349-356.
61. Suresh P. V, Anil Kumar P. K, Sachindra N. M. 2011. Thermoactive β -N-acetylhexosaminidase production by a soil isolate of *Penicillium monoverticillium* CFR 2 under solid state fermentation: parameter optimization and application for N-acetyl chitooligosaccharides preparation from chitin. 27:1435–1447.
62. Sushil M, Pataki B. 2005. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*.; 40: 1605-1610.
63. Taylor G, Jabaji-hare S, Charest P. M, Wajahatullah K. 2002. Purification and characterization of an extracellular exochitinase, β -N-

-
- acetylhexosaminidase, from the fungal mycoparasite *Stachybotrys elegans*. Canadian Journal of Microbiology. 48: 311-319.
64. Tews I, Perrakis A, Oppenheim A, Dauter Z, Wilson KS, Vorgias CE. 1996. Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. Nature Structure Biology. 3:638–48.
65. Ulhoa C. J, Peberdy J. F. 1991. Purification and Characterization of an Extracellular Chitobiase from *Trichoderma harzianum*. Current Microbiology. 23: 285-289.
66. van Tilburg A.- U. B, Thomas M. D. 1994. Extracellular β -N-acetylhexosaminidase of *Gliocladium virens* RV14. Enzyme and Microbial Technology. 16: 849-854.
67. Vassilev N, Vassileva M, Fenice M, Federici F. 2001. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. Bioresource Technology. 79: 263-271.
68. Wang L, Ridgway D, Tingyue G, Moo-Young M. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. Biotechnology Advances. 23: 115-129.
69. Williamns S, Mark B. L, Vocadlo D. J, James M. N. G, Withers S. G. 2002. Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* Hexosaminidase Plays a Critical Role in Substrate-assisted Catalysis by Orienting the 2-Acetoamide Group and Stabilizing the Transition State. The Journal of Biological Chemistry. 277: 40055-40065.
70. Yamamoto K, Moo-Lee K, Kumagai H, Tochikura T. 1985. Purification and Characterization of β -N-Acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum*. Agricultural and Biological Chemistry. 49: 611-619.
71. Zeng X, Sun Y, Ye H, Liu J, Uzawa H. 2007. Synthesis of p-nitrophenyl sulfated disaccharides with b-D-(6-sulfo)-GlcNAc units using b-N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* in a transglycosylation reaction. Biotechnology Letters. 29:1105–1110.

ANEXO I. CURVA DE *p*-NITROFENOL PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD NHASA.

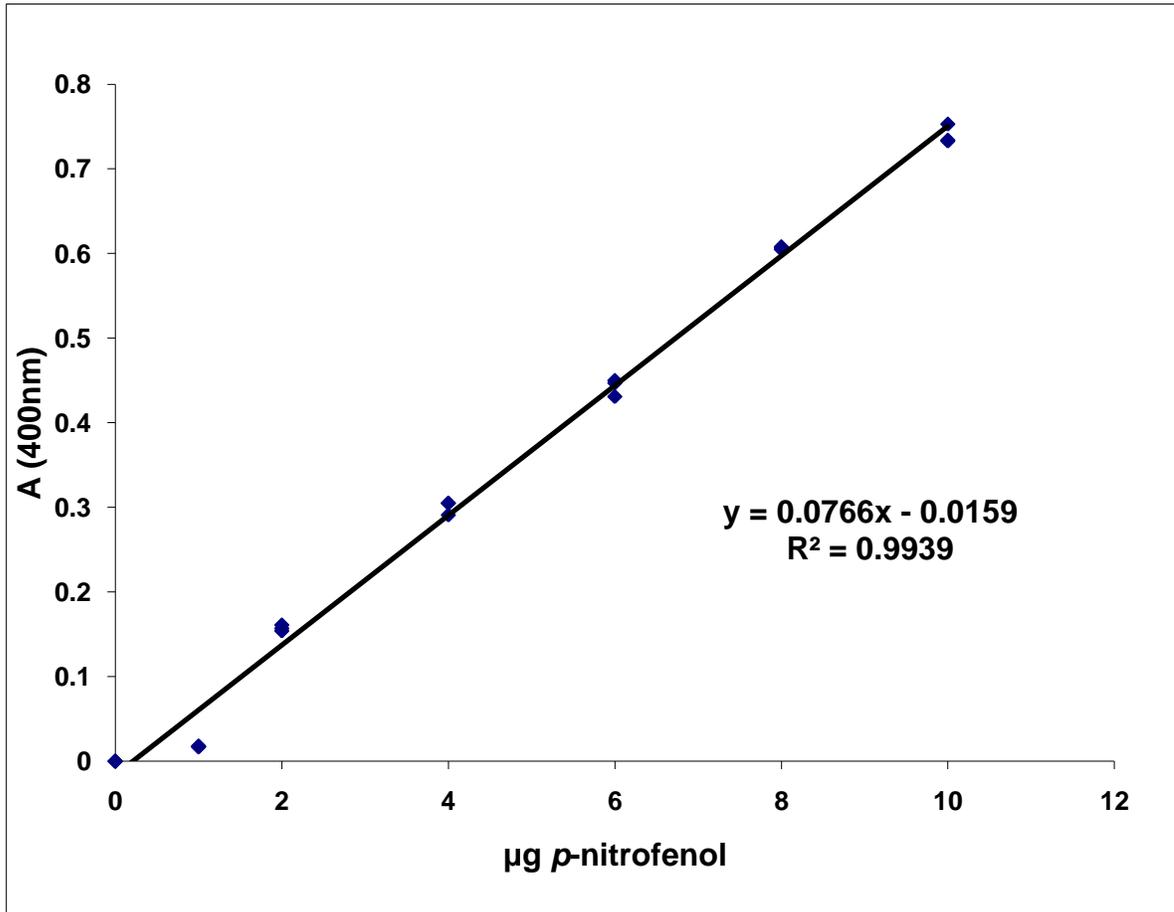


Figura 26. Curva patrón de *p*-nitrofenol empleada para la determinación de la actividad Nhasa (Tronsmo y Harman, 1993).

ANEXO II. MÉTODO DE LOWRY-PETERSON Y CURVA PATRÓN PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

Reactivos

A) *Solución de carbonato de sodio tartrato de potasio:*

Se disuelven lentamente en 250 ml de agua destilada: 25g de carbonato de sodio, 0.25 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0.5 g de tartrato de sodio y potasio.

B) *Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS):*

Se disuelven 25g de SDS en 250 ml de agua destilada.

C) *Solución de hidróxido de sodio:*

D) Se disuelven 8g de NaOH en 250 ml de agua destilada.

Reactivo A

Se mezclan volúmenes las soluciones A, B y C aforándose con agua destilada a 1L. Nota: Se recomienda conservar el reactivo A en refrigeración, calentarlo al momento de usarse a 25-30° C, hasta que observe que el SDS este en solución nuevamente.

Reactivo B

Se prepara diluyendo 1:1 del reactivo fenol Folin-Ciocalteu con agua destilada, se conserva en oscuridad.

Procedimiento de la curva patrón:

1. 0.025 mg de albúmina sérica bovina se disuelven en 25 ml de agua destilada para preparar una solución 1000 μ g/mL.
2. Se diluye con agua destilada para preparar una serie de muestras con diferentes concentraciones de 0 hasta 1000 μ g/mL.
3. 1 mL de reactivo A se adiciona a 1 mL de las muestras preparadas de acuerdo al punto 2. Se mezclan y se incuban a 30°C durante 10 minutos.
4. 0.5 mL de reactivo B se adiciona y se agita, incubándose a 30°C durante 30 minutos.
5. Se determina absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro. (Thermo Fisher Scientific, EUA).

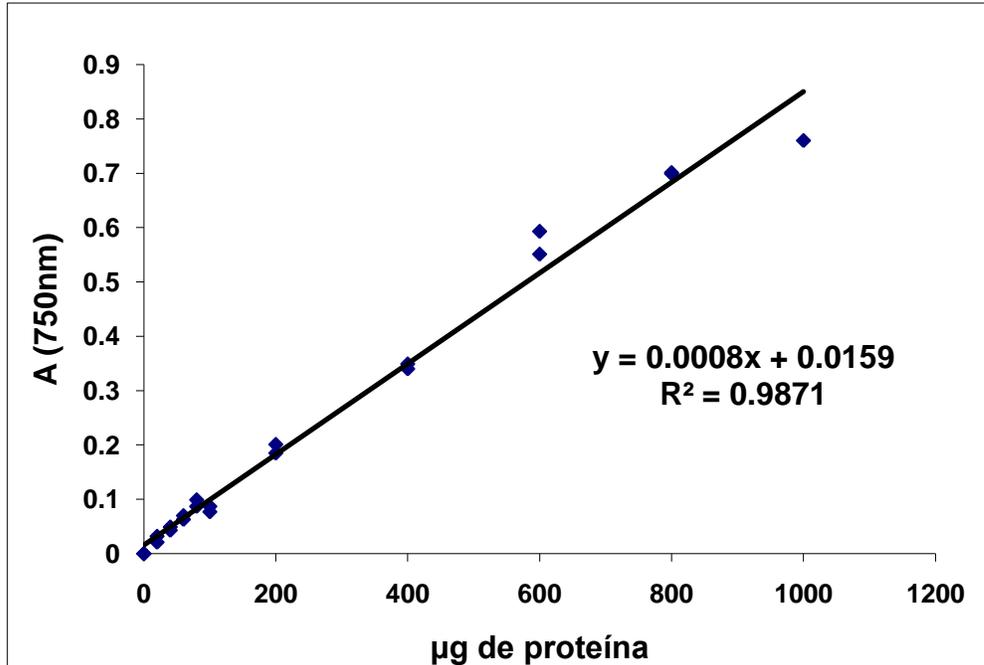


Figura 27. Curva estándar para la determinación de proteína por el método de Lowry-Peterson (Peterson, 1977).

**ANEXO III. CURVA ESTÁNDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE
PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD.**

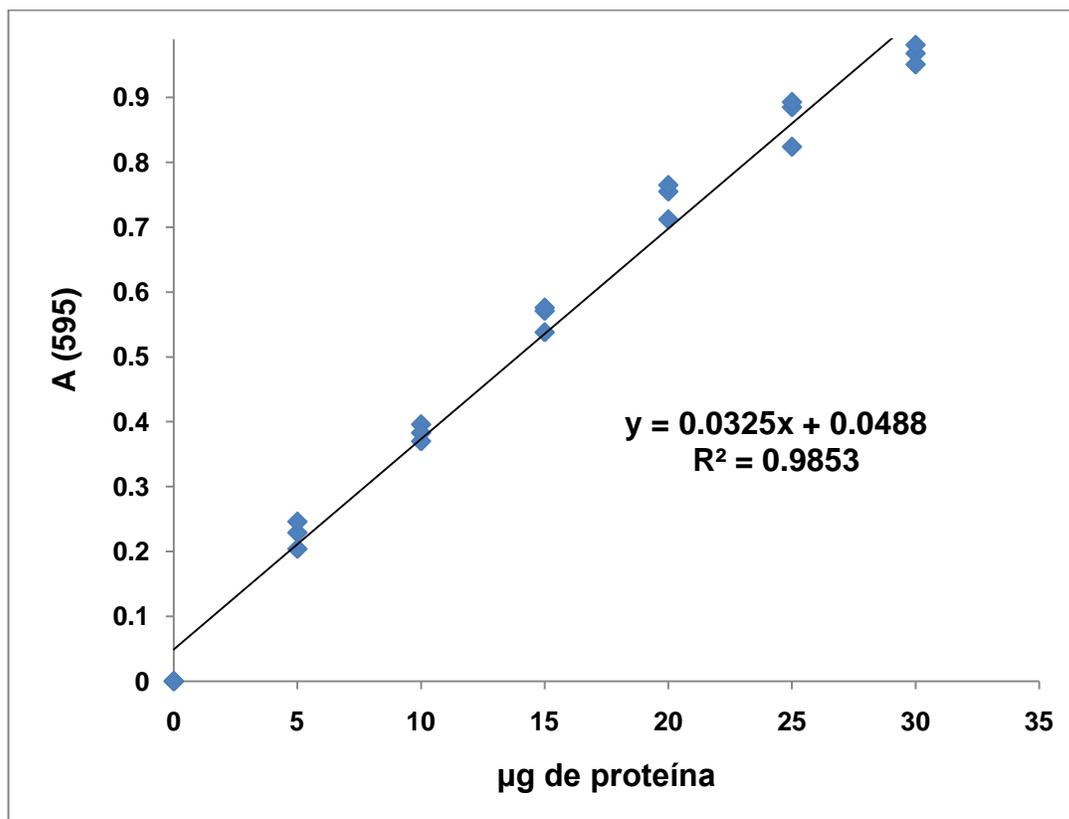


Figura 28. Curva estándar para la determinación de proteína por el método de Bradford (1976).

**ANEXO IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DETERMINACIÓN
DE ACTIVIDAD NHASA ACUMULADA DE LAS FRACCIONES
PRECIPITADAS A DISTINTOS PORCENTAJES DE SATURACIÓN
CON SULFATO DE AMONIO, EMPLEANDO EL PAQUETE
ESTADÍSTICO SPSS.**

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	611.783	2	305.891	2.238	.188
Intra-grupos	820.049	6	136.675		
Total	1431.832	8			

HSD de Tukey

	N	Subconjunto para alfa = .05
Porcentaje	1	1
40.00	3	88.2045
60.00	3	104.7865
80.00	3	106.4790
Sig.		.215

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.