



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

“Estudio de la producción de β -N-acetilglucosaminidasas e hidrofobinas en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii*”

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

M. en B. Jesús Rojas Osnaya

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto
Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros, Planta Piloto 10 Procesamiento de Desperdicios Orgánicos

Asesores de tesis:

Dr. Humberto González Márquez
Departamento de Ciencias de la Salud. Laboratorio de Expresión Génica

Dr. Stephane Trombotto
Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Francia

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001466.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Bioprosesamiento de Subproductos Agroindustriales y Alimentarios (Planta Piloto 10) del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECTEI) Proyecto No. SECTEI/196/2019.

La caracterización de la actividad de transglicosilación de Hex en oligosacáridos de quitina con diferentes grados de polimerización y acetilación, fue en la Universidad Claude Bernard LYON 1- Laboratorio de Ingeniería de materiales poliméricos (IMP) en Lyon, Francia en septiembre-diciembre 2018, bajo la asesoría del Prof. Dr. Laurent David y el Dr. Stéphane Trombotto gracias a la beca mixta otorgada por CONACYT a Jesús Rojas Osnaya para realizar una estancia en dicha institución.

México, Cd. de México, 10 de julio de 2020.

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

“Estudio de la producción de β -N-acetilglucosaminidasas e hidrofobinas en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii*”

Que presenta:

M. en B. Jesús Rojas Osnaya

Comité tutorial:

Directora de tesis: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros Planta Piloto 10.

Asesores de tesis:

Dr. Humberto González Márquez

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

Dr. Stephane Trombotto

Universidad Claude Bernard Lyon 1, Lyon, Francia, Laboratorio de Ingeniería de materiales poliméricos.

H. Jurado:

Presidente: Dr. Humberto González Márquez

Secretario: Dr. Salvador Ramón Tello Solís

Vocal 1: Dra. Zaizy Rocha Pino

Vocal 2: Dr. Hugo Nájera Peña

Handwritten signatures and names of the jury members. The signatures are written in blue ink. The names are: Humberto González Márquez, Salvador Ramón Tello Solís, Zaizy Rocha Pino, and Hugo Nájera Peña. The name 'CUAJERA' is written in large, bold, blue letters at the bottom.

Agradecimientos

A la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por todo su apoyo incondicional, paciencia y dedicación para llevar a cabo esta tesis. Gracias por preocuparse por mí, dentro y fuera del laboratorio; por la motivación, enseñanza y perseverancia, así como, ser un ejemplo de trabajo pero sobre todo muchas gracias por todo el cariño, felicidad y momentos compartidos durante todos estos años.

Al Dr. Humberto González Márquez por su apoyo, paciencia y motivación durante esta etapa profesional, gracias por sus valiosos comentarios durante mi trabajo experimental, por todos sus consejos y amistad brindada.

Al Dr. Salvador Tello Solís por su apoyo, paciencia y dedicación en la revisión de este trabajo. Gracias por los conocimientos brindados, sus consejos, las aportaciones a mi trabajo experimental y por la amistad brindada.

Al Dr. Hugo Najera Peña por su ayuda, paciencia, dedicación y disposición que tuvo para resolver mis dudas. Gracias por las aportaciones, consejos personales y conocimientos brindados a mi doctorado y por la amistad brindada.

A la Dra. Zaizy Rocha Pino por toda la paciencia, cariño, motivación, ayuda y consejos durante mi etapa profesional. Gracias por tus aportaciones a este trabajo y por la amistad de estos años.

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

A Claudia H. Barrera por su ayuda en la asesoría para la redacción y traducción de este trabajo.

Al Dr. Gabriel Viguera por su ayuda, asesoría a este trabajo y por la amistad brindada.

To Dr. Laurent David, Dr. Stéphane Trombotto and to Dr. Catherine Ladavière, for receiving me in your laboratory and for all the support I received before, during and after the training research. Thanks for everything. Merci beaucoup de tout mon coeur.

A mis amigos y compañeros de Laboratorio: Adriana, Raquel, Dora, Rut, Stephany, Jenny, Tania, Manuel, Marco, Arturo, Yahir, Luis y demás por la ayuda, amistad, consejos y apoyo incondicional que me brindaron en su momento cada uno. Muchas gracias a todos por su compañía y felices momentos que compartimos.

To my friends and co-workers from IMP: Renaud, Cyrielle, Noémi, Hub, Maxime, Chloé, Claire, Léa, Anatole, Clément for the friendship and help provided and especially to: Aileen, Orianne, Raphaël, Mo, Estefany for the friendship and for making my days very happy.

Si quieres triunfar en la vida, haz de la perseverancia tu amigo del alma, de la experiencia tu sabio consejero, de la advertencia tu hermano mayor y de la esperanza tu genio guardián.

(Joseph Addison)

Dedicatorias

A mis padres María del Carmen y Jesús por todo su amor, cariño y apoyo incondicional durante todo mi vida y etapa profesional. Gracias por ser un ejemplo de trabajo, perseverancia y a nunca rendirme en ninguna circunstancia. Gracias por enseñarme el valor de las pequeñas cosas y que todo esfuerzo trae consigo una recompensa. Gracias por llenar mi vida de alegría y felicidad, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mi hermana Carmina por todo su amor, cariño, gracias por los consejos y momentos que hemos compartido. Gracias por todo tu apoyo, cuidados y palabras de aliento en mis momentos más difíciles.

A mi cuñado Ralph Belford por todo su cariño, apoyo y motivación para poder terminar mis estudios, por ser un ejemplo de trabajo y constancia. Gracias por preocuparte por mí y familia. Thank you with all my heart

A mis sobrinos Ralph y Matthew por hacerme el tío más feliz y orgulloso, los amo con todo mi corazón. Gracias por ser la felicidad de nuestra familia.

A mi perros Junior y Sam por acompañarme en mis noches de desvelo.

A las familias Rojas, Osnaya y Belford por apoyarme y preocuparse por mí.

A mis abuelos Humberto, Juan, Delia y mi tío Juan Manuel que son mis ángeles que me cuidan desde cielo.

Índice

Abreviaturas	XVI
Resumen	1
Abstract	2
Justificación	3
Objetivos.....	4
Capítulo 1 Actividad de transglicosilación de la β -N-acetilglucosaminidasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> producida por cultivo sumergido	5
1.1. Introducción	6
1.2. Materiales y metodología	10
1.2.1. Microorganismo y medio de cultivo	10
1.2.2. Actividad hidrolítica y contenido de proteína	10
1.2.3. Análisis de electroforesis	10
1.2.4. Purificación enzimática	11
1.2.5. Caracterización de la Hex	12
1.2.5.1. Determinación del pH óptimo y la temperatura de la actividad hidrolítica.	12
1.2.5.2. Determinación del pH óptimo y la temperatura de TGA	12
1.2.6. Caracterización de oligosacáridos de quitina	14
1.2.6.1. Cromatografía en capa fina (TLC)	14
1.2.6.2. Análisis MALDI-TOF de los productos obtenidos por TGA.....	14
1.3. Resultados y discusión	15
1.3.1. Producción y purificación de la Hex	15
1.3.2. Determinación de la temperatura y el pH óptimos para la actividad hidrolítica	20
1.3.3. Efecto del pH sobre la TGA	22

1.3.4. Determinación de la energía de activación de la Hex de <i>L. lecanii</i> con TGA	29
1.3.5. Determinación del DP de los oligosacáridos por espectrometría MALDI-TOF	31
1.4. Conclusión	38
Capítulo 2 Identificación de una β -N-acetilglucosaminidasa de <i>Lecanicillium lecanii</i> y su actividad de transglicosilación sobre oligosacáridos específicos	39
2.1. Introducción	40
2.2. Materiales y métodos	42
2.2.1. Microorganismo, Condiciones del cultivo y Método de purificación de Hex	42
2.2.2. Identificación de Hex	42
2.2.3. Preparación química de oligosacáridos	42
2.2.4. Caracterización de los oligosacáridos	43
2.2.4.1. Espectroscopia ^1H RMN	43
2.2.4.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	43
2.2.5. TGA con diferentes sustratos	44
2.2.5.1. Análisis de los productos obtenidos por TGA mediante MALDI-TOF	44
2.3. Resultados y discusión	45
2.3.1 Identificación de Hex	45
2.3.2. Caracterización de oligosacáridos mediante espectroscopía ^1H RMN	47
2.3.3. Caracterización de oligosacáridos mediante SEC	49
2.3.4. Identificación de productos obtenidos de TGA por MALDI-TOF	51
2.3.4.1. TGA a 48 h de reacción.....	51
2.3.4.2. La TGA a 192 h de reacción.....	54
2.4. Conclusiones	58

Capítulo 3 Determinación de la estructura secundaria de la Hex, mediante espectroscopía de dicroísmo circular	59
3.1. Introducción	60
3.2. Materiales y métodos	63
3.2.1. Producción y purificación de la Hex	63
3.2.2. Espectroscopía de dicroísmo circular	63
3.2.2.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la estructura secundaria de la Hex	63
3.2.2.2. Análisis de datos	63
3.2.3. Desnaturalización térmica	64
3.3. Resultados	65
3.3.1. Efecto del pH sobre la estructura secundaria de la Hex	65
3.3.2. Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de la Hex	70
3.3.3. Desnaturalización térmica	73
3.4. Conclusiones	75
Capítulo 4 Purificación de una Hidrofobina de <i>Lecanicilium lecanii</i> en cultivo sumergido.....	76
4.1. Introducción	77
4.2. Materiales y métodos	79
4.2.1. Extracción de hidrofobinas	79
4.2.2. Identificación de HFB	80
4.2.3. Determinación de la actividad superficial de las hidrofobinas por medición del ángulo de contacto	80
4.3. Resultados	81
4.3.1. Identificación de HFB	84
4.4. Conclusiones	86
5. Conclusiones generales.....	87

6. Perspectivas	88
7. Trabajos presentados y publicaciones	89
7.1 Trabajos presentados	89
7.2 Estancias	90
7.3 Publicaciones	90
8. Bibliografía	100
9. Anexos	109
Anexo 1. Curva patrón de p-nitrofenol para la determinación de actividad Hex	109
Anexo 2. Metodología para determinación de proteína por Lowry - Peterson y curva patrón de seroalbúmina	110
Anexo 3. Determinación de proteína por el método de Bradford.	112
Anexo 4. Determinación del peso molecular de una proteína problema	113
Anexo 5. Espectros MALDI-TOF de 96 y 144 h	114

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1. 1. Estructura de la quitina (Seidl <i>et al.</i> , 2008).....	6
Figura 1. 2. Hidrolisis de la quitina mediante quitinasas (Seidl <i>et al.</i> , 2008).....	7
Figura 1. 3. Algunos oligosacáridos de quitina obtenidos de la hidrolisis enzimática: A) GlcNAc, B) GlcNAc2 y C) GlcNAc3 (Yang <i>et al.</i> , 2014)	7
Figura 1. 4. Mecanismo propuesto para determinar actividad de transglicosilación en quitinasas (Li <i>et al.</i> , 2008).....	12
Figura 1. 5. Producción de la Hex a partir <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido a 25 °C y pH 6.....	15
Figura 1. 6. (A) SDS-PAGE y (B) zimograma. Lineas: M: marcador de peso molecular; PP: Enzima cruda precipitada en 60% de saturación en sulfato de amonio; 17, 18, 19 y 20 fracciones con actividad de Hex, eluídas de Sephacryl S- 100.	17
Figura 1. 7. (A) SDS-PAGE y (B) zimograma. Lineas: 14, 15, 16, 17, 18 y 19 fracciones con actividad Hex eluídas de DEAE Sefarosa; Marcadores proteínicos.	18
Figura 1. 8. SDS-PAGE de la Hex purificada de <i>L. lecanii</i> después de la elución en la cromatografía de intercambio aniónico mediante DEAE sefarosa y marcadores de peso molecular (M_w).	19
Figura 1. 9. Efecto de la temperatura (A) y el pH (B) sobre la actividad específica hidrolítica de la Hex purificada de <i>L. lecanii</i>	21

Figura 1. 10. Tiempos de reacción de TGA de la Hex a partir *L. lecanii* usando como sustratos donadores: A) Glu, B) NaLac, C) Man and D) GlcNAc variando el pH de reacción a 37 °C. Las cantidades de 4-metilumbeliferol liberado se determinaron por espectrometría de fluorescencia y expresadas como FU (unidades arbitrarias). ... 22

Figura 1. 11. Efecto del pH en la velocidad inicial de reacción de la TGA de Hex de *L. lecanii* usando sustratos donadores: A) Man, B) GlcNAc, C) NaLac y D) Glu. ... 23

Figura 1. 12. Tiempos de reacción de la TGA de la Hex de *L. lecanii* usando como sustratos donadores: A) Glu, B) NaLac, C) Man and D) GlcNAc a pH 6, 7 y 8 a 37 °C. Las cantidades de 4-metilumbeliferol se determinaron por espectrometría de fluorescencia y expresadas como FU (unidades arbitrarias). Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz con una $R^2 > 0.95$ 25

Figura 1. 13. Mecanismo de hidrolisis propuesto para las quitinasas (Kohri *et al.*, 2007). 26

Figura 1. 14. Esquema de reacción de la hidrolisis y transglicosilación de las quitinasas (A) y mecanismo de transglicosilación para quitinasas modificadas en su sitio activo (B) (Alsina *et al.*, 2019). 27

Figura 1. 15. Efecto de la temperatura en la TGA de la Hex de *L. lecanii* usando GlcNAc (A) y NaLac (B) como sustratos donadores. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz con una $R^2 > 0.90$. Para la estimación de la E_a para la TGA se usó el modelo de Arrhenius a diferentes temperaturas en presencia GlcNAc (C) y NaLac (D). 29

Figura 1. 16. Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de TGA a pH 7 de la Hex de *L. lecanii* usando NaLac y GlcNAc como sustratos donadores. 30

Figura 1. 17. Espectros de MALDI-TOF de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37°C, después de 1.3 h: A) Glu, pH 6; B) Man, pH 7; C) NaLac pH 8; D) GlcNAc, pH 7. 32

Figura 1. 18. Espectros de MALDI-TOF de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37°C, después de 96 h: E) Glu, pH 7; F) Man, pH 8: G) NaLac pH 7 H) GlcNAc, pH 7. 33

Figura 1. 19. Cromatografía de capa fina de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37 °C después 96 h a pH 6, 7 y 8..... 37

Capítulo 2

Figura 2. 1. Espectro ¹H RMN de los oligosacáridos obtenidos por hidrolisis acida a 70 °C durante 1.5 h. 49

Figura 2. 2. Cromatograma de SEC de los oligosacáridos obtenidos por hidrolisis acida. (-) Detector de dispersión de luz, (-) Detector de índice de refracción..... 50

Figura 2. 3. Espectros MALDI-TOF de los productos obtenidos mediante TGA por la Hex de *L. lecanii* a 37 °C y pH 7 después de 48 h utilizando diferentes sustratos A) GlcNAc B) Man C) GlcNAc₂+ GlcNAc₃, D) GlcN₆ E) Glu y F) Glu+ GlcNAc₂..... 53

Figura 2. 4. Espectros MALDI-TOF de los productos obtenidos mediante TGA por la Hex de *L. lecanii* a 37 °C y pH 7 después de 192 h utilizando diferentes sustratos A) GlcNAc B) Glu, C) Man, D) Gal E) GlcNAC+Man..... 56

Capítulo 3

Figura 3. 1. Clasificación de las proteínas de acuerdo a características espectrales: A) α: mioglobina y citocromo, B) α + β: lizosima y ribonucleasa A, C) α / β: isomerasa, flavodoxina y subtilisina, D) β : prealbúmina y proteína Bence-Jones y E) β : quimiotripsina y tripsina. 62

Figura 3. 2. Espectro de DC de Hex de <i>L. lecanii</i> a pH 7 y temperatura de 25 °C. Los datos experimentales (■) y datos predichos (—) analizados por el método de CDSSRT.....	65
Figura 3. 3. Espectro de dicroísmo circular de la Hex de <i>L. lecanii</i> a diferentes valores de pH y una temperatura de 25 °C.	66
Figura 3. 4. Espectros de dicroísmo circular de la Hex de <i>L. lecanii</i> y la quitinasa de <i>S. griseus</i> a pH 7 y temperatura de 25 °C.	69
Figura 3. 5. Espectros de dicroísmo circular de la Hex de <i>L. lecanii</i> a diferentes temperaturas y pH 7.	71
Figura 3. 6. (A) Curva de desnaturalización térmica (B) Curva de fracción nativa y desnaturalizada de Hex de <i>L. lecanii</i> a 70 °C, pH 7 y velocidad de calentamiento de 5 °C/min.....	74

Capítulo 4

Figura 4. 1 Rendimiento de HFB extraída de la biomasa y del EC.....	81
Figura 4. 2. Electroforetograma de los pasos de purificación M(marcador), DEB (Después de electroburbujeo).	82
Figura 4. 3. Actividad superficial de HFB sobre vidrio y teflón. A) Control-teflón, B) HFB-teflón, C) Control-vidrio y D) HFB-vidrio.....	83

Índice de tablas

Capítulo 1

Tabla 1. 1 Purificación de la Hex a partir de <i>L. lecanii</i> en cultivo sumergido a pH 6 y 25°C*.....	16
--	----

Tabla 1. 2. Grado de polimerización y acetilación de oligosacáridos de quitina obtenidos por la TGA de Hex de *L. lecanii* a 37°C con la estimación de la máxima producción de fluorescencia FU_{max}^a (FU). 24

Tabla 1. 3. Grado de polimerización y DA de los oligosacáridos obtenidos con diferentes sustratos donadores, empleando la TGA de la Hex de *L. lecanii*, variando el pH de la reacción. 35

Capítulo 2

Tabla 2. 1. Relación m/z monoisotópica de la Hex de *L. lecanii* obtenidas del ESI-MS. 46

Tabla 2. 2. Secuencia de aminoácidos de chi1, las letras marcadas en negrita son los residuos de Hex que muestran identidad con la secuencia de chi1. 47

Tabla 2. 3. Grado de polimerización (DP), %DA y relación m/z monoisotópica de los sustratos obtenidos por la TGA de la Hex de *L. lecanii*. 57

Tabla 2. 4. Grado de polimerización (DP), %DA y relación m/z monoisotópica de los productos utilizados para la TGA de la Hex de *L. lecanii*. 58

Capítulo 3

Tabla 3. 1. Determinación en la composición de la estructura secundaria de la Hex de *L. lecanii* a diferentes valores de pH. 68

Tabla 3. 2. Determinación en la composición de la estructura secundaria de la Hex de *L. lecanii* y la quitinasa de *S. griseus* a pH 7 y temperatura de 25 °C. 69

Tabla 3. 3. Determinación en la composición de la estructura secundaria de la Hex de *L. lecanii* a diferentes temperaturas a pH 7. 72

Capítulo 4

Tabla 4. 1 Determinación del ángulo de contacto de HFB.	83
Tabla 4. 2. Relación m/z monoisotópica de la HFB de <i>L. lecanii</i> obtenidas del ESI-MS.....	84
Tabla 4. 3. Secuencia de aminoácidos de ASPFU, las letras marcadas en negrita son los péptidos de HFB que muestran identidad con la secuencia de ASPFU....	85

Abreviaturas

AEC	Cromatografía de intercambio aniónico
DA	Grado de acetilación
DC	Dicroísmo circular
DDC	Después de calentar
DEB	Después de electroburbujeo
DP	Grado de polimerización
E_a	Energía de activación
EC	Extracto crudo enzimático
ESI-MS	Espectrometría de masas de tipo electrospray
FU	Unidades de fluorescencia
GH	Glicosil hidrolasas
GlcN	D-glucosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GlcNAc₂	Dímero de N-acetil-D-glucosamina
GlcNAc₃	Trímero de N-acetil-D-glucosamina
GlcNAcMu	4-metillumbeliferil-N-acetil-D-glucosamina
Glu	Glucosa
Hex	β -N-acetilglucosaminidasa
HFB	Hidrofobina
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo

Man	Manosa
M_n	Peso molecular promedio en número
M_r	Masa molecular relativa
M_w	Peso molecular promedio en masa
NaLac	N-acetil-D-lactosamina
NRMSD	Desviación cuadrática media
PDA	Agar papa dextrosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
TGA	Actividad de transglicosilación
TL	Capa fina
TLC	Cromatografía en capa fina

Resumen

Lecanicillium lecanii es un hongo entomopatógeno utilizado comercialmente como una alternativa de biocontrol en agricultura y horticultura. Dentro del proceso de infección se producen enzimas y proteínas tales como quitinasas, proteasas, lipasas e hidrofobinas. En la clasificación de las quitinasas se encuentran las β -N-acetilglucosaminidasas; que son enzimas capaces de hidrolizar en los extremos no reductores de los residuos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) de los oligosacáridos de quitina, liberando monómeros de GlcNAc. Se ha visto que las Hex además de hidrolizar son capaces de llevar a cabo transglicosilación (TGA), transfiriendo un oligosacárido a un aceptor adecuado para formar un nuevo enlace glucosídico; obteniendo así oligosacáridos con grado específico de polimerización y acetilación. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue purificar las Hex e hidrofobinas de *Lecanicillium lecanii* en cultivo sumergido. En la primera etapa experimental, se purificó la Hex obteniendo una enzima pura de ≈ 50 kDa. Se evaluó su actividad TGA sobre sustratos donadores, produciendo oligosacáridos transglicosilados con un grado de polimerización entre 2 y 6 con varios grados de acetilación. En la segunda etapa experimental se identificaron y secuenciaron los péptidos de Hex, los cuales, presentaron identidad con una quitinasa de *Rhizopus oligosporus*. Adicionalmente, se evaluaron sustratos diferentes a los empleados en la primera etapa, para llevar a cabo TGA, donde Hex fue capaz de transglicosilar sin requerir un sustrato aceptor, produciendo oligosacáridos con grado de polimerización de 3 a 6. En la tercera etapa experimental, mediante espectroscopía de dicroísmo circular se observó que Hex no sufre cambios en su estructura secundaria al llevar a cabo la reacción de hidrólisis y/o la TGA, o incluso evaluando diferentes temperaturas y valores de pH, lo que se atribuyó a cambios locales en los aminoácidos del sitio activo. Finalmente, en la cuarta etapa, se logró purificar una hidrofobina de clase I de ≈ 12 kDa a partir de la biomasa obtenida del cultivo sumergido, esta proteína permitió modificar superficies hidrofóbicas e hidrofílicas.

Abstract

Lecanicillium lecanii is an entomopathogenic fungus used commercially as a biocontrol alternative in agriculture and horticulture. Inside the infection process enzymes and proteins such as chitinases, proteases, lipases and hydrophobins are produced. In the classification of chitinases are β -N-acetylglucosaminidases; which are enzymes capable of hydrolyzing at the non-reducing ends of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) residues of chitin oligosaccharides, releasing GlcNAc monomers. In addition to hydrolyzing Hex has been found to be capable of carrying out transglycosylation (TGA), transferring an oligosaccharide to a suitable acceptor to form a new glycosidic bond; Thus, obtaining oligosaccharides with a specific degree of polymerization and acetylation.

Therefore, the objective of the present work was to purify the Hex and hydrophobins of *Lecanicillium lecanii* in submerged culture. In the first experimental stage, the Hex was purified obtaining a pure enzyme of ≈ 50 kDa. Its TGA activity on donor substrates was evaluated, producing transglycosylated oligosaccharides with a degree of polymerization between 2 and 6 with various degrees of acetylation. In the second experimental stage, the Hex peptides were identified and sequenced, which presented identity with a *Rhizopus oligosporus* chitinase. Additionally, different substrates were evaluated from those used in the first stage, to carry out TGA, where Hex was able to transglycosylate without requiring an acceptor substrate, producing oligosaccharides with a degree of polymerization of 3 to 6. In the third experimental stage, by circular dichroism spectroscopy, it was observed that there are no changes in the secondary structure of Hex, when carrying out the hydrolysis reaction or TGA evaluating different temperatures and pH values, which was attributed to local changes in the amino acids of the active site. Finally, in the fourth stage, it was possible to purify a hydrophobin class I of ≈ 12 kDa from the biomass obtained from the submerged culture, this protein allowed modifying hydrophobic and hydrophilic surfaces.

Justificación

La producción de enzimas β -*N*-acetilglucosaminidasas han sido ampliamente estudiadas en cuanto a condiciones producción y purificación; en dichos reportes se ha encontrado que éstas, además de poseer actividad hidrolítica, exhiben actividad de transglicosilación, lo que les permite producir oligosacáridos con grado de polimerización y acetilación determinados. El estudio de la actividad de transglicosilación aún no ha sido muy estudiada, pero esta actividad ha generado expectativas, ya que no existen muchas enzimas que transfieran un sustrato glicosídico donador a un sustrato glicosídico aceptor final. Por otro lado, en la producción de oligosacáridos de quitina y quitosano se utilizan disolventes deletéreos para el ambiente por lo que el uso de enzimas transglicosilasas representa una alternativa factible.

Las Hex purificadas que han sido reportadas con actividad de transglicosilación son de origen bacteriano, no hay un reporte de Hex de origen fúngico con actividad de transglicosilación. Por otro lado, las hidrofobinas de *L. lecanii*, son proteínas producidas durante el desarrollo del hongo facilitando su adherencia a superficies sólidas, y sustratos hidrofóbicos o insolubles, por lo que tienen una relevante participación durante el desarrollo del hongo en cultivos sumergidos adicionados con quitina. Actualmente, se ha reportado que existe correlación entre la producción de hidrofobinas y las características fisicoquímicas de la quitina empleada, así como ocurre con las quitinasas. Sin embargo, no existen estudios de la producción y purificación de hidrofobinas de *L. lecanii* en cultivo sumergido. La producción y purificación de hidrofobinas es importante interés debido al amplio campo de aplicaciones industriales que podrían tener, desde la recuperación mejorada de petróleo hasta su uso en biomateriales.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar y caracterizar Hex e hidrofobinas de *L. lecanii* producidas en cultivo sumergido.

Objetivos particulares

1. Producir y purificar las Hex en cultivo sumergido de *L. lecanii*.
2. Caracterizar las actividades hidrolíticas y de transglicosilación de las Hex.
3. Caracterizar los productos obtenidos de TGA.
4. Determinar la estructura secundaria de las Hex a diferentes valores de pH y temperatura mediante espectroscopia de dicroísmo circular.
5. Purificar y caracterizar las hidrofobinas.

Capítulo 1

Actividad de transglicosilación de la β -N-acetilglucosaminidasa de *Lecanicillium lecanii*
producida por cultivo sumergido

1.1. Introducción

La quitina es un biopolímero abundante en la naturaleza, está compuesta de *D*-glucosamina (GlcN) y *N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc), unida mediante enlaces glucosídicos β -1,4 (Figura 1.1). Este biopolímero es un componente estructural, principalmente de la pared celular de los hongos y en los exoesqueletos de insectos y crustáceos (Aam *et al.*, 2010).

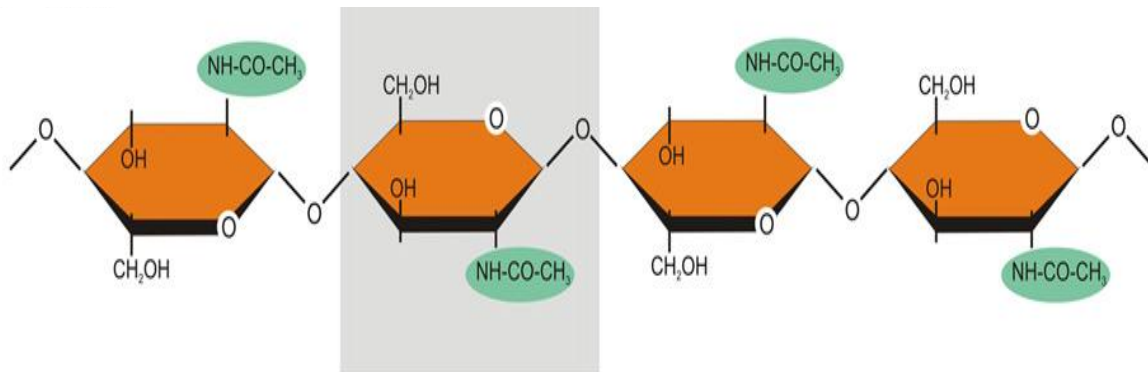


Figura 1. 1. Estructura de la quitina (Seidl *et al.*, 2008)

Las enzimas quitinolíticas hidrolizan la quitina y se clasifican en: endoquitinasas, exoquitinasas y β -*N*-acetilglucosaminidasas (Figura 1.2). Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14) realizan hidrólisis al azar en la cadena de quitina, mientras que, las exoquitinasas (EC 3.2.1.14) realizan cortes en el extremo no reductor de la cadena, liberando así *N*, *N'*-diacetilglucosamina (quitobiosa). Por otra parte, las exo- β -*N*-acetilglucosaminidasas, quitobiosidasas y Hex (EC 3.2.1.52), realizan cortes en los extremos no reductores de los residuos de GlcNAc de los oligosacáridos, liberando GlcNAc, también pueden hidrolizar quitobiosa para producir GlcNAc (Figura 1.3) (Yang *et al.*, 2014).

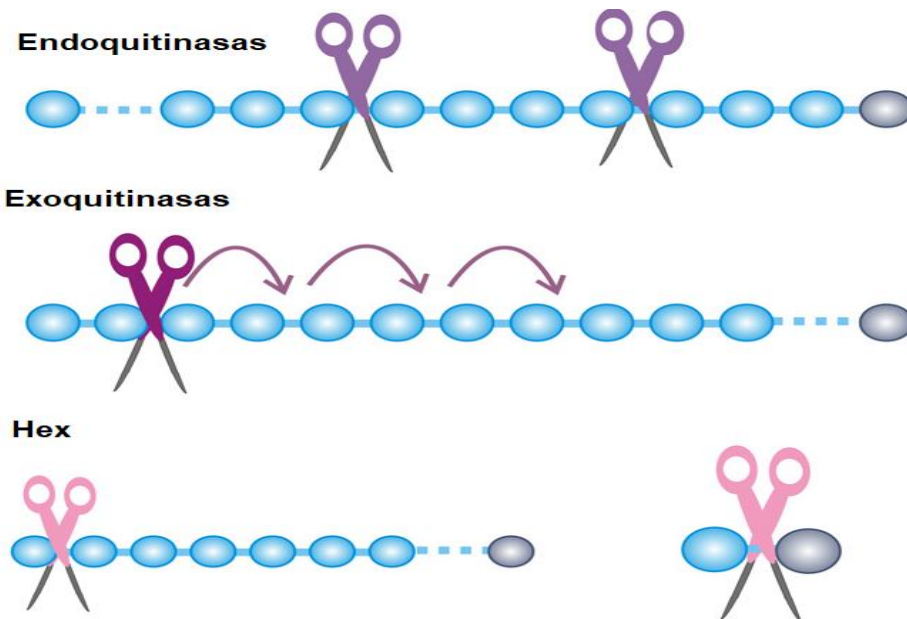


Figura 1. 2. Hidrolisis de la quitina mediante quitinasas (Seidl *et al.*, 2008)

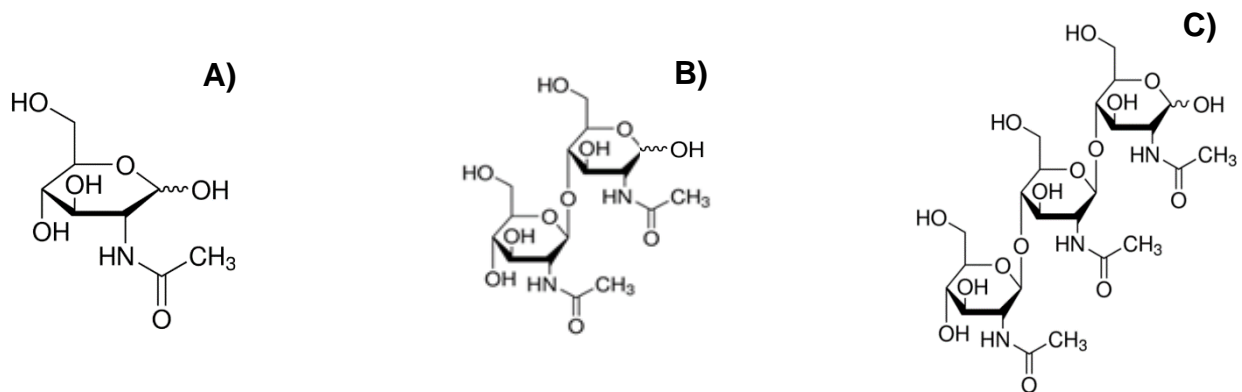


Figura 1. 3. Algunos oligosacáridos de quitina obtenidos de la hidrolisis enzimática: A) GlcNAc, B) GlcNAc₂ y C) GlcNAc₃ (Yang *et al.*, 2014)

Las enzimas quitinolíticas están presentes en muchos organismos, los hongos filamentosos las producen para el crecimiento y la nutrición. Además, juegan un papel importante en el antagonismo de organismos que contienen quitina (Yang *et al.*, 2014 y Fenice, 2016). Se ha reportado que durante el crecimiento de *L. lecanii* en estado sólido y cultivos sumergidos donde se agregó quitina como única fuente de carbono, se producen quitinasas para poder asimilar este sustrato (Matsumoto *et al.*, 2004).

El extracto crudo del cultivo sumergido con quitina de *L. lecanii* contiene quitinasas y Hex (Rocha-Pino *et al.*, 2011), éstas se pueden utilizar para la producción de oligosacáridos a partir de quitinas tratadas con sonicación, explosión por vapor y fluidos comprimidos (Villa-Lerma *et al.*, 2013 y Villa-Lerma *et al.*, 2016). Los oligosacáridos producidos por hidrólisis enzimática presentan ventajas como el no requerir y generar productos químicos nocivos sobre la degradación química y despolimerizaciones físicas, además la reacción hidrolítica ocurre bajo control y especificidad de la enzima en un proceso amigable con el ambiente (Liaqat y Eltem., 2018). En la producción no enzimática de oligosacáridos, se genera una mezcla heterogénea de oligosacáridos de masa molecular variada, esto afecta en la identificación de los oligosacáridos bioactivos. Otros aspectos clave de los oligosacáridos de quitina es su grado de acetilación (DA), polimerización (DP) y los patrones de N-acetilación. Los oligosacáridos de quitina con alto DA muestran actividades biológicas específicas y anti angiogénicas (Wu *et al.*, 2012). Otros trabajos establecen que los oligosacáridos con tres a cinco DP y 100% DA son una señal biológica para activar el mecanismo de protección e inducción para la formación de nódulos en plantas (Robina *et al.*, 2002).

Por otro lado, los hexámeros desacetilados y reacetilados inducen la liberación de interleucina-8, citocina de la familia de las quimiocinas, de naturaleza proinflamatoria (Aam *et al.*, 2010). Los oligosacáridos de quitosano y quitina con DP de 2 a 8 tienen propiedades antitumorales y antiinflamatorias debido a su capacidad para inducir apoptosis e inhibir la actividad de la ciclooxigenasa que

estimula la producción de prostaglandinas (Masuda *et al.*, 2014). Además, los oligosacáridos con menos de diez monómeros son solubles en agua, en comparación con sus precursores de biopolímeros (Liaqat y Eltem., 2018).

A pesar de las ventajas de los métodos enzimáticos para la producción de oligosacáridos, actualmente, la comercialización está liderada por productos obtenidos de síntesis químicas. Utilizar las quitinasas para la transglicosilación (TG) es otra área de oportunidad, al transferir un oligosacárido a un aceptor para formar un nuevo enlace glucosídico. Los oligosacáridos con un DA y DP específico, se pueden sintetizar con características clave para otras aplicaciones biológicas (Li *et al.*, 2008 y Suma y Podile, 2013). A pesar de las ventajas de la síntesis de oligosacáridos a través de la reacción enzimática, como el control de las distribuciones de masa molecular y DA, hay pocos informes de enzimas quitinolíticas de origen fúngico con actividad de transglicosilación (TGA). La TGA fue discutida por Zhang *et al.* como explicación plausible de la naturaleza dual de dos quitinasas del hongo termofílico *Thermomyces lanuginosus* con actividades exo y endoquitinasa basadas en los productos de reacción (Zhang *et al.*, 2015).

1.2. Materiales y metodología

1.2.1. Microorganismo y medio de cultivo

La cepa de *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854 se desarrolló en agar papa dextrosa (PDA) a 28°C. La suspensión de esporas se obtuvo mediante la agitación mecánica usando una disolución de Tween 80 (0.01 % p/v). El cultivo sumergido se realizó en un biorreactor de 3 L (Applikon BV, Holanda) con medio de cultivo Czapeck modificado a pH 6, inoculado con 10⁷ esporas/mL, a 100 rpm, 1 vvm de aeración y 25°C de incubación, durante 144 h. La composición de Czapeck modificado (g/L) es: Quitina coloidal cruda con 10% de proteína residual (10), NaNO₃ (3.73), Na₂HPO₄ (3.0), MgSO₄ (0.5), KCl (0.5), and FeSO₄ (0.096). Se tomaron muestras de 50 mL del medio de cultivo sumergido cada 24 h; de estas se separaron la biomasa y el extracto crudo (EC) mediante centrifugación a 8000 rpm a 4°C por 10 min (Thermo Scientific, USA).

1.2.2. Actividad hidrolítica y contenido de proteína

En el EC se determinó la actividad de Hex y la concentración de proteína soluble. La actividad de Hex se determinó por la adición de 200 µL de EC, 200 µL de amortiguador de citrato/fosfato 0.2 M pH 5.6, y 200 µL de *p*-nitrofenil-β-*N*-acetilglucosamina, usado como sustrato. La concentración de *p*-nitrofenol se determinó utilizando una curva patrón (Anexo 1). Una unidad enzimática se definió, como la cantidad de enzima que libera un µmol of *p*-nitrofenol por minuto (Tronsmo y Harman, 1993). Mientras que la proteína soluble se determinó por método de Lowry modificado por Peterson (Anexo 2) (Peterson, 1977).

1.2.3. Análisis de electroforesis

El EC y las fracciones obtenidas de cada paso de purificación se analizaron mediante electroforesis con geles de acrilamida unidimensionales, bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizó como referencia, estándares de masa molecular de amplio intervalo, los geles se tiñeron con un Kit de tinción con plata (Bio-Rad, Hercules USA), y analizados con el programa ImageJ 1.41 (National Institutes of Health, USA) (Schneider *et al.*, 2012).

Para verificar la actividad quitinolítica en cada etapa de purificación se realizaron zimogramas en geles de acrilamida adicionados con el sustrato 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamina, la muestra se corrió bajo condiciones no desnaturalizantes. La actividad enzimática se visualizó como zonas fluorescentes dentro de un fondo oscuro y homogéneo, bajo iluminación ultravioleta (Bio-Rad, UV Transilluminator 2000) (Tronsmo y Harman, 1993).

1.2.4. Purificación enzimática

El EC se sometió a precipitación bajo la adición de sulfato amonio al 60% de saturación a 4°C, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm, a 4°C, por 45 min. El pellet se solubilizó en una solución amortiguadora 0.05 M de Tris-HCl, adicionado con 0.15 M de NaCl a pH 7.8. La fracción soluble se inyectó en una columna de exclusión molecular (SEC) HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-100 (GE Healthcare, Chicago, Illinois USA), y la elución se llevó a cabo a un flujo isocrático de 1.3 mL/ min, en la misma solución amortiguadora (Villa-Lerma *et al.*, 2013). Las fracciones con mayor actividad hidrolítica Hex, se filtraron en unidades de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa (Amicon, Dublin Irlanda), en este paso de ultrafiltración se cambió la solución amortiguadora a Tris-HCl 30 mM, pH 7.8, las fracciones y se inyectaron en una columna de intercambio aniónico (AEC) DEAE Sefarosa (Bio-Rad, USA). La elución se llevó a cabo con una disolución amortiguadora Tris-HCl 30 mM, pH 7.8 adicionado con NaCl 1 M, usando un gradiente de 0 a 100%. Las cromatografías se realizaron en un ÄKTA FPLC (GE Healthcare, Suecia). Adicionalmente las fracciones de cada paso de purificación se analizaron con el ensayo de actividad hidrolítica Hex, determinación de la masa molecular (M_w) y zimogramas. El contenido de proteína soluble de cada paso se determinó por el método de Bradford (Anexo 3) (Bradford, 1976).

1.2.5. Caracterización de la Hex

1.2.5.1. Determinación del pH óptimo y la temperatura de la actividad hidrolítica

La fracción enzimática purificada de Hex, se caracterizó para determinar su pH óptimo de actividad en el intervalo de 4 a 11 y la temperatura de 7 a 37°C. La actividad hidrolítica de acuerdo con la sección 2.2.

1.2.5.2. Determinación del pH óptimo y la temperatura de TGA

La determinación de TGA se llevó a cabo utilizando 4-metillumbeliferil-N-acetil-D-glucosamina como sustrato aceptor y *N*-acetil-*D*-lactosamina (NaLac), manosa (Man), glucosa (Glu) o GlcNAc como sustrato donador (Figura 1.4). Se agregaron 50 µL de la enzima (concentración 50 µg/mL) a 50 µL de 4-metillumbeliferil-N-acetil-D-glucosamina (1 mM) y 50 µL de un sustrato donador (0.4 mM) en 50 µL de amortiguador de citrato / fosfato 0.2 M en un intervalo de pH de 4 a 11, a 37 °C. Después de tomar alícuotas de 10 µL en tiempos definidos (0.3, 0.6, 1 y 1.3 h), se agregaron 200 µL de amortiguador de glicina (150 mM) a pH 10.5. La fluorescencia se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm en un lector de microplacas multimodo (Tecan M1000 PRO, Männedorf Suiza) (Li *et al.*,2008).

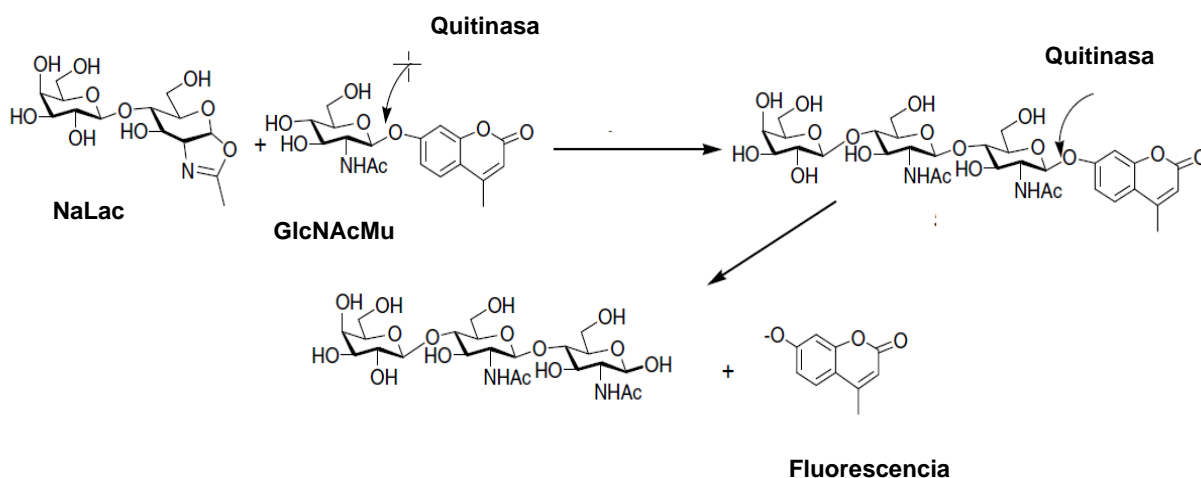


Figura 1. 4. Mecanismo propuesto para determinar actividad de transglicosilación en quitinasas (Li *et al.*, 2008).

La tasa de aumento de la fluorescencia se determinó a lo largo de tiempo, cuando la concentración de los productos de TGA son bajos en el tiempo cercano a cero, se definieron como la velocidad inicial (V_0). V_0 se estimó por regresión lineal como la pendiente de cada curva de reacción, para cada pH, temperatura y sustratos donadores.

La producción máxima de fluorescencia (FU_{max}) se estimó mediante el ajuste de los datos de TGA con el modelo de Gompertz (Ecuación 1) con los sustratos donadores.

$$FU = FU_{max} \exp(-b \exp^{-kt}) \quad (1)$$

donde FU es la unidad de fluorescencia en el tiempo ($t \rightarrow \infty$); k es la tasa de reacción (h^{-1}); b es un parámetro no biológico relacionado con las condiciones iniciales de reacción (cuando $t = 0$, entonces $X = FU_{max}$); Los rendimientos de TGA (FU/mol) se calcularon a partir del FU_{max} estimado y la concentración del sustrato aceptor.

La determinación de las energías de activación (E_a) de la TGA de la enzima purificada con los sustratos donadores NaLac y GlcNAc, se estimó mediante la ecuación de Arrhenius (Ecuación 2) usando V_0 .

$$V_0 = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (2)$$

A es un factor de frecuencia; R es la constante de gas ideal, $8.3145 \text{ kJ}^{-1}\text{mol}^{-1}$; T es la temperatura absoluta en Kelvin.

1.2.6. Caracterización de oligosacáridos de quitina

1.2.6.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los productos obtenidos de la TGA se analizaron por cromatografía en capa fina, con una placa de gel de sílice (Merck HX745188, USA) y fase móvil de metanol:agua (7:5). La placa se reveló con una solución de nitrato de plata (3 g) y acetona (500 mL), y después de su evaporación a temperatura ambiente, se añadió una solución de 50 mL de NaOH 10 N en 450 mL de etanol (Gal, 1968).

1.2.6.2. Análisis MALDI-TOF de los productos obtenidos por TGA

Los productos TGA obtenidos con diferentes sustratos donadores, pH (6 - 8) y tiempos de reacción (1.3 y 96 h), se analizaron por MALDI-TOF. Se mezclaron 5 μ L de productos TGA con 5 μ L de metanol:agua (1:1% v/v), posteriormente, 0.5 μ L de esta solución con 2 μ L de la matriz (ácido sinapínico 25 g/L en acetonitrilo con 0.1% v/v ácido trifluoroacético). Los espectros se obtuvieron utilizando un analizador MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4800 plus Analyzer, Ontario Canada) equipado con un láser de 35 a 355 nm, y el análisis se realizó a 6500 mV en modo reflector (Villa-Lerma *et al.*, 2013). Los datos de la relación masa/carga (m/z) e intensidad de iones, se usaron para determinar el grado de polimerización (DP) y acetilación (DA), respectivamente. DA se calculó con la ecuación 3.

$$DA(\%) = \left(\frac{\sum_i DA_{th}(\%) \times (I)}{\sum_i (I)} \right) \quad (3)$$

donde DA (%) es el porcentaje promedio de acetilación de los productos obtenidos; DA_{th} (%) es el valor DA teórico deducido de la estructura D_xA_y (D, para GlcN, y A, para GlcNAc) del oligómero correspondiente, determinado por MALDI-TOF, e I es la intensidad de iones (Trombotto *et al.*, 2008).

1.3. Resultados y discusión

1.3.1. Producción y purificación de la Hex

L. lecanii produjo Hex después de 72 h en un cultivo sumergido con quitina como única fuente de carbono. La máxima actividad específica de Hex se detectó a las 120 h de cultivo (1.87 U/mg) sin diferencia significativa a las 144 h (1.71 U/mg) (Figura 1.5).

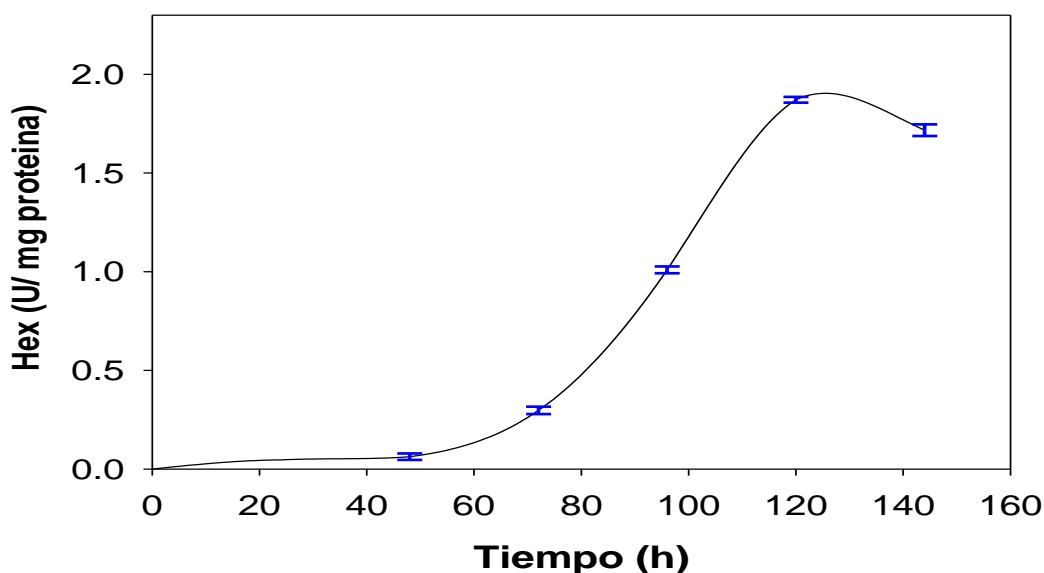


Figura 1. 5. Producción de la Hex a partir *L. lecanii* en cultivo sumergido a 25 °C y pH 6.

La fuente de nitrógeno en un medio de cultivo también juega un papel relevante en la producción de quitinasas según lo informado por Kumar *et al.*, 2017, donde emplearon extracto de levadura y cloruro de amonio para favorecer la producción de quitinasas del hongo termofílico *Humicola grisea* en cultivo sumergido. Sin embargo, en el presente estudio, se demostró que el NaNO_3 y la quitina no purificada como fuentes de nitrógeno, permiten el crecimiento de hongos. Según un trabajo anterior (Villa-Lerma *et al.*, 2016) el contenido de proteína residual en la quitina no purificada (15%) favoreció la actividad de proteasa neutra en el medio de cultivo sumergido, que a su vez redujo la actividad de Hex.

Sin embargo, vale la pena señalar que la quitina no purificada de este estudio presentó proteína residual (10%), que afectó la producción de proteasas, que no se detectaron durante la fermentación. Esto resultó benéfico para la producción de quitinasa, ya que no se redujo la actividad de Hex y permitió un rendimiento mayor.

En la Tabla 1.1 se muestra los pasos de purificación de Hex, donde la saturación con el 60% de sal, fue suficiente para precipitar un 86% de Hex del EC, mientras que la enzima restante (cerca del 14%), se precipitó llevando a cabo la saturación al 90%. Se ha informado de la purificación de quitinasas a partir de la saturación con un 80% de sulfato de amonio como fraccionamiento preliminar para eliminar algunos contaminantes, como los polisacáridos del extracto crudo de *L. muscarium* (Barghini *et al.*, 2013).

Tabla 1. 1 Purificación de la Hex a partir de *L. lecanii* en cultivo sumergido a pH 6 y 25°C*.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
EC	1600	159	272	1.7	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitación salina	50	19	236	12	7	86
Sephacryl S-100 SEC	20	13	171	54	32	63
DEAE-Sefarosa AEC	7	8	108	82	48	39

*Los Datos de la tabla representan una purificación típica de 3 repeticiones experimentales.

La SEC dio la presencia de un pico único con actividad Hex que se asignó a las fracciones 17 a 20. La recuperación de la enzima fue de $\approx 63\%$, aumentando la actividad específica 5 veces (Tabla 1.1). De acuerdo con el análisis electroforético, las fracciones de la SEC mostraron M_w de 25.2, 34.5, 50.4 y 72.3 kDa (Figura 1.6).

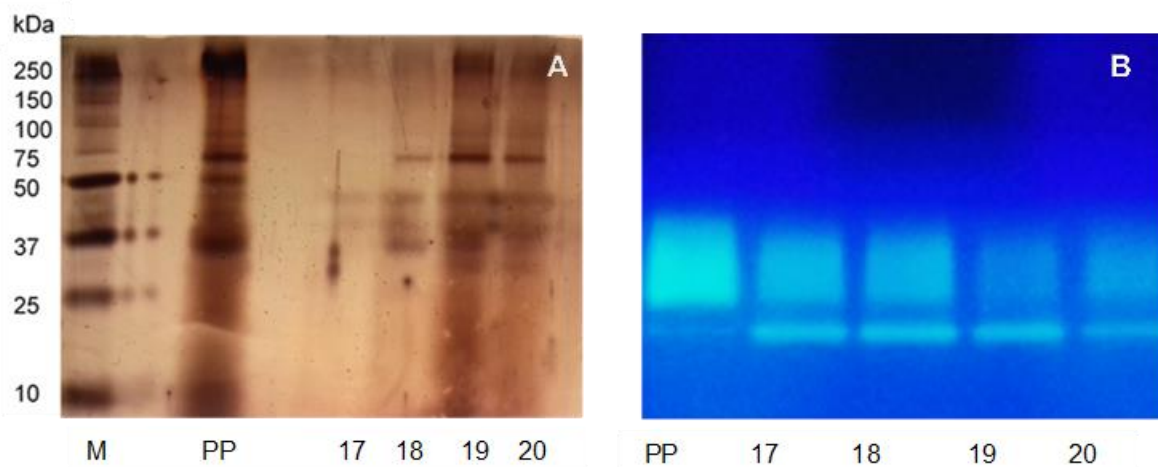


Figura 1. 6. (A) SDS-PAGE y (B) zimograma. Líneas: M: marcador de peso molecular; PP: Enzima cruda precipitada en 60% de saturación en sulfato de amonio; 17, 18, 19 y 20 fracciones con actividad de Hex, eluídas de Sephacryl S-100.

En 2011 Rocha–Pino *et al.*, informaron que *L. lecanii* en un cultivo sumergido con quitina agregada (30 g/L) produjo β -*N*-acetilglucosaminidasas con M_w de 61, 80, 96 y 111 kDa. Además, Villa-Lerma *et al.*, 2013, informaron de dos bandas 38 y 50 kDa después de la SEC de la enzima cruda de *L. lecanii* en cultivo sumergido. En otro estudio relacionado, un complejo enzimático quitinolítico de *L. muscarium* CCFEE 5003 está compuesto por al menos siete enzimas, el M_r de dos de estas quitinasas presentaron actividad Hex y fueron identificadas como CHI1 y CHI2 con M_r de 61 y 25 kDa respectivamente (Barghini *et al.*,2013).

Se han aislado varias quitinasas extracelulares, como la de *Aspergillus griseoaurantiacus*, producida en fermentación en estado sólido (Shehata *et al.*, 2018) o las isoformas de endo- β -N-acetilglucosaminidasa de cuerpos fructíferos del basidiomiceto *Flammulina velutipes* empleando cinco pasos de purificación (Hamaguchi *et al.*, 2009). Mientras que para las quitinasas intracelulares de *Mucor circinelloides* se aplicó una extracción adecuada con detergente, se requirieron dos pasos de purificación (Struszczyk *et al.*, 2009). En este trabajo *L. lecanii* produce quitinasas extracelulares, que se aislaron con una metodología de purificación de tres pasos. El factor de purificación y la recuperación de Hex en las fracciones 14 a 19 obtenidas por AEC fueron de ≈ 48 y 39%, respectivamente, con una actividad específica final de 82.4 U/mg (Tabla 1.1). La actividad de Hex en estas fracciones se confirmó en zimogramas (Figura 1.7). El proceso de purificación se realizó con éxito desde que AEC logro el aislamiento de una única banda de proteína de 50 kDa (Figura 1.8).

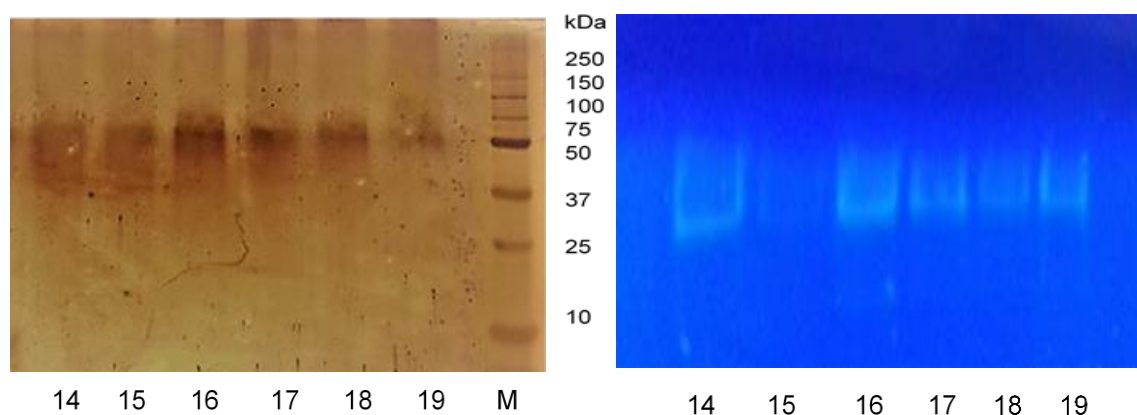


Figura 1. 7. (A) SDS-PAGE y (B) zimograma. Líneas: 14, 15, 16, 17, 18 y 19 fracciones con actividad Hex eluídas de DEAE Sefarosa; Marcadores proteínicos.

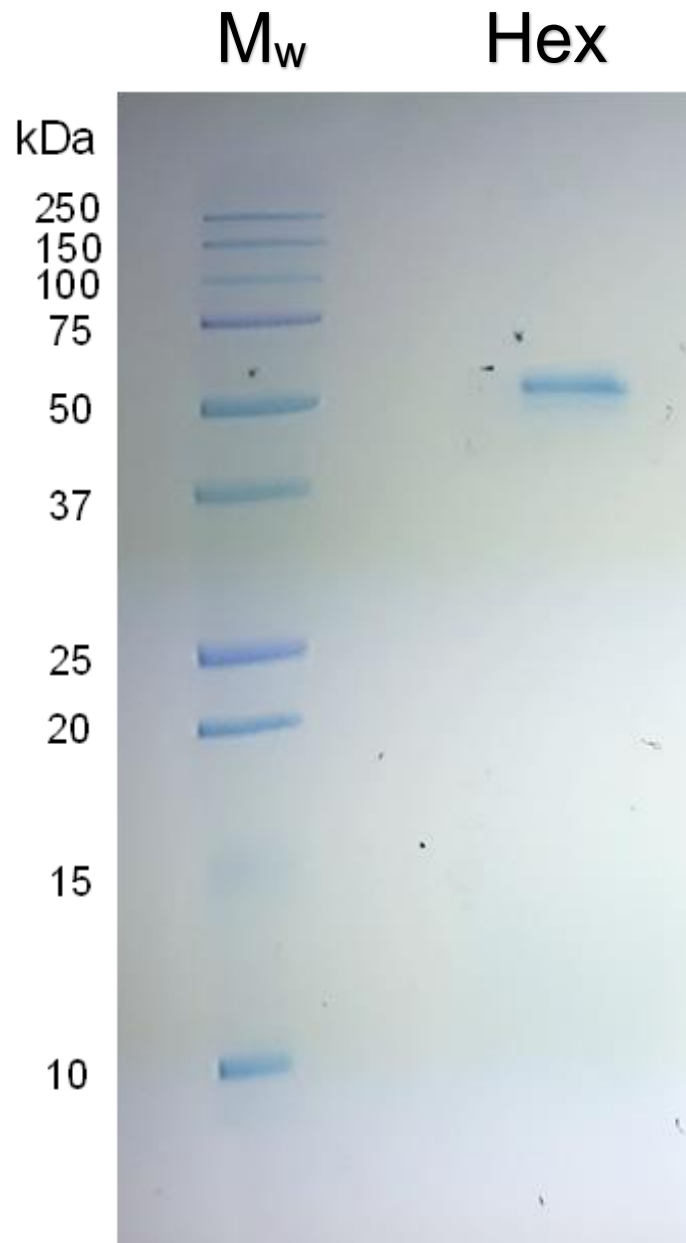


Figura 1. 8. SDS-PAGE de la Hex purificada de *L. lecanii* después de la elución en la cromatografía de intercambio aniónico mediante DEAE sefarosa y marcadores de peso molecular (M_w).

1.3.2. Determinación de la temperatura y el pH óptimos para la actividad hidrolítica

L. lecanii está adaptado para crecer a bajas temperaturas (0 °C) y, por lo tanto, sus enzimas son resistentes al frío. Un hongo similar, el *L. muscarium* (anteriormente *Verticillium lecanii*) aislado en la Antártida continental por Barghini *et al.*, 2013, produjo dos N-acetil-hexosaminidasas, CHI1 y CHI2 mostrando su mayor actividad a 45 y 40 °C, respectivamente. Sin embargo, a 5 °C, mantuvieron el 35 y 50 % de la actividad Hex. En el presente estudio, la enzima hidrolítica Hex mostró su actividad máxima a 37 °C (17.9 U/mg). A 17°C se redujo la actividad al 70%, mientras que a más de 47 °C no mostró actividad hidrolítica (Figura 1.9A). A pH 6 se obtuvo la actividad hidrolítica máxima (16.7 U/mg). Las actividades Hex se redujeron a 26 y 73% para pH 4 y 5, respectivamente. Sin embargo, hubo una rápida disminución de la actividad con el cambio de 6 a 7 con una pérdida total de la actividad hidrolítica a un pH superior a 9 (Figura 1.9B). Esto indica que el pH básico tuvo mayor influencia en la actividad. Lo que podría atribuirse a los cambios iónicos de los aminoácidos en el sitio activo de la enzima, y que a su vez altera el complejo enzima-sustrato (Kohri *et al.*, 2007). Nguyen *et al.* (2015), informaron resultados similares, ya que obtuvieron la mayor actividad de una quitinasa de *L. lecanii* a pH 6, mientras que con el aumento del pH hasta 7.5 se redujo la actividad hidrolítica.

Los hongos entomopatógenos producen enzimas quitinolíticas con alta actividad en el sitio de infección en los insectos, que está a un pH de entre 6 y 8. Sin embargo, hay otras quitinasas con actividad óptima con pH 3 ó 5 (Lu *et al.*, 2005, Adrangi *et al.*, 2013, Nguyen *et al.*, 2015 y Kaczmarek *et al.*, 2019). Barghini *et al.* (2013) reportaron a las quitinasas CHI1 y CHI2 de *L. muscarium* con actividades de N- acetilhexosaminidasa a pH 5.5 y 4.5, respectivamente.

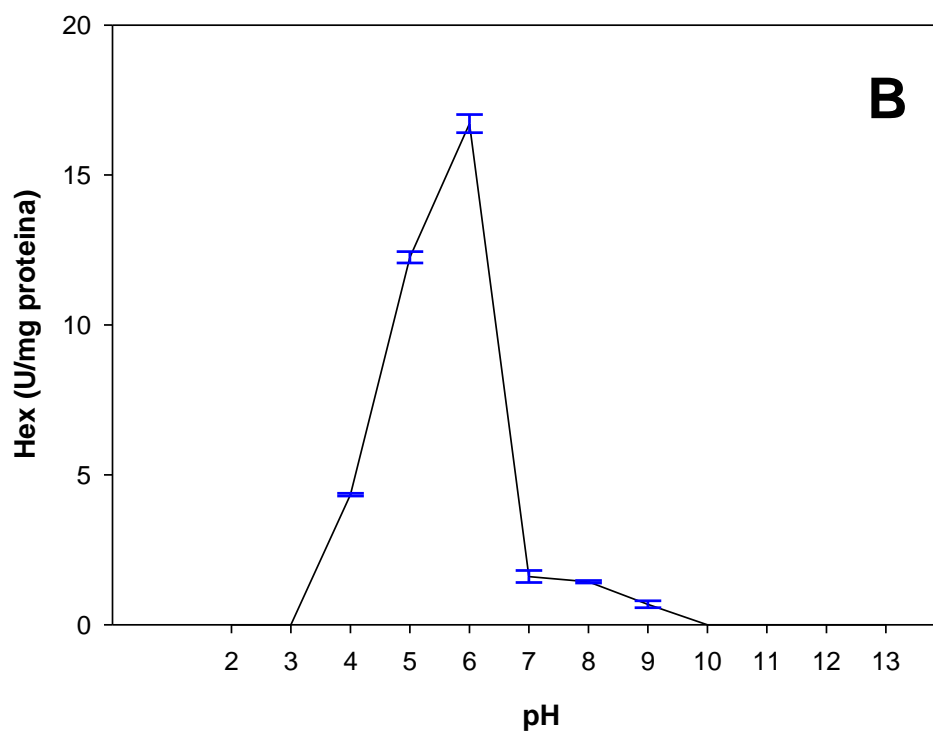
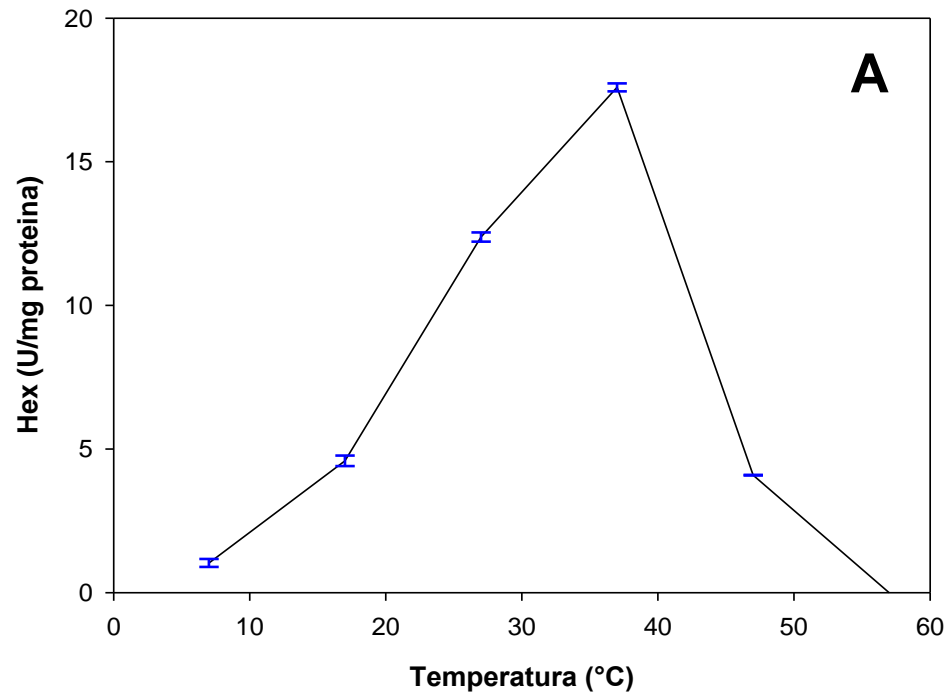


Figura 1. 9. Efecto de la temperatura (A) y el pH (B) sobre la actividad específica hidrolítica de la Hex purificada de *L. lecanii*.

1.3.3. Efecto del pH sobre la TGA

De acuerdo con Kohri *et al.* (2007), la Hex de *Bacillus circulans* perdió la actividad hidrolítica porque el ácido glutámico o el ácido aspártico se desprotona en condiciones básicas (pH 8 a 11), simultáneamente, se comporta como un catalizador ácido. En pH neutro se incrementó la TGA lo que sugiere la alta sensibilidad de la enzima a la ionización cuando el pH incrementa a 7. Esto inhibió la actividad hidrolítica (pH óptimo 6) y promovió la TGA con todos los sustratos donadores evaluados entre pH 6 y 8 (Figura 1.10).

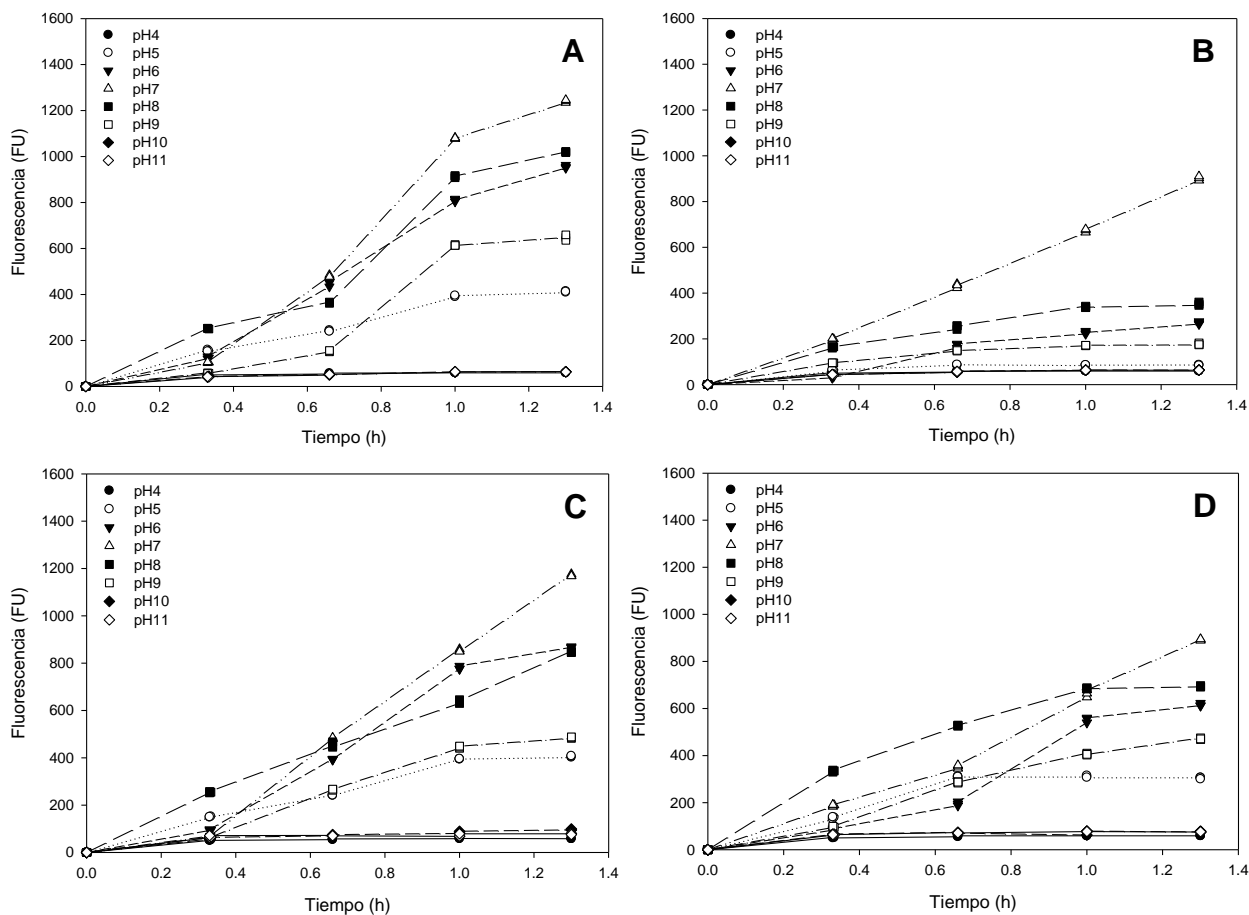


Figura 1. 10. Tiempos de reacción de TGA de la Hex a partir *L. lecanii* usando como sustratos donadores: A) Glu, B) NaLac, C) Man and D) GlcNAc variando el pH de reacción a 37 °C. Las cantidades de 4-metilumbeliferol liberado se determinaron por espectrometría de fluorescencia y expresadas como FU (unidades arbitrarias).

La Hex presentó baja V_0 a pH 4 y 5, mientras que de 10 a 12 la actividad se redujo significativamente (Figura 1.11).

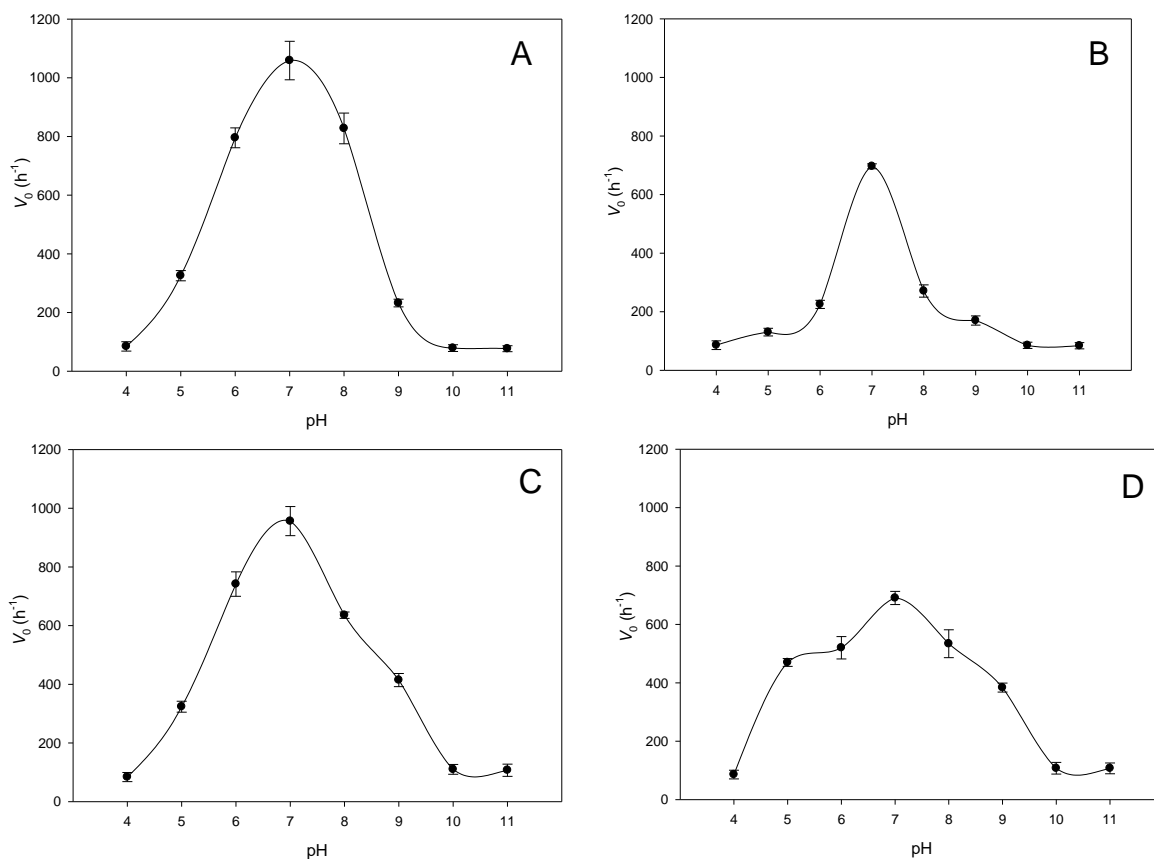


Figura 1. 11. Efecto del pH en la velocidad inicial de reacción de la TGA de Hex de *L. lecanii* usando sustratos donadores: A) Man, B) GlcNAc, C) NaLac y D) Glu.

Los rendimientos de la TGA considerando el FU_{max} y la cantidad de sustrato aceptor se presentan en la Tabla 1.2. La FU_{max} estimado por el modelo de Gompertz a partir de los datos de FU fue a pH 7 con 1378, 1212, 1412 y 1415 FU para Glu, NaLac, Man y GlcNAc, para 1.3 h respectivamente. Comparando con pH 7, la FU_{max} a pH 6 para Glu, Man, NaLac y GlcNAc disminuyó 21, 32, 78 y 54 %, respectivamente. De manera similar a pH 8, la FU_{max} se redujo con Glu, Man, NaLac y GlcNAc en 2, 26, 70 y 49 %, respectivamente (Tabla 1.2).

Tabla 1. 2. Grado de polimerización y acetilación de oligosacáridos de quitina obtenidos por la TGA de Hex de *L. lecanii* a 37°C con la estimación de la máxima producción de fluorescencia FU_{max}^a (FU).

Tiempo de reacción (h)	Sustrato donador	pH de reacción	DA (%)	DP (unidades)	FU_{max}^a (FU)	Nivel de significancia ^a	Rendimiento TGA ^b (FU/mol)
1.3	Glu	6	58	4-6	1090	0.000	22
		7	52		1378	0.000	28
		8	54		1347	0.009	27
	Man	6	57	3-5	961	0.0000	19
		7	60		1412	0.000	28
		8	58		1048	0.000	21
	NaLac	6	67	4-5	269	0.0000	5
		7	67		1212	0.000	24
		8	68		360	0.0000	7
	GlcNAc	6	100	2-4	644	0.0000	12
		7	100		1415	0.002	28
		8	100		717	0.0000	14
96	Glu	6	21	4-6	5426	0.000	108
		7	26		24366	0.00	487
		8	25		11177	0.00	223
	Man	6	36	3-5	3980	0.000	79
		7	50		11910	0.00	238
		8	50		8491	0.000	170
	NaLac	6	68	4-5	7483	0.000	150
		7	70		20912	0.00	418
		8	69		11321	0.00	226
	GlcNAc	6	100	2-4	12821	0.00	256
		7	100		18427	0.00	368
		8	100		13435	0.00	269

^a FU_{max} estimado por el modelo de Gompertz ($R^2 > 0.95$) de los datos experimentales (FU) a diferentes pH de reacción y sustratos donadores ^b Rendimientos de la TGA calculados a partir de FU_{max} y la concentración de sustrato aceptor.

La TGA aumentó con el tiempo de reacción de 120 h. Las FU empezaron a ser constante a partir de las 72 h, lo que indica una posible inhibición de subproductos en el sitio activo de la enzima (Fialová *et al.*, 2004 y Aronson *et al.*, 2006) (Figura 1.12).

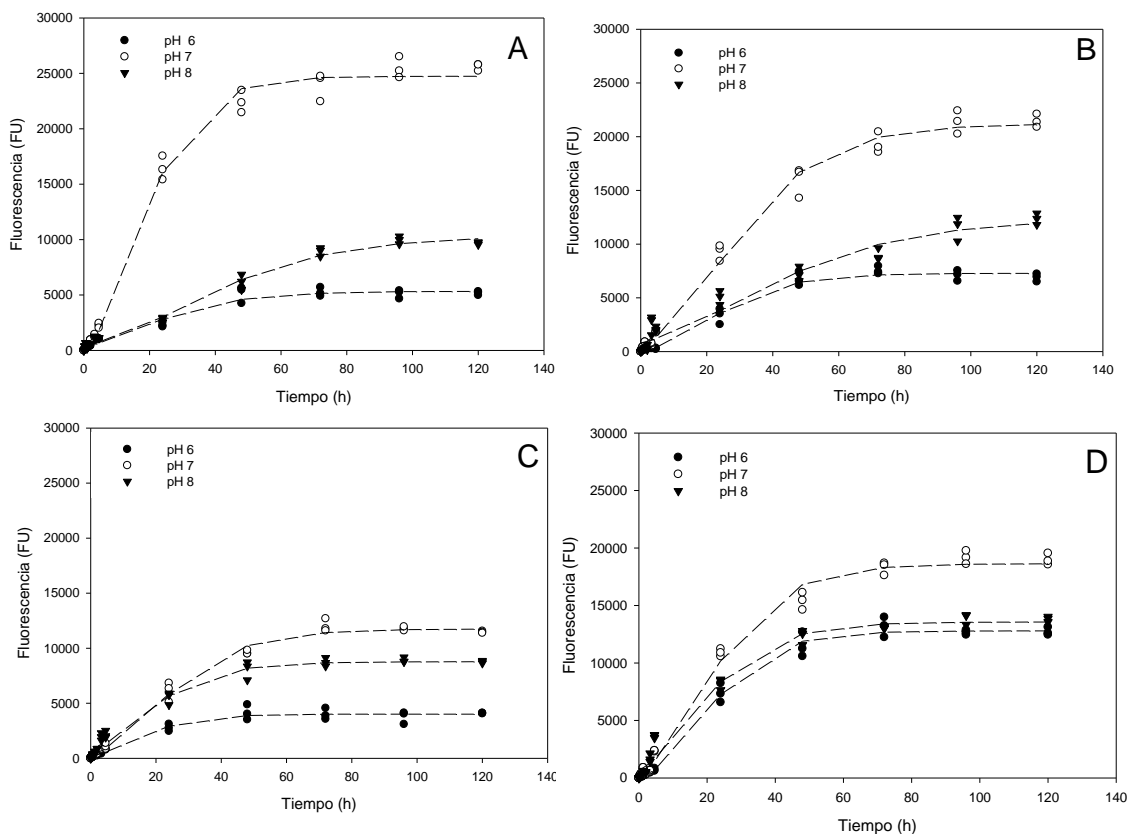


Figura 1. 12. Tiempos de reacción de la TGA de la Hex de *L. lecanii* usando como sustratos donadores: A) Glu, B) NaLac, C) Man and D) GlcNAc a pH 6, 7 y 8 a 37 °C. Las cantidades de 4-metilumbeliferol se determinaron por espectrometría de fluorescencia y expresadas como FU (unidades arbitrarias). Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz con una $R^2 > 0.95$.

A pH 7 y 96 h, FU_{max} fueron mayores en 94 (Glu) ,88 (NaLac), 94 (Man) y 92 % (GlcNAc) que aquellos determinados a 1.3 h (Tabla 1.2). El mayor rendimiento se determinó con Glu seguido de NaLac y GlcNAc a pH 7 y 96 h, mientras que el más bajo fue para Man. Según el estudio realizado por Tomabechi *et al.*, (2010) los grupos hidroxilo primarios y secundarios de los carbohidratos fueron esenciales para la señal de reconocimiento para la TGA de la Endo- β -N-

acetilglucosaminidasa de *Mucor hiemalis* la cual también requirió un grupo hidroxilo C-4 ecuatorial para transglicosilar. La TGA ocurrió cuando el oxígeno del enlace glucosídico se protona por el ácido carboxílico de un ácido aspártico, que promovió la formación de oxazolinio por reacción nucleofílica del carbonilo del grupo amida (Kohri *et al.*, 2007). El mecanismo de hidrólisis de las quitinasas también implicó la formación de un ion oxazolinio intermedio con el grupo nucleofílico de *N*- acetamida del sustrato. Después, el ion oxazolinio fue atacado por una molécula de agua para producir la hidrólisis (Figura 1.13) y (Figura 1.14). La TGA ocurre cuando el sustrato del donador compite con la molécula de agua para formar el enlace glucosídico entre las moléculas del azúcar donador y aceptor (Figura 1.14A) (Madhuprakash *et al.*, 2012).

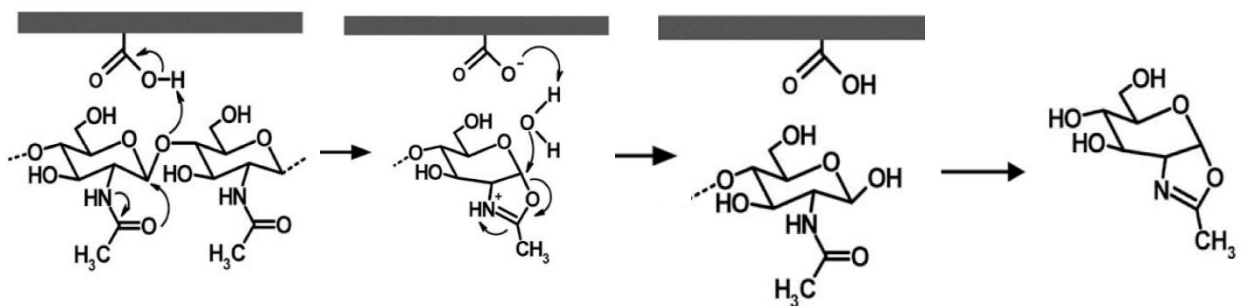


Figura 1. 13. Mecanismo de hidrólisis propuesto para las quitinasas (Kohri *et al.*, 2007).

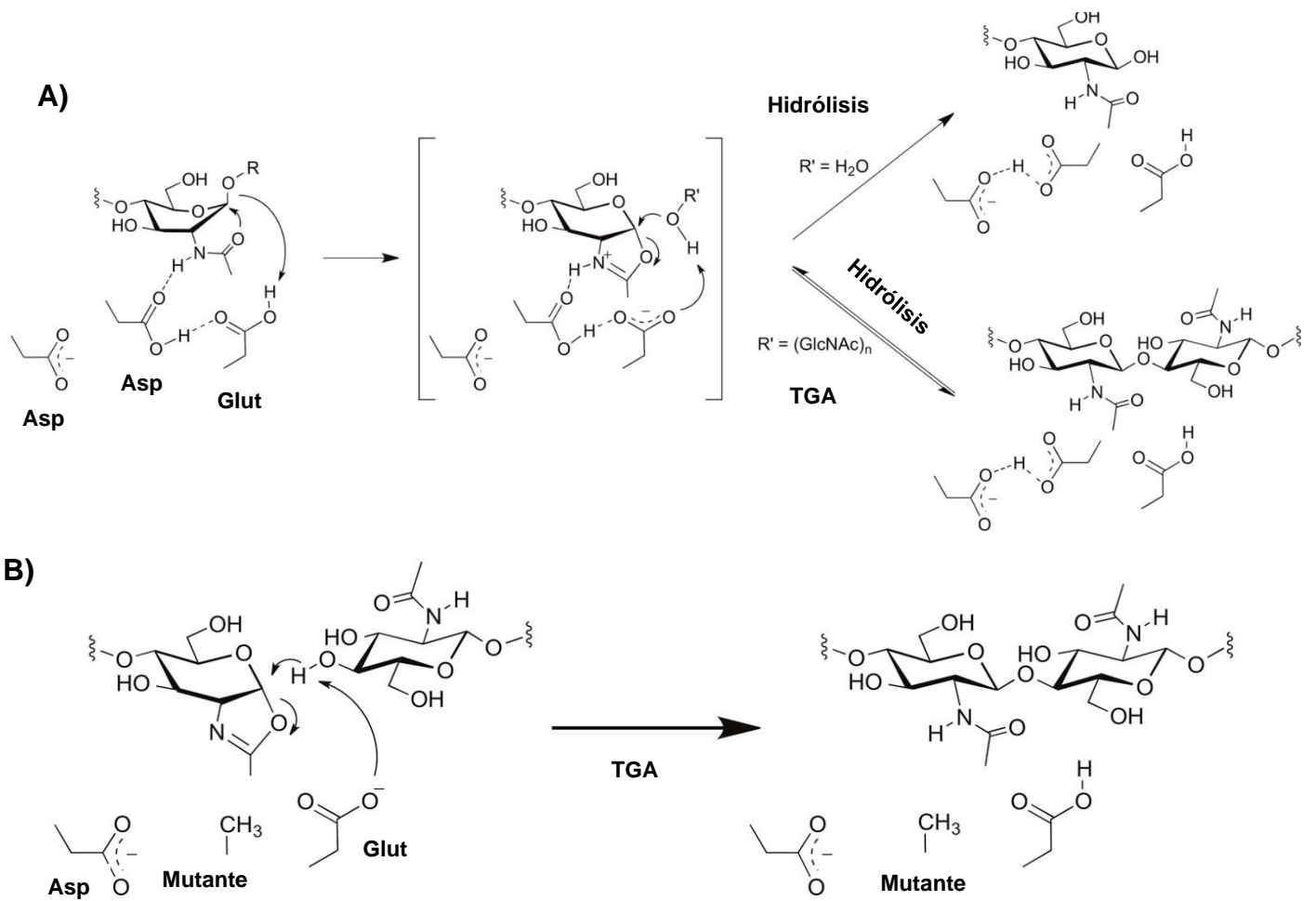


Figura 1. 14. Esquema de reacción de la hidrólisis y transglucosilación de las quitinasas (A) y mecanismo de transglucosilación para quitinasas modificadas en su sitio activo (B) (Alsina *et al.*, 2019).

La TGA de las quitinasas bacterianas a menudo requieren un GlcNAc en la posición -2 para reconocimiento y no hidrolizar 4-metilumbeliferil *N*-acetilglucosamina, en su lugar, llevó a cabo el enlace del sustrato donador (Li *et al.*, 2008 y Suma *et al.*, 2013). La endoquitinasa de *Serratia proteamaculans* que presentó un TGA en sustratos trímero a hexámero para producir oligosacáridos de hasta DP 13, debido a su baja actividad hidrolítica (Hauser *et al.*, 2005). Aronson *et al.* (2006) informó que *Serratia marcescens* produjo quitinasas con el mejoramiento de la TGA después de la mutación del triptófano por alanina en el sitio de unión a quitina que podría usar GlcNAc en la posición -1. Además, el sustrato aceptor también varió con la enzima Endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa de *Flammulina velutipes* que transglicosilo glicinasparagina a Glu, pero no presentó la TGA con galactosa (Hamaguchi *et al.*, 2010).

1.3.4. Determinación de la energía de activación de la Hex de *L. lecanii* con TGA

Se estudió el efecto de la temperatura sobre TGA manteniendo el pH fijo a 7, se obtuvo la mayor actividad a 37 °C con 1012 y 1205 FU mientras que la más baja se determinó a 7 °C con solo 201 FU, para NaLac y GlcNAc, respectivamente (Figura 1.15).

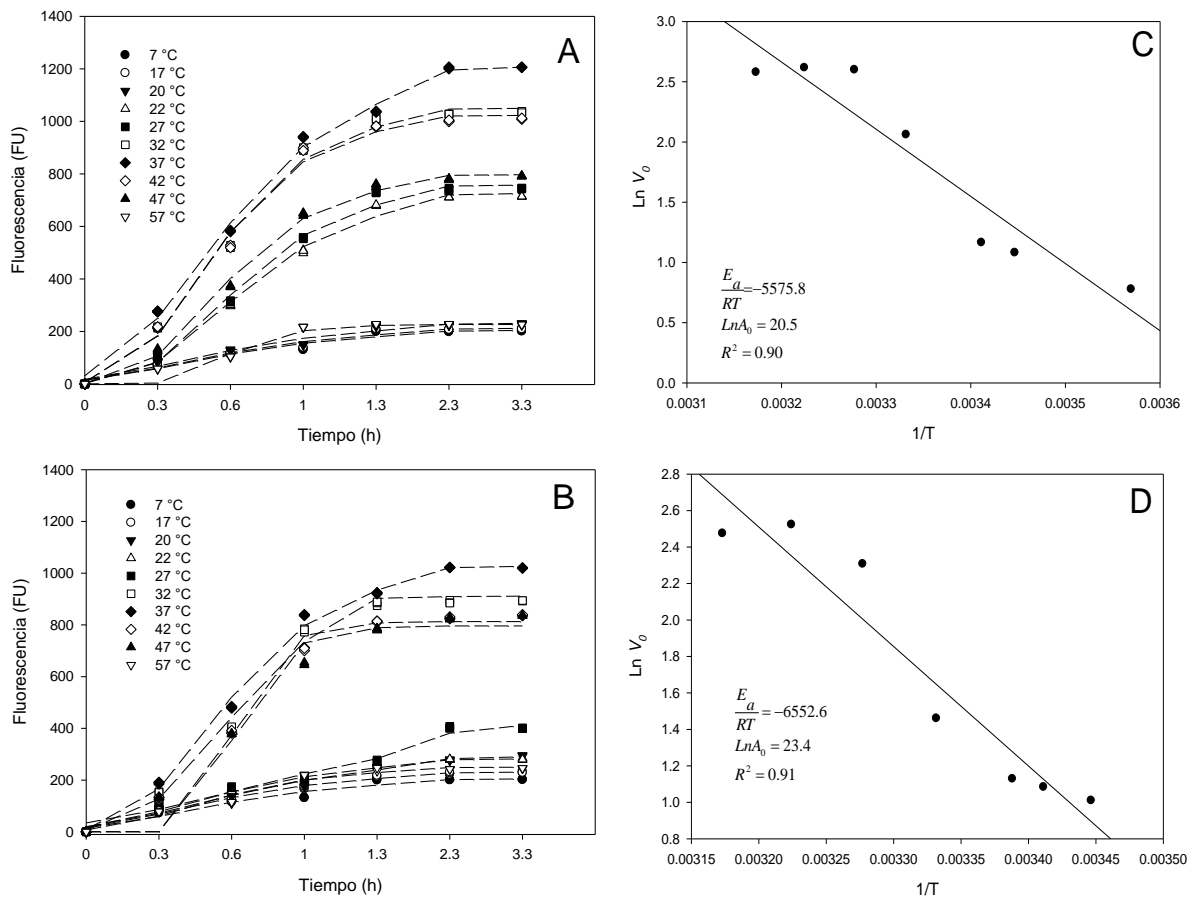


Figura 1. 15. Efecto de la temperatura en la TGA de la Hex de *L. lecanii* usando GlcNAc (A) y NaLac (B) como sustratos donadores. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz con una $R^2 > 0.90$. Para la estimación de la E_a para la TGA se usó el modelo de Arrhenius a diferentes temperaturas en presencia GlcNAc (C) y NaLac (D).

Cabe resaltar que la TGA para ambos sustratos, NaLac y GlcNAc, mostró una reducción de FU a 57 °C, que indicó un efecto de desactivación por desnaturalización de la enzima (20 % se encuentra en forma desnaturalizada). Por lo tanto, sólo los resultados de 7 a 47 °C (Figuras 1.15A y 1.15B) se usaron para la determinación de V_0 , que era la pendiente de la curva en el inicio de la reacción (Figura 1.16). La E_a de la TGA estimado por Arrhenius fue 46 kJ/mol y 54 kJ/mol para GlcNAc y NaLac, respectivamente (Figuras 1.15C, 1.15D). Las diferencias en E_a dependieron de los sustratos y de la actividad enzimática, es decir la E_a de la TGA fue menor que la de hidrólisis, como se informó en otra parte con enzimas modificadas de *Bacillus circulans* por mutagénesis dirigida al sitio (Nguyen *et al.*, 2015).

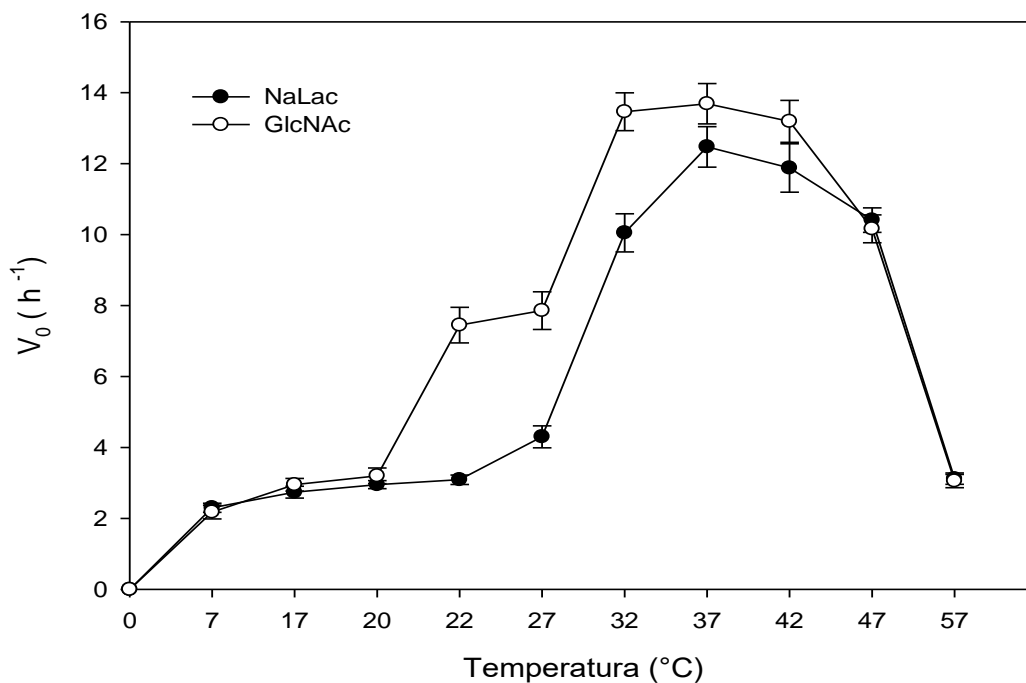


Figura 1. 16. Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de TGA a pH 7 de la Hex de *L. lecanii* usando NaLac y GlcNAc como sustratos donadores.

1.3.5. Determinación del DP de los oligosacáridos por espectrometría MALDI-TOF

La Figura 1.17 muestra los productos de reacción a 1.3 h de TGA a varios pH y sustratos donadores que se analizaron por MALDI-TOF. La Glu como sustrato donador produjo oligómeros de DP de 2, 3, 4 y 5. Las intensidades más altas fueron aquellos con $[DP4 + Na]^+$ a pH 7, $[DP3 + Na]^+$ a pH 8 y $[DP2 + Na]^+$ a pH 6, mientras que las más bajas fueron para oligómeros de $[DP3]^+$ y $[DP5]^+$ en todos los pH. La TGA usando Man produjo oligómeros entre DP de 2 y 5 con las intensidades más altas para $[DP3 + Na]^+$ a pH 7 y $[DP4 + Na]^+$ a pH 6 y 8. La TGA con NaLac produjo oligómeros de 3 y 5 DP, allí $[DP3 + Na]^+$ estaba presente en todos los pH. Finalmente, GlcNAc produjo oligómeros de 2 y 3 con la intensidad más alta $[DP2]^+$ y $[DP2 + Na]^+$.

La Figura 1.18 muestra los productos de reacción a 96 h de TGA. La TGA de Glu a pH 6, 7 y 8 mostró DP de 5 y 6 con alta abundancia de $[DP4 + Na]^+$. La Man a pH 6 produjo oligómeros con DP de 4 y 5, de hecho, la mayor abundancia fue para $[DP4 + Na]^+$, mientras que para $[DP5]^+$ y $[DP5 + Na]^+$ también aumentó. La NaLac a pH de reacción de 6, 7 y 8 produjo oligómeros de 3, 4 y 5 unidades, donde las abundancias más altas fueron para $[DP3 + Na]^+$, $[DP5]^+$ y $[DP5 + Na]^+$. La TGA usando GlcNAc produjo oligómeros de 2, 3 y 4 en pH 6,7, y 8 con abundancia mayor para $[DP2 + Na]^+$ y $[DP3]^+$.

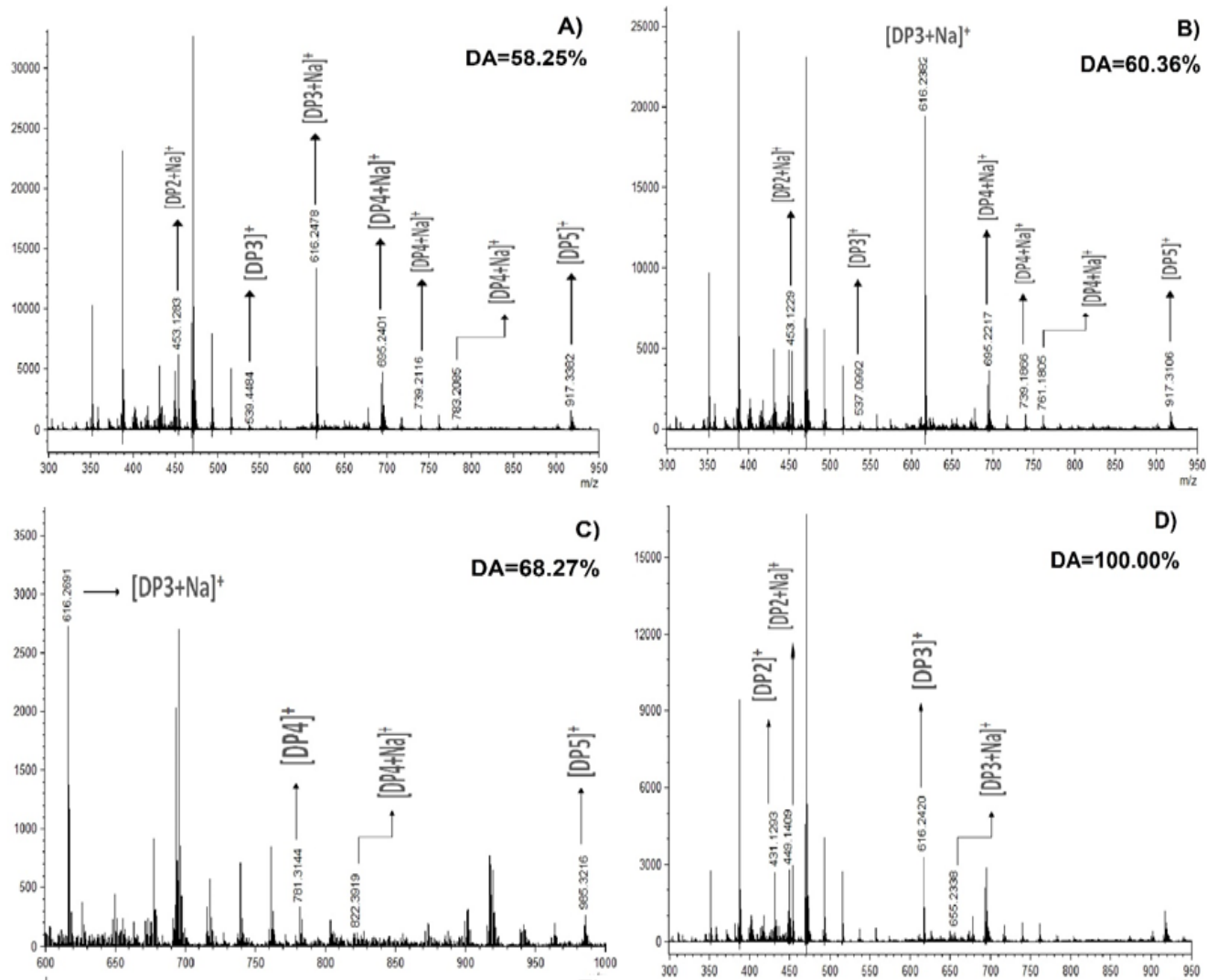


Figura 1. 17. Espectros de MALDI-TOF de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37°C, después de 1.3 h: A) Glu, pH 6; B) Man, pH 7; C) NaLac pH 8; D) GlcNAc, pH 7.

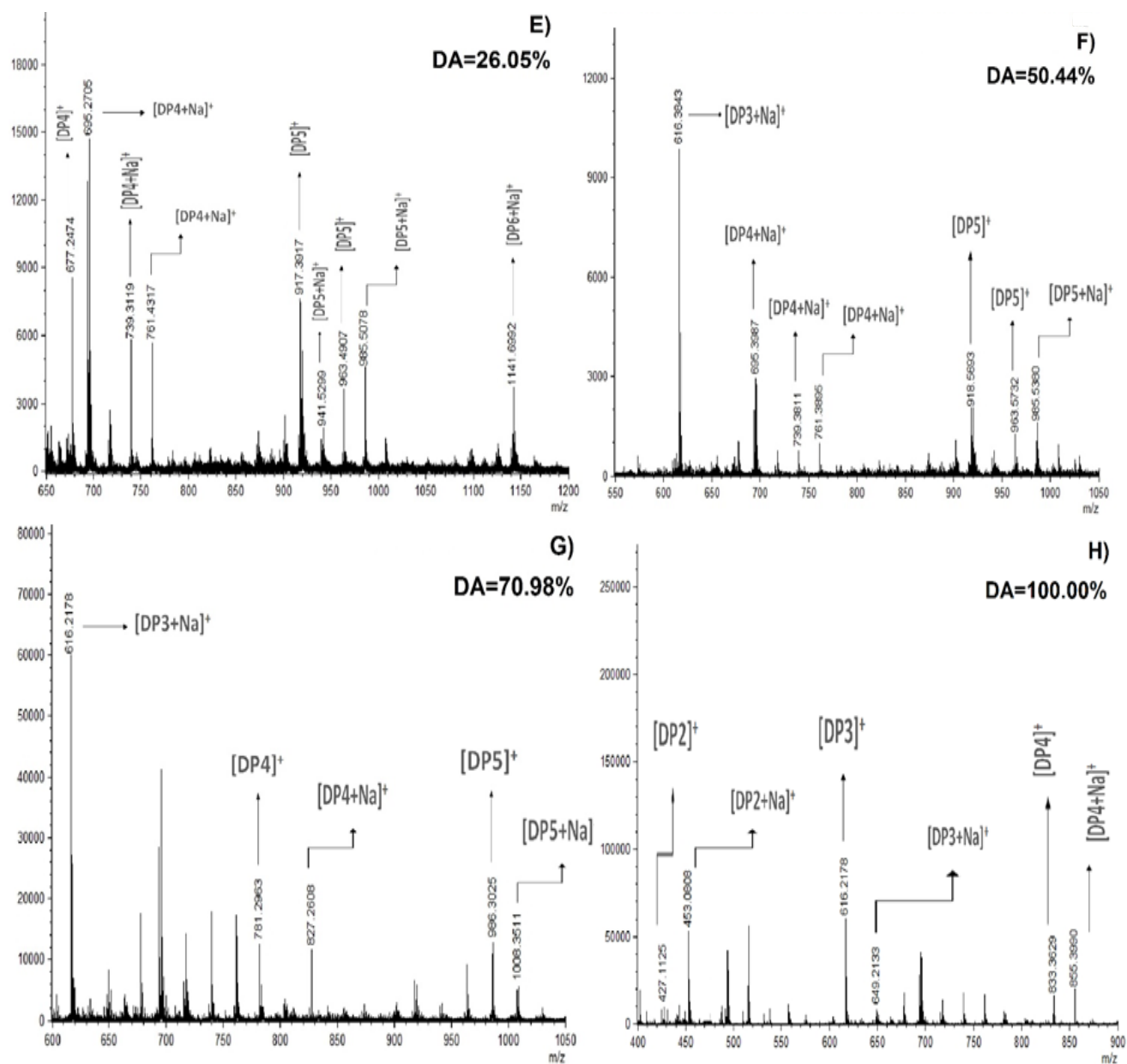


Figura 1. 18. Espectros de MALDI-TOF de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37°C, después de 96 h: E) Glu, pH 7; F) Man, pH 8; G) NaLac pH 7 H) GlcNAc, pH 7.

La producción de oligómeros por enzimas quitinolíticas con la TGA se ha reportado en varios microorganismos. En este aspecto, Li *et al.* (2008) señalaron una quitinasa de *S. marcescens* transforma sustratos diferentes de donadores a oligómeros; no obstante, la enzima no reconoció el grupo hidroxilo de Man en la posición -2. En el presente estudio, la Hex polimerizó a Man para producir oligómeros con DP de 5. La enzima también pudo reconocer Glu, GlcNAc y NaLac como sustratos donadores para la TGA. La Glu y la Man produjeron tetraoligómeros con bajo grado de acetilación, así como tetrámeros homólogos con una DA del 25% y 50%, mientras que el pentámero y el hexámero mostraron una DA del 50 y 60%, respectivamente. La NaLac produjo oligosacáridos de DP de 4 y 5, y el tetrámero tenía GlcNAc₂ y un homólogo con GlcNAc₃. En el primer caso, la molécula fue asignada a la polimerización entre 2 unidades de NaLac. Cabe mencionar que la GlcNAc produjo oligosacáridos con DP de 4 con DA del 100%, mientras que, con otros sustratos, fue capaz de producir oligosacáridos de DP de 6 parcialmente desacetilados (Tabla 1.3).

La Hex mostró una afinidad por varios sustratos donadores, acetilados o completamente desacetilados. Sin embargo, la Hex produjo oligosacáridos con DP entre 2 y 6 con diferente DA (25 a 100%) pero no pudo sintetizar oligosacáridos con un DP superior a 6. Una posible explicación de la inhibición de TGA podría ser que los oligosacáridos se unen a un aminoácido del sitio activo de la enzima. Esto es argumentado por Chen *et al.* (2014), quienes observaron que los oligosacáridos completamente desacetilados con DP entre 2 y 7 se unieron a la Alanina presente en el sitio activo mediante una interacción hidrofóbica de la quitinasa del insecto *Ostrinia furnacalis*.

Tabla 1. 3. Grado de polimerización y %DA de los oligosacáridos obtenidos con diferentes sustratos donadores, empleando la TGA de la Hex de *L. lecanii*, variando el pH de la reacción.

Sustrato	DP	Producto	DA (%)	Asignación de pico	Masa teórica (m/z)	Intensidad de pico MALDI-TOF (pH)		
						6	7	8
Glu	4	D ₄ A ₀	0	[D ₄ A ₀] ⁺	677.25	5372	8509	8474
	4	D ₄ A ₀	0	[D ₄ A ₀ +Na] ⁺	693.24	14560	14588	14522
	4	D ₃ A ₁	25	[D ₃ A ₁ +Na] ⁺	739.32	2014	5570	5320
	4	D ₂ A ₂	50	[D ₂ A ₂ +Na] ⁺	761.36	2198	5539	5521
	5	D ₃ A ₂	40	[D ₃ A ₂] ⁺	916.80	5301	7524	7421
	5	D ₃ A ₂	40	[D ₃ A ₂ +Na] ⁺	941.53	1663	1644	1621
	5	D ₂ A ₃	60	[D ₂ A ₃] ⁺	963.51	1771	3448	3248
	5	D ₂ A ₃	60	[D ₂ A ₃ +Na] ⁺	985.50	2343	4339	4328
	6	D ₃ A ₃	50	[D ₃ A ₃ +Na] ⁺	1141.66	2276	3461	3392
Man	3	D ₁ A ₂	66	[D ₁ A ₂ +Na] ⁺	614.54	10991	9833	10994
	4	D ₄ A ₀	0	[D ₄ A ₀ +Na] ⁺	695.20	24465	2898	3121
	4	D ₃ A ₁	25	[D ₃ A ₁ +Na] ⁺	739.19	7191	715	725
	4	D ₂ A ₂	50	[D ₂ A ₂ +Na] ⁺	761.17	3146	927	1024
	5	D ₃ A ₂	40	[D ₃ A ₂] ⁺	918.30	5398	1925	2021
	5	D ₂ A ₃	60	[D ₂ A ₃] ⁺	963.30	14136	1157	1242
	5	D ₂ A ₃	60	[D ₂ A ₃ +Na] ⁺	985.20	9520	1484	1521
NaLac	4	D ₂ A ₂	66	[D ₂ A ₂] ⁺	761.30	60000	60000	54326
	4	D ₁ A ₃	75	[D ₁ A ₃] ⁺	827.32	8236	15361	8512
	5	D ₁ A ₄	75	[D ₁ A ₄] ⁺	986.33	2153	14863	1236
	5	D ₁ A ₄	80	[D ₁ A ₄ +Na] ⁺	1008.32	5623	14237	10361
GlcNAc	2	D ₀ A ₂	100	[D ₀ A ₂] ⁺	427.11	9843	9834	9821
	2	D ₀ A ₂	100	[D ₀ A ₂ +Na] ⁺	453.08	55234	55121	55128
	3	D ₀ A ₃	100	[D ₀ A ₃] ⁺	616.21	64111	64242	64175
	3	D ₀ A ₃	100	[D ₀ A ₃ +Na] ⁺	649.21	9842	9831	9898
	4	D ₀ A ₄	100	[D ₀ A ₄] ⁺	833.36	10234	10245	10198
	4	D ₀ A ₄	100	[D ₀ A ₄ +Na] ⁺	855.39	21534	21455	21422

De acuerdo con Madhuprakash *et al.* (2015), los oligómeros completamente desacetilados (GlcN)₃ y (GlcN)₄ no inhibieron la hidrólisis y la TGA de quitinasa D de *S. proteamaculans*, lo que demuestra que la quitinasa pertenece a la familia G18 con la TGA promueve la producción de oligómeros con alto DA.

La TGA después de 1.3 h de reacción produjo oligómeros con 58, 60 y 68% DA para Glu, Man y NaLac, respectivamente (Tabla 1.2). Se observó una reducción de DA para casi todos los sustratos cuando el tiempo de reacción TGA aumentó hasta 96 h. La Glu fue la más afectada con 26% DA, seguido de Man y NaLac. En contraste, la GlcNAc es un sustrato acetilado y sus productos de TGA muestran un 100% de DA para cualquier tiempo de reacción debido a la relación de unidad de grupo acetil a monómero, por lo que fue similar para todos sus productos.

La Glu, Man, GlcNAc y NaLac se observaron en los carriles 1, 2, 3 y 4 y sus productos en el cromatograma de TL (Figura 1.19). El R_f de Man, Glu y GlcNAc fue de 0.83, y NaLac fue de 0.78. Los productos de la TGA mostraron diferentes bandas con R_f de 0.71, 0.58 y 0.12. Los productos de la TGA de Man y Glu mostraron bandas claras a R_f de 0.59 y 0.71 respectivamente, asignados a oligómeros con DP de 2 y 3 con baja concentración y bandas a R_f de 0.12 con alta intensidad para todos los pH. Los productos de la TGA de NaLac y GlcNAc mostraron mayor intensidad en bandas a R_f de 0.71 que a R_f de 0.58 asignados a oligómeros con 3 DP.

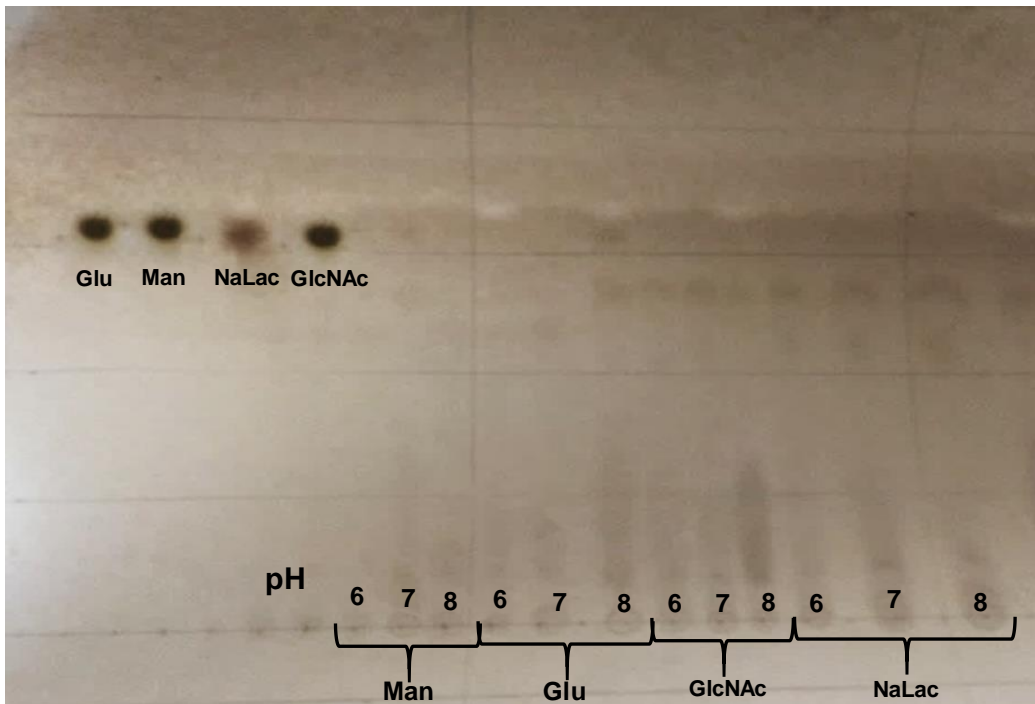


Figura 1. 19. Cromatografía de capa fina de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37 °C después 96 h a pH 6, 7 y 8.

La cromatografía de capa fina (TLC) demuestra que la Hex puede llevar a cabo la TGA utilizando sustratos con DP entre 1 y 2 para sintetizar nuevos oligosacáridos con DP entre 2 y 6. En este estudio, la producción de oligómeros con DP 5 y 6 se obtuvo después de 96 h de reacción. Sin embargo, se ha demostrado que algunas Hex pueden producir oligosacáridos con mayor DP en un menor tiempo de reacción, esto se debe a que estas quitinasas han sido modificadas genéticamente para favorecer la TGA (Tomabechi *et al.*, 2010).

1.4. Conclusiones

1. La Hex de *L. lecanii* mostró un M_r de 50 kDa y actividad hidrolítica, así como actividad de transglicosilasa.
2. La TGA produjo oligosacáridos con DP entre 2 y 5 con diferentes sustratos.
3. La Hex con la TGA tuvo la mayor afinidad por GlcNAc, que se corroboró con la energía de activación más baja.
4. La Hex purificada (pura) permite la transglicosilación hacia la producción de polisacáridos específicos.

Capítulo 2

Identificación de una β -*N*-acetilglucosaminidasa
de *Lecanicillium lecanii* y su actividad de
transglicosilación sobre oligosacáridos
específicos

2.1. Introducción

Las quitinasas son enzimas glicosil hidrolasas que llevan a cabo la hidrólisis de la quitina, que es un biopolímero que consta de unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) que están unidas por el enlace β -1,4.

Las quitinasas fúngicas pertenecen a la familia 18 de las glicosil hidrolasas, este grupo también se divide en las subfamilias A, B y C, según su similitud de secuencia y actividades enzimáticas. Los subgrupos A y B contienen todas las quitinasas fúngicas identificadas en la literatura, estas quitinasas tienen en promedio una masa molecular entre 30-90 kDa, mientras que el subgrupo C comprendía un nuevo grupo de quitinasas con masa molecular mayor, de 140-170 kDa. Las quitinasas de los subgrupos B y C tienen módulos de unión a carbohidratos, el subgrupo A no presenta esta característica; sin embargo, tienen un péptido señal en el extremo amino que indica que serán proteínas extracelulares (Adrangi y Faramarzi, 2013 y Rathore y Gupta, 2015).

Las Hex de origen fúngico tienen un papel importante en el crecimiento de hongos, ya que son responsables, junto con otras quitinasas, del control de la lisis de quitina en la pared celular. Simultáneamente, regulan la reconstrucción de estos para permitir la expansión de las hifas y prevenir la descomposición celular; además, también se pueden utilizar como agentes de control biológico contra los patógenos de las plantas (Berini *et al.*, 2018).

Se ha informado que algunas Hex tienen una secuencia de aminoácidos conservada, donde los ácidos glutámico y aspártico son unos de los principales aminoácidos involucrados en el mecanismo catalítico de estas enzimas para realizar la hidrólisis o la transglicosilación (Slàmová *et al.*, 2010).

Los oligosacáridos de baja masa molecular pueden obtenerse mediante hidrólisis enzimática o sintetizados usando enzimas con actividad de transglicosilación que permite que un sustrato aceptor y uno donador se puedan unir mediante un enlace glucosídico. La transglicosilación es un método que se ha utilizado con frecuencia porque puede influir en la enzima y el rendimiento de la reacción al modificar las condiciones de reacción (Slàmová *et al.*, 2010 y Alsina *et al.*, 2019).

Ha habido un interés considerable por los oligosacáridos acetilados y desacetilados ya que son moléculas solubles en agua, biocompatibles, no tóxicas, y también tienen propiedades biológicas como antimicrobianos y antitumorales. También se ha informado que tienen muchas aplicaciones en la ingeniería de tejidos, como el aumento en la resistencia ósea, la prevención de la adhesión bacteriana a las células humanas y la mejora de la regeneración del nervio periférico lesionado (Aam *et al.*, 2010).

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Microorganismo, Condiciones del cultivo y Método de purificación de Hex

El microorganismo, las condiciones de cultivos, y los métodos de purificación que se utilizaron para este experimento, están citados en el capítulo 1, secciones 2.1

2.2.2. Identificación de Hex

La Hex purificada se analizó por (SDS-PAGE) y se tiñó con azul de Coomassie G250. La banda se cortó con un bisturí estéril y se trató de acuerdo con la metodología propuesta por Shevchenko *et al.* (2006), para su posterior análisis. La muestra se analizó mediante ESI-MS.

2.2.3. Preparación química de oligosacáridos

Los oligosacáridos de quitina se obtuvieron con la metodología de Trombotto, *et al.* (2008), la hidrólisis de quitina se realizó con 2 g de quitina cruda en 100 mL de HCl concentrado (37% de pureza) a 70 °C con agitación continua durante 1.5 h, esta reacción se finalizó mediante un choque térmico en un baño de agua helada. Posteriormente la solución se sometió a la eliminación de exceso de HCl, mediante la evaporación hasta la sequedad y su redisolución en 100 mL de agua desionizada, por triplicado, para finalmente llevar a sequedad.

El producto anterior, se disolvió en 25 mL de agua desionizada y ajustada a pH 3 con solución 2 M de NaOH; este proceso se realizó en un baño de hielo. La disolución se filtró con una membrana de 0.22 µm y el filtrado se alcalinizó mediante la adición de solución 2 M de NaOH hasta pH 8, para precipitar los oligosacáridos de mayor masa molecular; el sobrenadante de la precipitación se sometió a precipitación etílica (1:15) y se centrifugó a 1000 rpm, durante 30 min a 4 °C, para la obtención de los oligómeros de menor masa molecular. Finalmente, el pellet se secó a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C para su posterior análisis.

2.2.4. Caracterización de los oligosacáridos

2.2.4.1. Espectroscopia ^1H RMN

Los oligosacáridos se sometieron a disolución en relación de 10 mg en 800 μL de agua deuterada (D_2O) y 5 μL de ácido clorhídrico concentrado, para ser analizados por espectroscopía ^1H RMN (Bruker ALS 300) a 300 MHz, 25 $^\circ\text{C}$, el análisis de datos se realizó en el software TopSpin 3.2. mientras que el grado de acetilación (DA%) de las muestras se calculó con la ecuación 3

$$DA\% = \frac{\frac{1}{3}A_{CH_3}}{\frac{1}{3}A_{CH_3} + A_{GlcN\ H-2}} \times 100 \quad (4)$$

Donde $A_{GlcN\ H-2}$ es el área de los protones H-2 de las unidades de GlcN; A_{CH_3} es el área de los protones de grupo metilo correspondiente a las unidades de GlcNAc (Trombotto, *et al.*, 2008).

2.2.4.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Se disolvieron 5 mg de los oligosacáridos en solución amortiguadora de ácido acético (0.2 M) y acetato de amonio (0.15 M) pH 4.8, posteriormente las muestras se filtraron con membranas de 0.45 μm .

Las muestras se analizaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC) empleando columnas de gel TSK (2500 y 6000 PW, Tosoh) acoplado en línea con un refractómetro diferencial (Wyatt Optilab T-rEx) y un detector de dispersión de luz multiángulo (Wyatt HELEOS) a 664 nm. La elución se llevó a cabo a 0.5 mL/min utilizando la misma solución amortiguadora. El análisis de los datos se realizó en el software ASTRA 6.

2.2.5. TGA con diferentes sustratos

La TGA se llevó a cabo de la siguiente manera: se adicionaron 100 μL de la Hex (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 100 μL de un amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7 y se usaron como sustratos GlcNAc, Man, Glu, GlcNAc₂, GlcNAc₃, GlcN₆ y GlcN-HCl (1mM) (100 μL). Se incubaron a 37°C de manera individual por 48 y 192 h con agitación a 100 rpm. Al término de la incubación se adicionaron 100 μL de NaOH 0.02 M, después las muestras se filtraron con membranas de 0.22 μm y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis.

2.2.5.1. Análisis de los productos obtenidos por TGA mediante MALDI-TOF

Los sustratos y productos de la TGA se analizaron por MALDI-TOF. 1 μL de los productos de la TGA se mezclaron con 9 μL de la matriz (10 g/L de 2,5 ácido dihidroxibenzoico en agua desionizada). Se tomó 1 μL de las muestras y se evaporó el disolvente a temperatura ambiente bajo una corriente de aire. Los espectros se obtuvieron a 65000 mV en modo reflector, mediante MALDI-TOF/TOF con un láser de 355 nm a 355 nm (Applied Biosystems 4800 plus Analyzer, Ontario Canada).

2.3. Resultados y discusión

2.3.1 Identificación de Hex

Las masas monoisotópicas obtenidas del ESI-MS (Tabla 2.1) se analizaron en el software *Mascot*, se compararon con las bases de datos: *SwissProt* y *NCBIprot*, se pudo determinar la masa monosotópica teórica y experimental. Los resultados mostraron péptidos idénticos de la Hex de *Lecanicillium lecanii* y una quitinasa de 56 kDa de *R. oligosporus* (chi1), la cual es una glicosil hidrolasa que pertenece a la familia 18. Los residuos marcados en negritas concuerdan con los residuos de la Hex que mostraron identidad en la secuencia de chi1 (Tabla 2.2). Estos datos representan el 9% de la cobertura de la secuencia de chi1. Los péptidos de la Hex identificados en chi1 con masa monosotópica de 493.1, 621, 778.2 y 892.1 presentan ácido aspártico (D) en su secuencia, esto concuerda con lo reportado por Slamova *et al.* (2010). La familia de la Hex de microorganismos procariontes y eucariontes contiene en su sitio catalítico aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico, éstos actúan como donador de protones para llevar a cabo la reacción de hidrólisis, además el ácido aspártico estabiliza el ión oxazolínio para la orientación del grupo acetamida para la catálisis (Adrangi *et al.*,2013). Por otro lado, estos aminoácidos son desprotonados en condiciones básicas, inhibiendo la actividad hidrolítica y favoreciendo la actividad de transglicosilación (Kohri *et al.*, 2007). De acuerdo con lo reportado, las quitinasas fúngicas de la familia 18 de las glicosil hidrolasas presentan abundancia de treonina y lisina en su sitio catalítico esto concuerda a lo reportado en el presente estudio donde en la mayoría de los residuos identificados presentan en su secuencia treonina (T) y lisina (K) (Adrangi *et al.*,2013 y Rathore y Gupta, 2015).

Tabla 2. 1. Relación m/z monoisotópica de la Hex de *L. lecanii* obtenidas del ESI-MS.

Relación m/z monoisotópica		
Experimental	Teórica	Secuencia
276.2	276.2	QK
303.2	303.2	GVK
359.1	359.1	LAR
450.9	450.8	TTTK
493.1	493.1	CQDK
621.1	621.2	KCQDK
647.2	647.2	TTSPNK
710.1	710.1	ATTTSTK
778.2	778.2	CQDKGVK
892.1	892.1	YAVCDHGK
988.1	988.1	TTSPNKNVK
1027.1	1027.1	NGPVPRPYK
1140.1	1140.2	TTTKATTTSTK
1313.7	1313.7	NGPVPRPYKASK

Tabla 2. 2. Secuencia de aminoácidos de chi1, las letras marcadas en negrita son los residuos de Hex que muestran identidad con la secuencia de chi1.

1	MLARTFLGMA	ISAFLASTGV	QAAWSSNGPN	VMYYWGQNSA	GGSENTQASLG
51	TYCESGQVDA	VLLSFLHVFN	VGGTPEINLS	SACAGTYFPN	TQLLSCPAVG
101	ADIK KCQDKG	VK VILSLGGA	AGVYGFTSDA	QGGQFAQTIW	NLFGGGSSDT
151	RPFGDAVIDG	VLDIEGGAS	TGYAAFVNAL	RQ KFSSNFLI	GAAPQCPFPD
201	AILGSVLNSA	SFDYVNVQFY	NNYCSATGSS	FNFDTWDNWA	KTTSPNKNVK
251	IMFTIPGSPT	AAGSGYVPMS	TLQTIVPSLA	SEYSSYGGVS	VWDASQAWNN
301	GDFSSQLYSL	VHSGGSTPPP	SSSTIK TTTTK	ATTTSTKTTT	TAAPTATSAP
351	GSCPVANQSC	STQNQYACTA	DGKY AVCDHG	KWVVSSCPSPG	TVCIPTTDGT
401	SIYCGYATGS	GSTCPSASAL	EIAAASFGSK	NGPVPRPYKA	SKVAAQLAVT
451	STDKNSFEAV	INARRTTLTP	FEKSVTIEFT	TPSNIKFTE	DMGPVRQVGN
501	KVRIQAKNDY	NESMTLVVKV	KGSINSGVFV	APSTSAWKFK	

2.3.2. Caracterización de oligosacáridos mediante espectroscopía ¹H RMN

El espectro de ¹H RMN de oligosacáridos obtenidos de la hidrólisis de la quitina que se muestra en Figura 2.1., presentó una señal a 2.02 ppm que hace referencia a los protones del metilo del grupo acetilo de las unidades de GlcNAc (Li *et al.*, 2019), lo que indica que los oligosacáridos obtenidos en este estudio fueron parcialmente acetilados. La molécula GlcNAc presenta otra señal a 5.20 ppm, que corresponde a los protones del H-1 de los extremos reductores del anómero α ; sin embargo, en el presente estudio no se encontró dicha señal en los oligómeros analizados. De acuerdo con lo reportado por Sugiyama *et al.* (2001), se hizo la asignación de las diferentes señales, mediante las señales de los oligosacáridos acetilados y desacetilados. Nuestros resultados indican la presencia de oligosacáridos desacetilados y parcialmente acetilados con un DP entre 2 y 6.

Otras señales se presentaron entre 3.6 - 4 ppm que corresponden a los protones (H-2, H-3, H-4, H-5 y H-6) de las unidades de GlcN y GlcNAc. Los oligosacáridos desacetilados presentaron la señal entre 3.35 ppm, las cuales corresponden a los protones del H-2 del grupo GlcN, también se encontraron otras señales que son atribuidas a residuos medios y extremos reductores y no reductores (3.25-3.05 ppm); así mismo, se detectó una señal de menor intensidad a 5.45 ppm atribuida a extremos reductores del anómero α de la molécula GlcN (Figura 2.1). Trombotto *et al.* (2008), obtuvieron oligosacáridos totalmente desacetilados, porque no se presentaron las señales a 2 y 5.20 ppm, sin embargo, en el presente estudio se obtuvieron señales de las moléculas acetiladas y desacetiladas. Kaczmarek *et al.*, (2019) reportaron que mediante la hidrólisis de quitina mediante un método químico también se hidrolizan grupos acetilos en el proceso, presentando diferentes DP y grado de acetilación. De igual manera se presentaron señales de 3.5 a 4 ppm, éstas son atribuidas a los grupos hidroxilo presentes en la molécula GlcNAc y GlcN. Por otra parte, se utilizó el área bajo la curva de cada una de las señales para calcular el DA% de la muestra, encontrando 22.47 %, esto representa un valor bajo de DA%, lo que podría indicar que hay una mayor abundancia de oligosacáridos desacetilados en la muestra obtenida después de la hidrólisis acida.

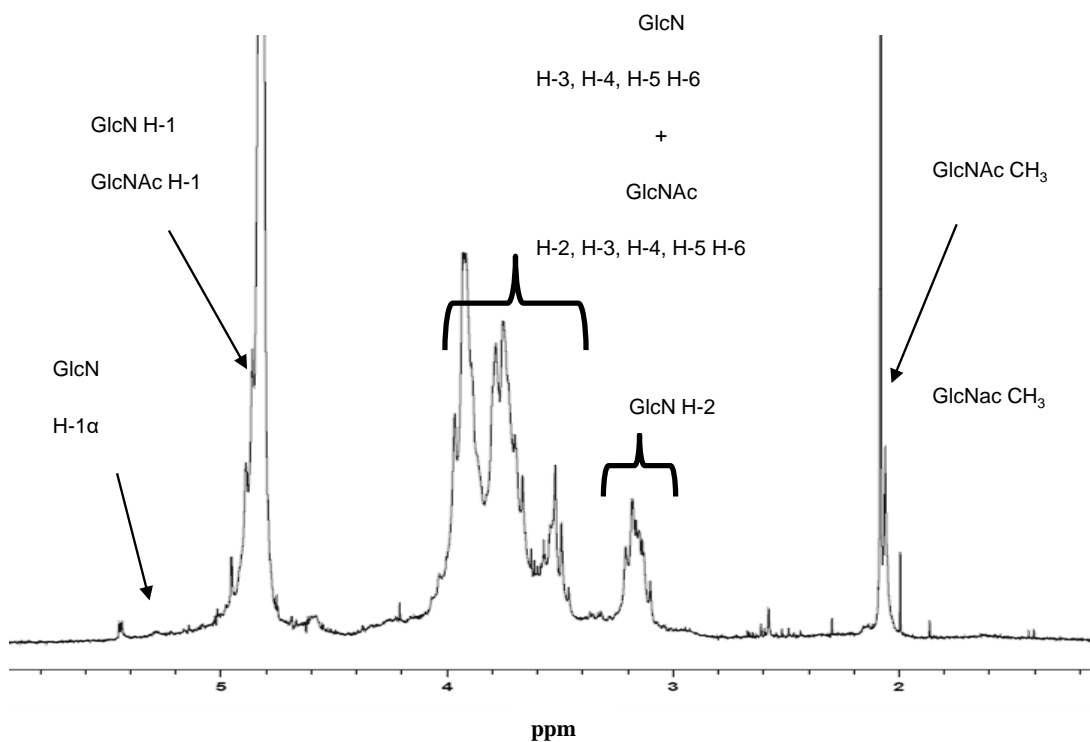


Figura 2. 1. Espectro ^1H RMN de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1.5 h.

2.3.3. Caracterización de oligosacáridos mediante SEC

Además del %DA, es importante conocer otros parámetros que ayudarán a la caracterización de los oligosacáridos, como: masa molar, el grado de polimerización y la polidispersidad. La relación de estos parámetros ayuda a comprender las propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas que poseen los oligosacáridos (Liaqat y Eltem, 2018).

En el cromatograma (Figura 2.2) se muestran los oligosacáridos analizados mediante SEC, éstos presentaron un tiempo de retención entre 28-37 min, masa molar ponderal (M_w) de $1.119 \times 10^4 \pm 1.299$ g/mol, masa molar numeral (M_n) de $8.959 \times 10^3 \pm 1.498$ g/mol, e índice de polidispersidad de 1.249 ± 1.983 %, este

último al ser mayor a 1 nos indica que los oligosacáridos obtenidos bajo esta metodología presentan diferentes tamaños moleculares. El incremento en el índice de polidispersidad se atribuyó a las altas concentraciones de ácido, temperatura y el tiempo de reacción, las cuales tienen un efecto significativo sobre la hidrólisis de la quitina para la producción de oligosacáridos (Kasaai, *et al.*, 2013). De acuerdo con lo reportado por Mourya *et al.*, (2011), los quitosanos con M_w menor a 30 kDa se consideran oligómeros de quitosano, quitooligómeros, en nuestros resultados se encontró un valor de 11.19 kDa, lo que indica la presencia de oligosacáridos de bajo peso molecular y parcialmente acetilados.

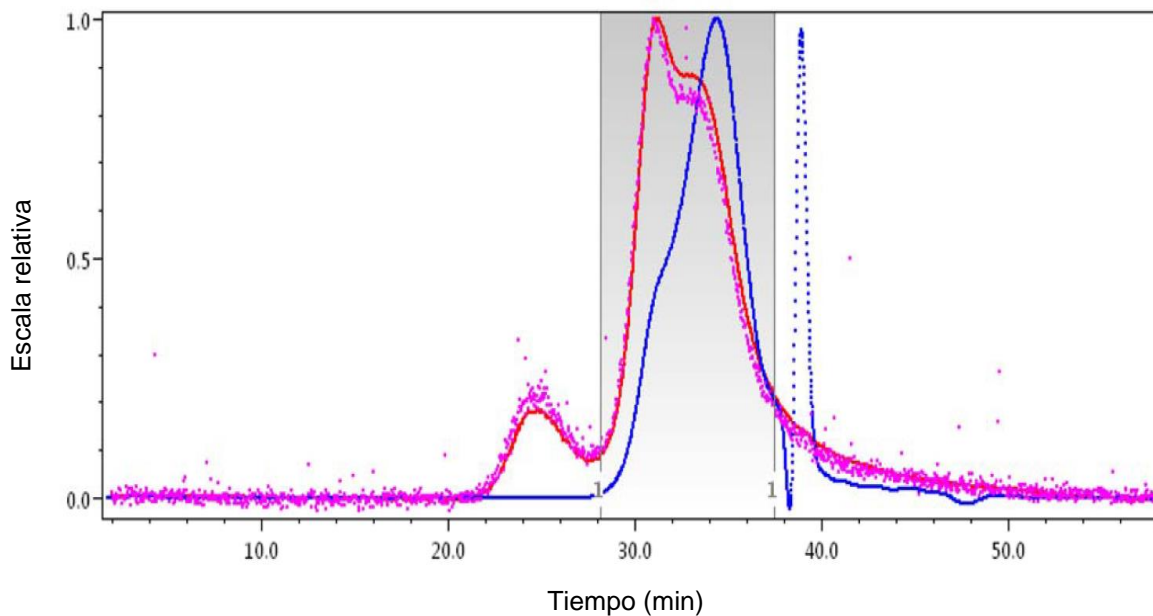


Figura 2. 2. Cromatograma de SEC de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida. (-) Detector de dispersión de luz, (-) Detector de índice de refracción.

2.3.4. Identificación de productos obtenidos de TGA por MALDI-TOF

2.3.4.1. TGA a 48 h de reacción

Los sustratos y productos de la TGA se analizaron mediante MALDI-TOF, los resultados obtenidos, se muestran en la Figura 2.3, al utilizar GlcNAc como sustrato inicial (Figura 2.3A) se obtuvieron oligosacáridos con un DP entre 2 y 3 a las 48 h de reacción, las relaciones masa/carga (m/z) de dichos productos fueron de 447.1 y 650.2 respectivamente. Así mismo se presenta la señal a 244 m/z , la cual corresponde al sustrato GlcNAc, atribuyendo que a este tiempo de reacción la Hex no ha transglicosilado completamente este sustrato. También, a partir de Man (Figura 2.3B) se obtuvo una señal a 527.1 m/z la cual corresponde a oligosacáridos con DP 3; sin embargo, no se encontró la señal del dímero de Man, esto se puede atribuir a que la Hex logró convertir todo el sustrato en un oligosacárido de DP3 en un menor tiempo, también se presenta la señal del sustrato Man a 203 m/z lo cual, sugiere que a este tiempo tampoco se ha convertido todo el sustrato a producto.

En la Figura 2.3C se presenta el espectro de masas de la TGA utilizando como sustratos GlcNAc₂ y GlcNAc₃, donde la Hex no fue capaz de transglicosilar el dímero y el trímero de GlcNAc, sin embargo, para esta reacción también se presentó una señal de baja intensidad a 244 m/z lo que indica que la Hex está hidrolizando los sustratos liberando GlcNAc, Rojas *et al.*, (2020), donde la Hex de *L. lecanii* a pH 7 presenta todavía actividad hidrolítica. Así mismo, la Hex no fue capaz de producir oligosacáridos de mayor tamaño utilizando como sustrato inicial GlcN₆ (Figura 2.3D) ya que, presentó la señal a 1007.6 m/z , característica del mismo sustrato. Para los resultados usando Glu como sustrato (Figura 2.3E), se obtuvo como producto un DP3, se pudo observar que la conversión de producto es más rápida, ya que no se encontró la señal del dímero. En la Figura 2.3F se observa el espectro utilizando como sustrato Glu adicionado con GlcNAc₂, encontrando oligosacáridos con un DP 3 provenientes de Glu, por lo que Hex no llevó a cabo la TGA de ambos sustratos,

dando preferencia a Glu sobre GlcNAc₂ para producir oligosacáridos de mayor tamaño.

Se ha informado que los grupos acetamida e hidroxilo son señales de reconocimiento para llevar acabo la TGA (Li *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, Slàmová *et al.*, (2010) informaron que el grupo acetamida se consideraba esencial para la acción de las Hex de origen fúngico. Sin embargo, ciertas alteraciones tales como modificaciones en C-2, longitud del acilo y sustitución por un hidroxilo han sido reconocidas por estas enzimas para llevar acabo TGA. Sin embargo, otros cambios como sustituciones cargadas con trifluoracetilo, sulfato y grupo amino libre condujeron a la desestabilización del ion oxazolinio. En este trabajo la Hex fue capaz de llevar acabo la TGA utilizando diferentes monómeros. La quitinasa de *Mucir hiemalis* reportada por Tomabechi *et al.*, (2010) pudo transglicosilar glucosa, manosa, GlcNAc y otros azúcares, sin embargo, no pudo llevar acabo la TGA usando ácido glucurónico y xilosa.

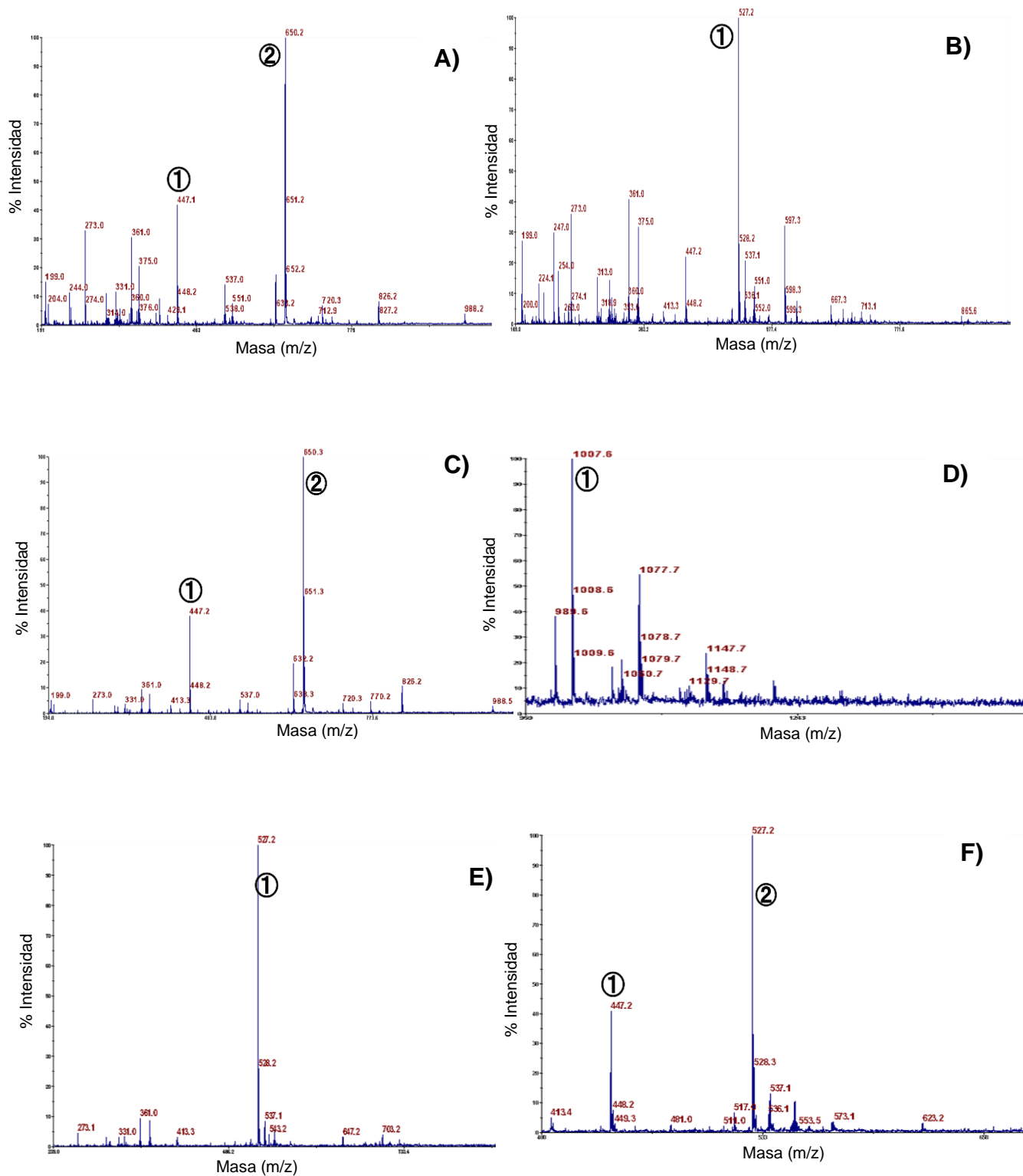


Figura 2. 3. Espectros MALDI-TOF de los productos obtenidos mediante TGA por la Hex de *L. lecanii* a 37 °C y pH 7 después de 48 h utilizando diferentes sustratos A) GlcNAc B) Man C) GlcNAc₂+ GlcNAc₃, D) GlcN₆ E) Glu y F) Glu+ GlcNAc₂

2.3.4.2. La TGA a 192 h de reacción

Para evaluar si la Hex produce oligosacáridos con un mayor DP, se evaluaron los sustratos que la enzima fue capaz de transglicosilar a un mayor tiempo de reacción. Se analizaron los productos de la TGA a las 192 h de reacción, estos resultados se muestran en la Figura 2.4. Para la TGA con GlcNAc como sustrato (Figura 2.4A), presentó las mismas señales de DP2 y DP3 encontradas a las 48 h, sin embargo, la intensidad del DP2 disminuye comparado con el DP3, esto se puede atribuir a que la Hex está utilizando DP2 para la producción de DP3, también, se observó que el DP es independiente del tiempo de reacción, ya que el grado de polimerización de mayor valor fue de DP3, esto se corroboró al analizar los productos de reacción a las 96 y 144 h donde se encontraron los mismos productos: DP2 y DP3 (Anexos 5A y 5B). Debido al posible agotamiento del sustrato (GlcNAc) se hizo un experimento adicional añadiendo más de éste después de 96 h de reacción, sin embargo, no se produjeron oligosacáridos con mayor DP, al final de las 192 h (Anexo 5C). Mientras que al utilizar Glu durante 192 h, se obtuvo la señal del trímero de glucosa (Figura 2.4B), sin embargo, se detectó otra señal a 1007.4 m/z que corresponde a un DP6. Por lo tanto, Hex generó un oligosacárido con un DP6 empleando Glu como sustrato, en comparación con GlcNAc, donde el máximo DP obtenido fue de 3 a las 192 h de reacción. En comparación con lo reportado por Purushotham y Podile (2012), donde la quitinasa de *Serratia proteamaculans* fue capaz de producir oligosacáridos con un DP6 en 3 h de reacción, esto se puede explicar ya que los autores trabajaron con una quitinasa modificada, esto permitió la formación del producto en un menor tiempo, debido a la mutación en el sitio activo reemplazando el ácido aspártico por una alanina; esta mutación inhibió la actividad hidrolítica y favoreció la TGA, también esta modificación permitió que los productos de la TGA permanecieran retenidos en el sitio catalítico durante un tiempo prolongado; permitiendo obtener oligosacáridos con alto DP. La Hex logró sintetizar un DP6 en 192 h, esto se puede atribuir a que en este estudio se utilizó la enzima de forma nativa sin ninguna modificación molecular.

Cuando se utilizó Man como sustrato (Figura 2.4C), la Hex fue capaz de producir un DP3 a las 192 h; también llevó a cabo la TGA a partir de Gal, sustrato que generó un DP3 a este mismo tiempo de reacción (Figura 2.4D). La Figura 2.4E presenta la reacción utilizando GlcNAc como sustrato inicial, a las 96 h se adicionó Man, y al final de las 192 h se encontraron oligosacáridos de DP2 y DP3 provenientes de GlcNAc, así como, un DP3 de Man, por lo tanto, la Hex polimerizó GlcNAc hasta un DP3, y al adicionar el monómero de Man, polimerizó de manera aleatoria sólo un tipo de sustrato. Deduciendo que la Hex es capaz de polimerizar diferentes sustratos (monómeros) y producir únicamente productos DP3, a partir de estos.

Una posible explicación de porque la Hex logró producir oligosacáridos con DP específico, es debido a que podrían estar produciendo sustratos que serán utilizados posteriormente por otras enzimas. Esto concuerda con Rast *et al.* (2003), ya que durante la síntesis y remodelamiento de la pared celular un sistema sinergista de quitinasas y otras enzimas actúan hidrolizando/transglicosilando la quitina para llevar a cabo el crecimiento fúngico. Los sustratos producidos por las quitinasas son utilizados por las Hex, hidrolizando estos sustratos para producir GlcNAc, la cual es utilizada nuevamente por las quitinasas, la Hex y la quitina sintasas para realizar transglicosilación y producir cadenas de quitina.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron novedosos ya que la Hex de *L. lecanii* fue capaz de transglicosilar sustratos que no estaban activados, a diferencia de lo reportado por Kohri *et al.*, (2007), donde se tuvo que activar los sustratos donadores mediante un agente de condensación para que la quitinasa de *Bacillus circulans* llevara a cabo la TGA. Por otro lado, se ha reportado que para efectuar la transglicosilación, es necesario la presencia de un sustrato aceptor y un sustrato donador, esto ha sido reportado por Rojas-Osnaya *et al.*, (2020) que la Hex de *L. lecanii* puede transglicosilar diferentes sustratos, en este trabajo la misma enzima, no necesita un sustrato aceptor para llevar a cabo TGA. La Hex de *L. lecanii* tiene la capacidad de producir oligosacáridos a partir de sustrato en forma de monómero.

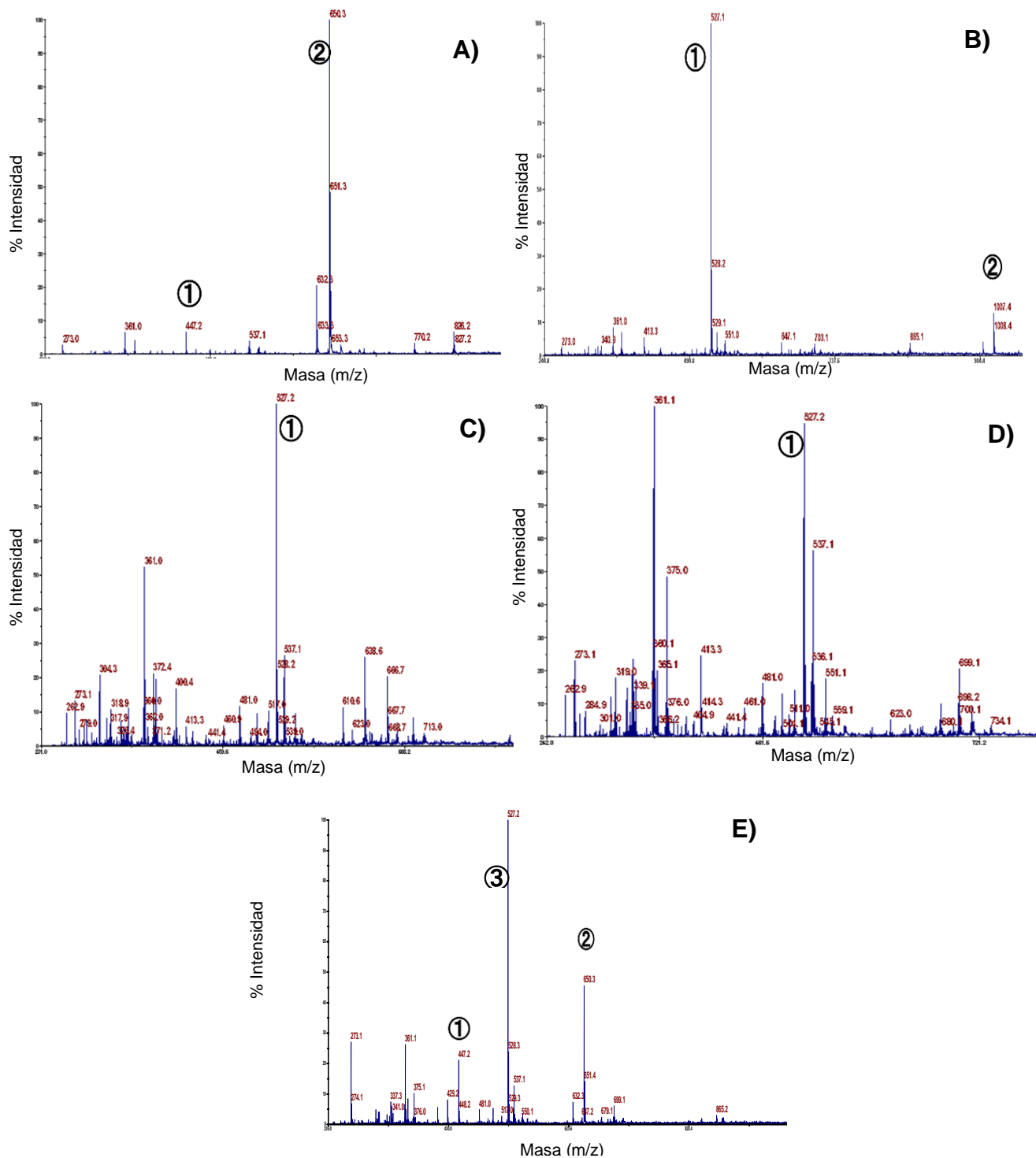


Figura 2. 4. Espectros MALDI-TOF de los productos obtenidos mediante TGA por la Hex de *L. lecanii* a 37 °C y pH 7 después de 192 h utilizando diferentes sustratos A) GlcNAc B) Glu, C) Man, D) Gal E) GlcNAc+Man.

En las tablas 2.3 y 2.4 se muestran la asignación de picos de los sustratos empleados y productos obtenidos de la TGA respectivamente, se puede observar que las señales obtenidas experimentalmente son similares a las señales obtenidas teóricamente, lo que conlleva a la identificación de los compuestos generados y al conocimiento de su estructura química.

Tabla 2. 3. Grado de polimerización (DP), %DA y relación m/z monoisotópica de los sustratos obtenidos por la TGA de la Hex de *L. lecanii*.

Sustratos	DP	DA (%)	Relación m/z monosotópica		Fórmula
			Teórica	Experimental	
GlcNAc	1	100	244.1	244.0	$[\text{HO}(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_1\text{H}+\text{Na}]^+$
Man	1	0	203.1	203.1	$[\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_1\text{H}+\text{Na}]^+$
Glu	1	0	203.1	203.1	$[\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_1\text{H}+\text{Na}]^+$
GlcNAc₂	2	100	447.2	447.2	$[\text{HO}(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_2\text{H}+\text{Na}]^+$
GlcNAc₃	3	100	650.2	650.3	$[\text{HO}(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_3\text{H}+\text{Na}]^+$
GlcN₆	6	0	1007.4	1007.6	$[\text{HO}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4)_6\text{H}+\text{Na}]^+$

Tabla 2. 4. Grado de polimerización (DP), %DA y relación m/z monoisotópica de los productos utilizados para la TGA de la Hex de *L. lecanii*.

Productos	DP	DA (%)	Relación m/z monosotópica		Fórmula
			Teórica	Experimental	
GlcNAc₂	2	100	447.2	447.1	[HO(C ₈ H ₁₃ NO ₅) ₂ H+Na] ⁺
GlcNAc₃	3	100	650.2	650.2	[HO(C ₈ H ₁₃ NO ₅) ₃ H+Na] ⁺
Man₃	3	0	527.1	527.2	[HO(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃ H+Na] ⁺
Glu₃	3	0	527.1	527.2	[HO(C ₆ H ₁₀ O ₅) ₃ H+Na] ⁺
Glu₆	6	0	1007.4	1007.6	[HO(C ₆ H ₁₁ NO ₄) ₆ H+Na] ⁺

2.4. Conclusiones

1. Se logró identificar a Hex encontrando similitud en su secuencia de aminoácidos en 9% con la quitinasa (chi1) de *R. oligosporus*.
2. La TGA de Hex no quiere un sustrato acepto, produciendo oligosacáridos con DP entre 2 y 3 con sustratos acetilados, mientras que con sustratos desacetilados se logró producir oligosacáridos con un DP 6.

Capítulo 3

Determinación de la estructura secundaria de la Hex, mediante espectroscopía de dicroísmo circular

3.1. Introducción

Las Hex son enzimas glicosil hidrolasas que llevan a cabo la hidrólisis de la quitina y tiene un papel importante en el crecimiento celular, ya que son responsables, junto con otras quitinasas, del control de la lisis de quitina en la pared celular (Yang, *et al.*, 2014).

Estas enzimas tienen importancia biotecnológica porque son aplicadas en la síntesis de oligosacáridos mediante su actividad de transglicosilación. Esto permite obtener productos con cierto grado de polimerización y acetilación; otras aplicaciones incluyen, la producción de ciclodextrinas y la producción de estructuras glucosídicas (Slàmová *et al.*, 2010). Las Hex se clasifican por su estructura y la funcionalidad de los dominios catalíticos. Las correspondientes a la familia GH-18 presentan estructuras $\alpha+\beta$ (proteínas con regiones en hélice α y hoja β) mientras que las de la familia GH-19, son dominios abundantes en estructuras β / α (proteínas con regiones predominantes en hoja β) (Suginta *et al.*, 2016).

Existen diferentes técnicas las cuales nos permiten obtener información de las conformaciones estructurales de proteínas y péptidos una de ellas es la espectroscopía de dicroísmo circular (DC), es una técnica espectroscópica de absorción que provee información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas, ésta mide la absorción diferencial de la luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha, por parte de las moléculas que presentan actividad óptica (no disponer de un plano de simetría y no ser superponibles con su imagen especular. El cromóforo de interés para proteínas incluye el enlace peptídico (240 nm), grupos aromáticos (260-320 nm), cada aminoácido tiende a tener un perfil de longitud de onda característico, como el triptófano a 290 nm, tirosina 275 nm y la fenilalanina 255 nm y los enlaces disulfuro (260 nm), además se pueden analizar otros compuestos en DC como flavinas (300-500) y cofactores cercanos a 330 nm. (Hennessey y Johnson, 1982).

De acuerdo con la clasificación de Manavalan y Jonhson, (1983), las proteínas fueron divididas en cuatro grupos de acuerdo con las características espectrales (Figura 3.1).

- α (Proteínas con regiones predominantes en hélice alfa): presentan dos mínimos negativos a 208 y 222 nm y un pico positivo entre 190 y 195 nm.
- $\alpha + \beta$ (proteínas con regiones en hélice α y hoja β): presentan un mínimo negativo a 208 nm y un pico positivo entre 190 y 195 nm.
- α / β (proteínas con regiones predominantes en hélice α y regiones en hoja β): presentan dos mínimos negativos a 208 y 222 nm y un pico positivo entre 190 y 195 nm.
- β (Proteínas con regiones predominantes en hoja beta): presentan un mínimo entre 210 y 220 nm, otro mínimo entre 170 y 180 nm.

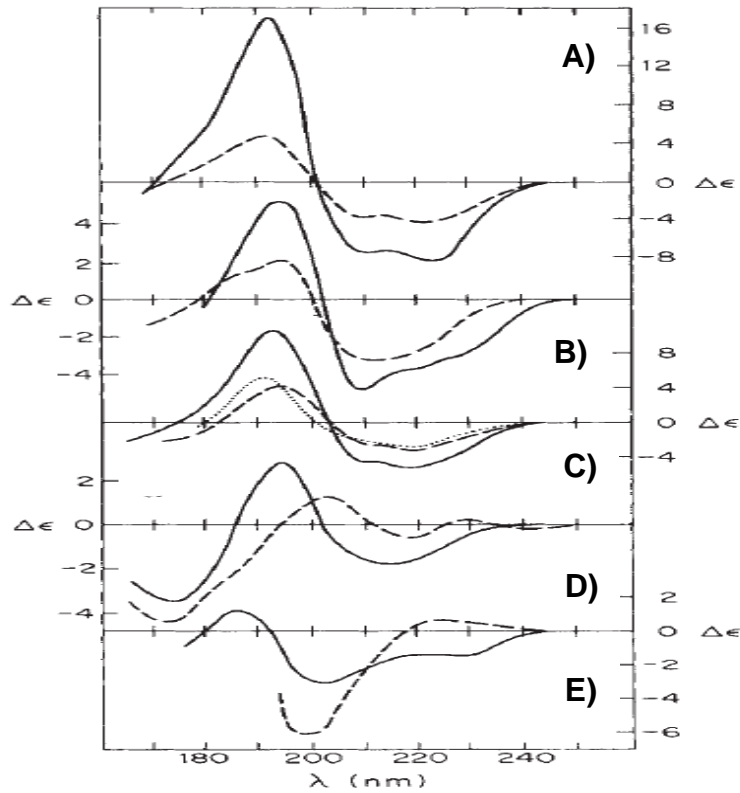


Figura 3. 1. Clasificación de las proteínas de acuerdo a características espectrales: A) α : mioglobina y citocromo, B) $\alpha + \beta$: lisosima y ribonucleasa A, C) α / β : isomerasa, flavodoxina y subtilisina, D) β : prealbúmina y proteína Bence-Jones y E) β : quimiotripsina y tripsina.

Para la determinación de la composición de la estructura secundaria, como hélice α , hoja β y giros se utilizan algoritmos para estimar la composición (SELCON, VARSLC, CDSSTR, K2D y Contin) (Kelly *et al.*, 2005 y Singh *et al.*, 2015). Se ha utilizado DC para analizar la integridad estructural de algunas quitinasas de *Streptomyces peucetius*, mostrando un cambio en la conformación al agregar urea en la solución de proteína, provocando la desnaturalización de la proteína anulando sus funciones biológicas (Yao y Liu, 2018).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Producción y purificación de la Hex

Se siguió la metodología planteada en el punto 1.2.1. y 1.2.4 del capítulo 1. Las fracciones de AEC con actividad Hex se liofilizaron (LABCONCO, Estados Unidos).

3.2.2. Espectroscopía de dicroísmo circular

3.2.2.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la estructura secundaria de la Hex

Para determinar el efecto del pH, se prepararon disoluciones de la Hex y a una concentración de 40 µg/mL en amortiguador de fosfatos 5 mM a diferentes valores de pH (4 - 11) a 25 °C, mientras que la quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich) fue disuelta bajo las mismas condiciones, con un valor fijo de pH 7. Por otro lado, el efecto de la temperatura se evaluó en un intervalo de 25-70 °C, manteniendo el pH en 7. Los espectros de dicroísmo se obtuvieron empleando un espectropolarímetro Jasco J-715, calibrado con (+) – ácido canforsulfónico en una longitud de onda de 240 a 190 nm, a 25 °C, en una celda de 0.2 cm de paso de luz (Tello *et al.*, 2015).

3.2.2.2. Análisis de datos

Los datos de DC se reportaron como elipticidad por residuo medio $[\Theta]_{MWR}$ (grados $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), que se calculó utilizando un residuo de masa molar promedio de 110 Da (Sreerama y Woddy., 2000).

3.2.3. Desnaturalización térmica

La desnaturalización térmica de la Hex se llevó a cabo calentando la muestra a una tasa de barrido de 5 °C/min, monitoreando el cambio de elipticidad a un valor de longitud de onda fija (220 nm).

La fracción aparente de la proteína desnaturalizada (f_D) se determinó considerando las elipticidades presentes en las regiones lineales de la curva de desnaturalización térmica, donde la primera región (parte superior) se refiere a la estructura de la proteína en su forma nativa y la segunda región (parte inferior) a la estructura de la proteína en su forma desnaturalizada.

Para el cálculo de la f_D se utilizó la siguiente ecuación:

$$f_D = \frac{(\theta_T - \theta_N)}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (5)$$

donde θ_T es la Elipticidad de la muestra a una temperatura particular; θ_N es la elipticidad de la proteína nativa; θ_D es la Elipticidad de la proteína desnaturalizada (Tello-Solís y Romero-García, 2001).

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto del pH sobre la estructura secundaria de la Hex

La Figura 3.2 muestra el espectro de DC correspondiente a Hex de *L. lecanii* a 25 °C y pH 7, los datos experimentales (■) y los datos predichos (—) fueron analizadas en Dichroweb utilizando el método de CDSST. El espectro presento un mínimo a 208 nm y un máximo a 195 nm. De acuerdo con Manavalan y Jonhson, (1983), estas características espectrales corresponden a la lisozima.

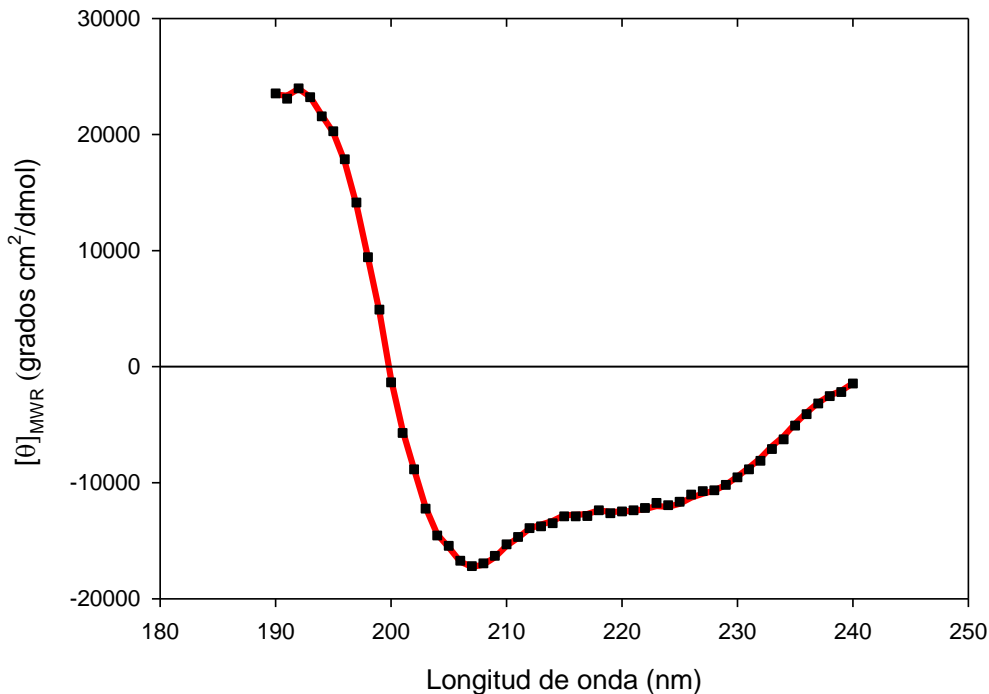


Figura 3. 2. Espectro de DC de Hex de *L. lecanii* a pH 7 y temperatura de 25 °C. Los datos experimentales (■) y datos predichos (—) analizados por el método de CDSST.

En la figura 3.3 se presentan los espectros de la Hex, analizados a diferentes valores de pH, donde se observó la señal de DC con un máximo a 195 nm y un mínimo a 208 nm y un hombro a 220 nm se pueden observar cambios en la elipticidad dependiendo del intervalo de pH, entre 4 y 7, se aprecia predominantemente conformación con estructura $\alpha + \beta$ (proteínas con regiones en hélice α y hoja β) de acuerdo con la clasificación reportada por Manavalan y Jonhson (1983), esta estructura es característica de las enzimas glicosilhidrolasas, presenta dos mínimos negativos a 208 nm y otro ligero a 220 nm, así como, un máximo a 195 nm que es característico de estructuras α .

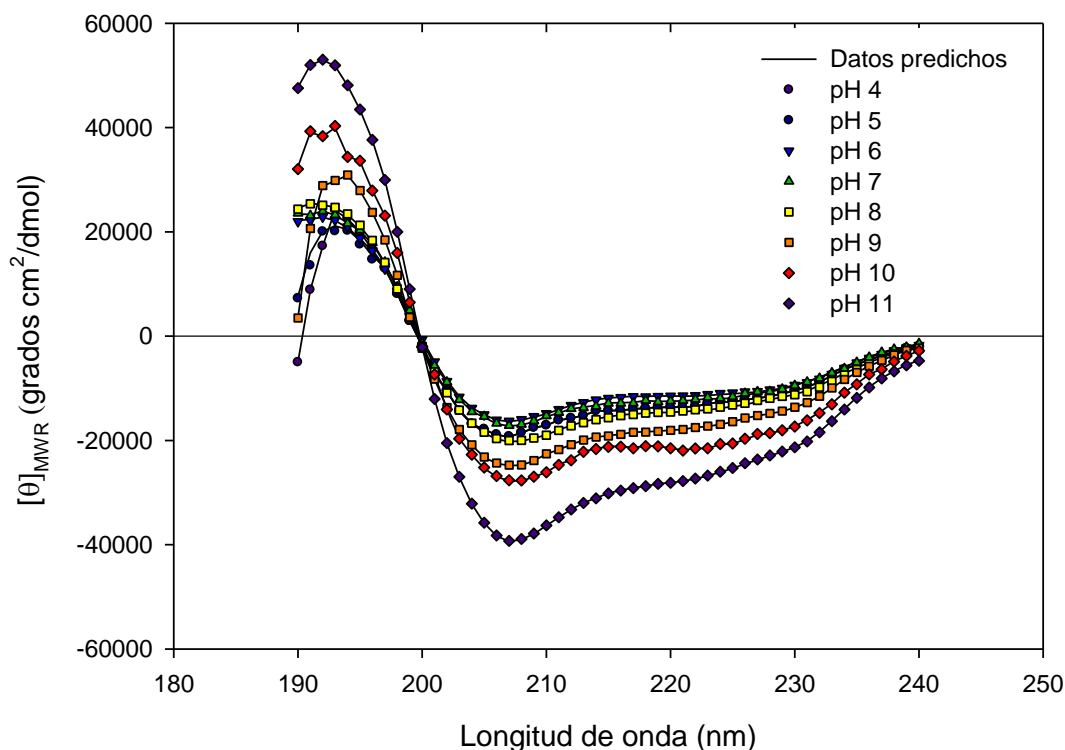


Figura 3. 3. Espectro de dicroísmo circular de la Hex de *L. lecanii* a diferentes valores de pH y una temperatura de 25 °C.

Para valores de pH entre 8 y 11, se observan cambios en el máximo de 195 y 208 nm, lo que da indicios que, a valores de pH básico, la estructura de Hex se está orientando hacia estructura alfa. Los espectros obtenidos a los diferentes valores de pH fueron analizados en DICHROWEB utilizando la base de datos CDSSRT, los datos experimentales tuvieron un buen ajuste a los datos predichos y esto se vio reflejado en obtener un valor de NRMSD menor a 0.250 en todos los espectros analizados. La estimación de la estructura secundaria de la Hex a los diferentes valores de pH se muestra en la Tabla 3.1 se observa que a pH menor a 7, la composición en estructura α se mantiene en valores cercanos al 50 %, mientras que a valores de pH básico el porcentaje de estructura alfa va aumentando hasta alcanzar un valor de 77%, la composición de la estructura beta pasa de un valor del 26% a uno del 6 %. El aumento en la estructura alfa se puede atribuir debido a la presencia de iones hidroxilos, se desestabilizan las interacciones no covalentes, particularmente en los enlaces de hidrogeno, en la Quitinasa de *Aeromonas hydrophila* (Halder *et al.*, 2016).

Tabla 3. 1. Determinación en la composición de la estructura secundaria de la Hex de *L. lecanii* a diferentes valores de pH.

pH	Hélice α	β -paralela	β -antiparalela	Giros	Desordenada	Total	NRMSD
4	0.51	0.12	0.10	0.08	0.18	1	0.002
5	0.45	0.16	0.11	0.09	0.20	1	0.003
6	0.51	0.10	0.06	0.11	0.21	1	0.010
7	0.53	0.10	0.06	0.12	0.20	1	0.011
8	0.60	0.07	0.04	0.11	0.18	1	0.012
9	0.77	0.05	0.03	0.04	0.09	1	0.002
10	0.77	0.04	0.02	0.06	0.11	1	0.005
11	0.77	0.04	0.02	0.06	0.11	1	0.005

A partir de lo que reportó Rojas-Osnaya *et al*, (2020), la máxima actividad hidrolítica y la máxima TGA a pH 6 y 7, respectivamente, el presente estudio, da indicio que, a estos pH, las estructuras α y β no sufren cambios significativos en su composición, esto sugiere que la diferencia de actividades sea probablemente a partir de las desprotonaciones de los aminoácidos (Ác. Glutámico y/o aspártico) presentes en el sitio activo.

En la figura 3.4 se realizó una comparación de la Hex de *L. lecanii* con una quitinasa de *Streptomyces griseus*, encontrando similitud en la composición de la estructura secundaria a pH 7 en las hojas betas paralela y antiparalela; sin embargo, hay una diferencia del 10% en la estructura alfa (Tabla 3.2).

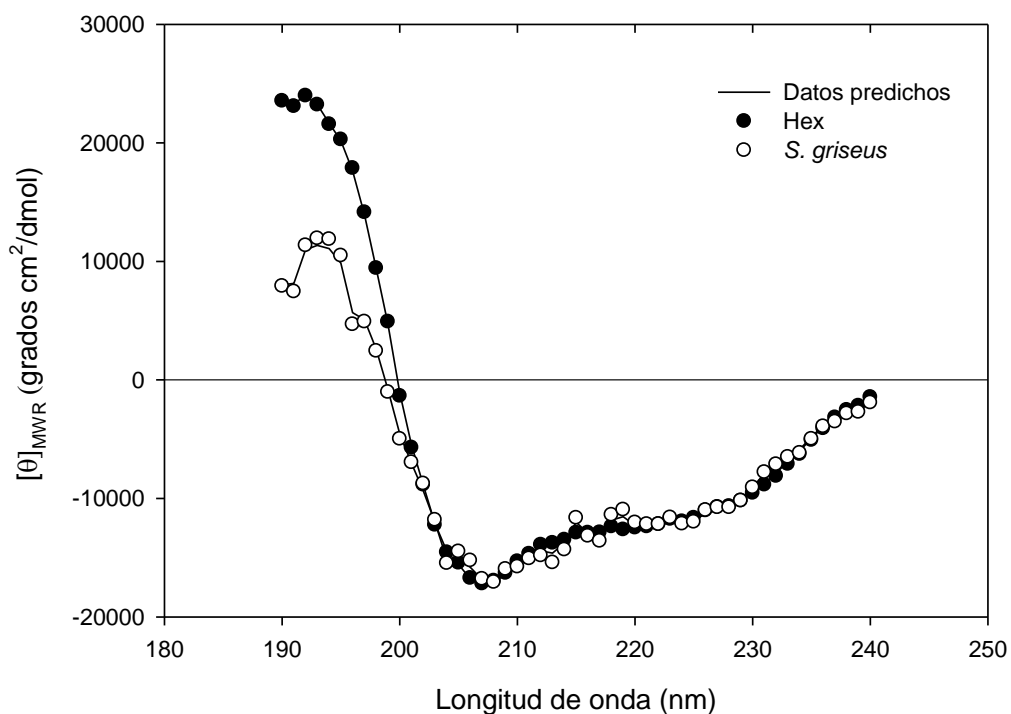


Figura 3. 4. Espectros de dicroísmo circular de la Hex de *L. lecanii* y la quitinasa de *S. griseus* a pH 7 y temperatura de 25 °C.

Tabla 3. 2. Determinación en la composición de la estructura secundaria de la Hex de *L. lecanii* y la quitinasa de *S. griseus* a pH 7 y temperatura de 25 °C.

	Hélice α	β -paralela	β -antiparalela	Giros	Desordenada	Total	NRMSD
Hex	0.53	0.10	0.06	0.12	0.20	1	0.011
Quitinasa de <i>S. griseus</i>	0.44	0.07	0.05	0.20	0.24	1	0.034

3.3.2. Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de la Hex

Al incrementar la temperatura para determinar los cambios en la estructura secundaria de la Hex (Figura 3.5), aún se observan las señales correspondientes de la estructura $\alpha + \beta$ (195 nm, 208 y 220 nm), para las temperaturas de 25 y 35, pero a temperaturas mayores a los 50 °C, se observa la señal de 195 nm de menor elipticidad a las anteriores, y la elipticidad constante a partir de los 280 nm, lo que nos indica una mayor proporción de estructuras β , esto es similar a lo reportado por Johnson (1988), donde encontraron que la estructura α es afectada por la temperatura, mientras que la estructura β es más estable a estos cambios. Debido a que las cadenas β presentan puentes de hidrógeno entre el aminoácido de una hebra con dos aminoácidos diferentes de la hebra opuesta. Después de calentar a 70 °C y enfriar a 25 °C (DDC) se observó una desnaturalización térmica irreversible, ya que el espectro (25 °C - DDC) presentó mayor semejanza en la elipticidad con el de 70 °C que con el de 25 °C, lo que sugiere una mayor predominancia de estructuras β , por la pérdida de estructura α .

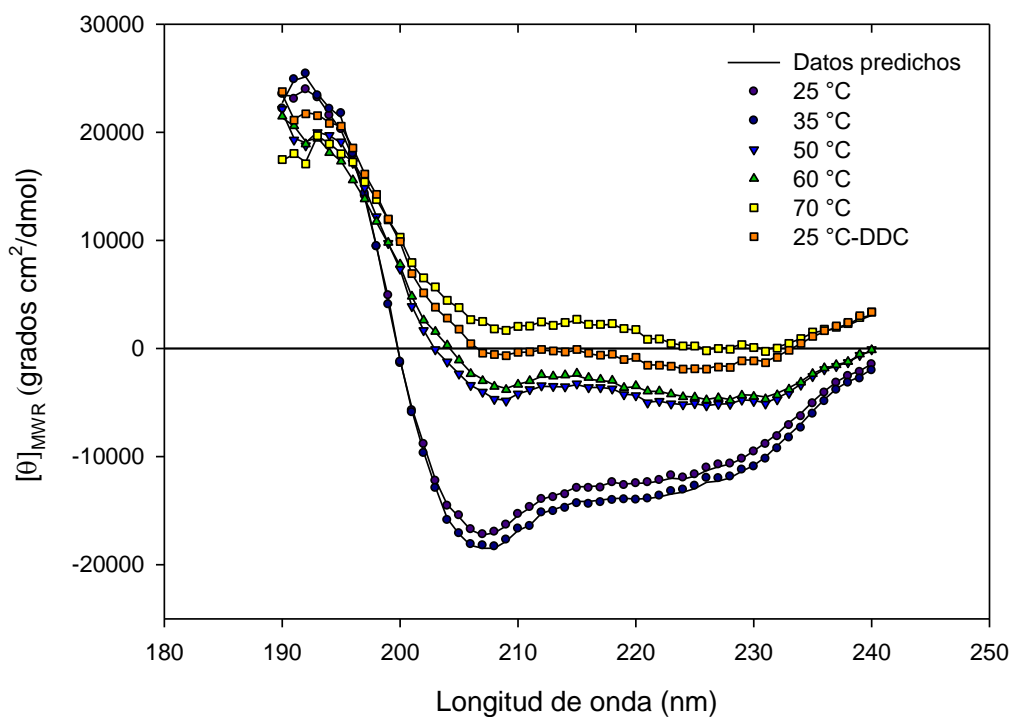


Figura 3. 5. Espectros de dicroísmo circular de la Hex de *L. lecanii* a diferentes temperaturas y pH 7.

La estimación de la estructura secundaria de la Hex a diferentes temperaturas manteniendo fijo el pH a 7, se presenta en la Tabla 3.3. No se observan los cambios en la estructura α a temperaturas entre 35 y 25 °C, pero a temperaturas mayores a 50 °C se pierde hasta el 88 % de la estructura α . Se observa que las estructuras β , y los giros no se vieron afectados a diferentes temperaturas.

Tabla 3. 3. Determinación en la composición de la estructura secundaria de la Hex de *L. lecanii* a diferentes temperaturas a pH 7.

Temperatura (°C)	Hélice α	β -paralela	β -antiparalela	Giros	Desordenada	Total	NRMSD
25	0.53	0.10	0.06	0.12	0.20	1	0.011
35	0.53	0.09	0.07	0.12	0.19	1	0.014
50	0.26	0.17	0.09	0.16	0.33	1	0.008
60	0.13	0.22	0.11	0.23	0.31	1	0.013
70	0.12	0.23	0.12	0.17	0.35	1	0.012
25-DDC	0.11	0.26	0.12	0.16	0.35	1	0.010

En cuanto al procedimiento 25 - DDC, se corroboró la pérdida de la estructura α , ya que se obtuvo un 11 % de dicha estructura, mientras que hay un 38% de estructuras β y el aumento de la estructura desordenada, de acuerdo a lo reportado por Wolz y Kulozik (2015), en donde demuestran que debido al proceso de desnaturalización térmica también se da el proceso de agregación de las proteínas, en este caso la Hex se ve afectada la estructura secundaria a temperaturas superiores a los 50 °C, dando lugar al aumento en la estructura desordenada.

3.3.3. Desnaturalización térmica

La figura 3.5A muestra la curva de transición térmica de Hex, donde se observa un decaimiento de elipticidad a partir de los 50°C, lo que implica un proceso de desnaturalización hasta los 70 °C, donde la elipticidad empezó a ser constante. La primera región ($\leq 50^\circ\text{C}$) hace referencia a la estructura nativa y la segunda ($\geq 70^\circ\text{C}$) representa la estructura desnaturalizada, según Tello-Solís y Hernández-Arana, (1995) este comportamiento es usual para un proceso de desplegamiento bajo control cinético.

Para determinar la reversibilidad y la fracción aparente (f_D) de la proteína desnaturalizada, se obtuvo la figura 3.5B, donde a partir de la intersección de las curvas, se determinó la temperatura 62.9°C que corresponden al punto de equilibrio entre la mitad de la fracción de la proteína desnaturalizada y la mitad de la fracción de la proteína de forma nativa, este gráfico es característico de un proteína de desnaturalización irreversible, de acuerdo con lo reportado por Poklar y Vesnaver, (2000) y Tello y Arrollo, (2002), la Hex presentó un estado de transición de forma irreversible (nativa \rightarrow desnaturalizada).

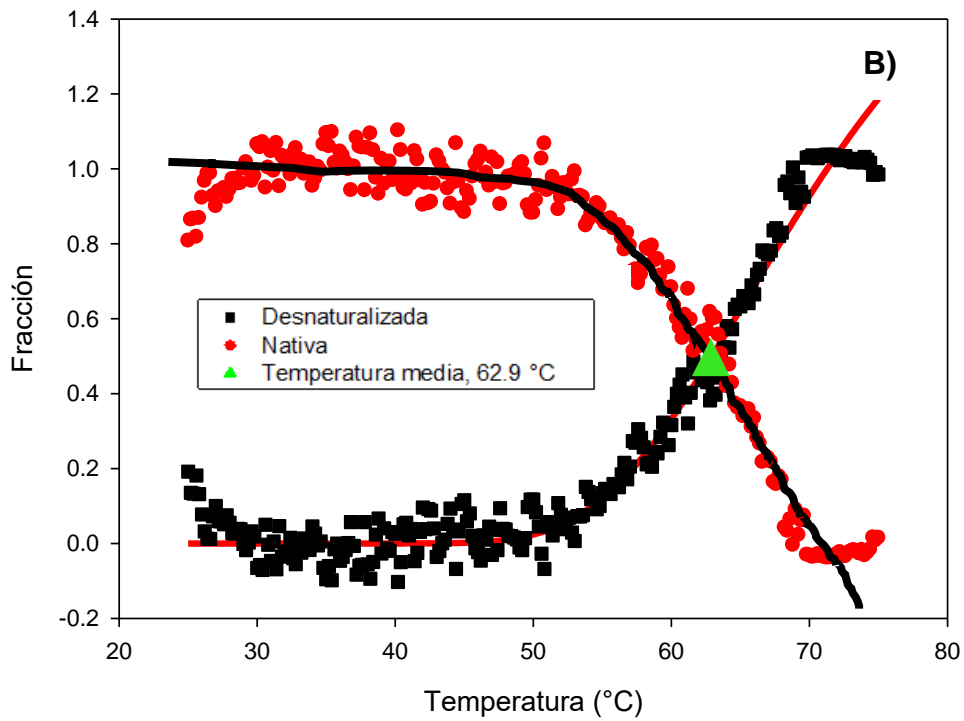
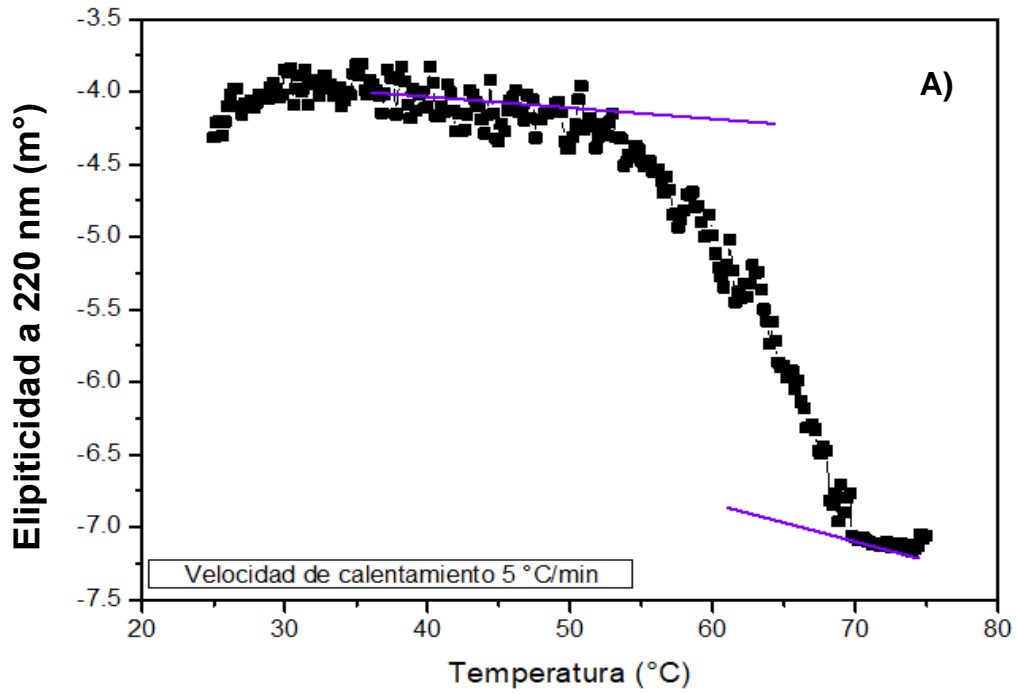


Figura 3. 6. (A) Curva de desnaturalización térmica (B) Curva de fracción nativa y desnaturalizada de la Hex de *L. lecanii* a 70 $^\circ C$, pH 7 y velocidad de calentamiento de 5 $^\circ C/min$.

3.4. Conclusiones

1. La estructura secundaria de Hex de *L. Lecanii*, se ve afectada estructural y funcionalmente a pH alcalinos y temperaturas mayores a los 50 °C.
2. La enzima no sufre cambios conformacionales considerables para realizar una actividad u otra ya que, son cambios locales en el sitio activo.

Capítulo 4

Purificación de una Hidrofobina de *Lecanicilium lecanii* en cultivo sumergido

4.1. Introducción

Las hidrofobinas (HFB), son otro tipo de proteínas que los hongos entomopatógenos requieren durante la patogénesis. Estas, son una gran familia de pequeñas proteínas (formada por aproximadamente 100 aminoácidos) producidas por hongos filamentosos que resultan necesarias para el crecimiento aéreo y la dispersión de esporas de dichos microorganismos, éstas poseen actividad biosurfactante, además están implicadas en los primeros pasos de la patogénesis fúngica que permiten la adhesión de esporas e hifas al huésped (Kulkarni *et al.*, 2017). Las HFB son proteínas globulares extracelulares, tienen masa molar entre 7 y 15 kDa y un diámetro entre 2 y 3 nm, las HFB son capaces de auto ensamblarse formando membranas anfipáticas, permitiéndoles interactuar con interfases y disminuir la tensión superficial.

Las HFB se dividen en dos clases con base en su secuencia de aminoácidos y a la solubilidad de los agregados que forman. Las hidrofobinas de clase I (HFB-I) y clase II (HFB-II) presentan modelos de hidropatía característicos y contienen ocho residuos de cisteína altamente conservados que forman puentes disulfuro intramoleculares (Linder, 2009).

La estructura de HFB-I no contiene hélices α , en su lugar, presenta un gran bucle desordenado y mayor cantidad de láminas β en la zona hidrofóbica que HFB-II, lo cual las hace más estables. Las HFB-II son producidas solamente por ascomicetos. La estructura de este tipo de hidrofobinas está formada por una hélice α y cuatro láminas β . Esas láminas β forman una estructura central de barril β que consta de dos bucles. La HFB-II forma agregados como agujas o fibrillas que se disocian muy fácilmente. La mayoría de los hongos secretan HFB de clase I en el medio de cultivo, sugiriendo que el descenso de la tensión superficial del agua por secreción de hidrofobinas es una condición general para iniciar el crecimiento aéreo (Kulkarni *et al.*, 2017).

La propiedad más característica de las HFB es su capacidad de adherirse espontáneamente a todo tipo de superficies por su capacidad de auto-ensamblarse en una membrana anfipática. Esto es debido a su estructura molecular bifuncional que contiene un lado hidrofílico y un lado hidrofóbico; por lo tanto, son capaces de adherirse en superficies hidrofílicas con su lado hidrófilo, así como en superficies hidrofóbicas con su lado hidrófobo. Ambas zonas influyen fuertemente en la energía superficial del sustrato inicial y pueden cambiar la humectabilidad de las superficies por su propiedad de auto-ensamblaje a interfases hidrofílicas-hidrofóbicas, como interfaces entre el agua y el aire, el agua y aceite y sustratos sólidos. (Opwis y Gutmann, 2011).

Las HFB-I se han utilizado en la rama de la medicina, debido a que forman estructuras muy estables y fuertes, pueden actuar como revestimiento de la superficie de biomateriales tales como materiales quirúrgicos e implantes médicos, también se pueden utilizar como surfactantes y emulsionantes en la elaboración de alimentos y recuperación de petróleo, ya que son capaces de formar películas en la interfase que estabilizan las emulsiones, también son capaces de interactuar con moléculas gaseosas hidrófobas como el CO₂ provocando *gushing* en bebidas carbonatadas. (Shokribousjein *et al.*, 2011; Rocha-Pino *et al.*, 2018).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Extracción de hidrofobinas

Las HFB-I se extrajeron del EC y de la biomasa. El EC se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, posteriormente el sobrenadante se sometió a electroburbujeo a 300 mA, Este líquido se centrifugó a 10000 rpm, a 4 °C durante 10 min; el precipitado se solubilizó en ácido trifluoroacético concentrado, el ácido se evaporó con una corriente de aire. Finalmente se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Por otro lado, la biomasa se resuspendió con una solución de Tris-HCl 100 mM pH 9 adicionado con SDS al 2% en agitación durante 2 horas, posteriormente se centrifugó esta solución a 10000 rpm por 15 min, el precipitado se lavó con agua desionizada hasta retirar el exceso de SDS. El precipitado se resuspendió en ácido fórmico concentrado y sonicado en un baño de hielo, durante 30 segundos, este paso se realizó tres veces, la solución se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Al sobrenadante se le adicionó agua desionizada en relación 1:1 (v/v), después se adicionó una solución fría de NaOH al 50% hasta llegar a un pH de 7, esta solución se almacenó a 4 °C durante 24 horas. Se centrifugó a 10000 rpm, 4 °C durante 15 min y el pellet se resuspendió en una solución de Tris-HCl 100 mM pH 9 para extraer las HFB por electroburbujeo a 300 mA, se detuvo el electroburbujeo hasta que no se produjera más espuma. Este líquido se centrifugó a 10000 rpm, a 4 °C durante 10 min; el precipitado se solubilizó en ácido trifluoroacético concentrado, el ácido se evaporó con una corriente de aire (Rocha-Pino *et al.*, 2015). Finalmente se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.2. Identificación de HFB

La HFB y la muestra después de electroburbujeo se sometieron a SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie G250. Se determinó el Rf de la HFB para conocer su peso molecular (Anexo 4). La banda se cortó con un bisturí estéril y se trató de acuerdo con la metodología por Shevchenko *et al.*, (2006), para su posterior análisis. La muestra se analizó mediante ESI-MS.

4.2.3. Determinación de la actividad superficial de las hidrofobinas por medición del ángulo de contacto

La actividad superficial de HFB se evaluó sobre una superficie hidrofóbica (teflón), el teflón se puso sobre una superficie plana, se enjuagó con agua desionizada y etanol y se dejó secando durante 16 horas. Sobre las superficies se colocaron 200 μL de una solución de HFB (50 μg proteína/mL), éstas se dejaron secar por 16 horas. La hidrofobicidad se determinó midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua (1 μL) sobre las superficies muestra, las imágenes se tomaron con un microscopio con procesador de imágenes y el ángulo de contacto se determinó con el programa ImageJ (versión 2.1) (Schneider *et al.*, 2012).

Se empleó la siguiente fórmula (ecuación 6) para determinar el ángulo de contacto

$$\theta = 2 \tan^{-1} \left(\frac{2h}{b} \right) \quad (6)$$

Donde θ es el ángulo de contacto, h es la altura de la gota y b es la longitud de contacto.

4.3. Resultados

Los rendimientos de $Y_{\text{HFB/Biomasa}}$ (%) se pueden observar en la Figura 4.1, encontrando un rendimiento 10 veces mayor de HFB-I (5.5 %), obtenida de la biomasa en comparación con el rendimiento del EC (0.5 %), porque, se ha reportado que las HFB tienen afinidad por el micelio, permitiendo que las hifas de los hongos puedan adherirse a diferentes superficies y por eso su presencia mayoritaria en la biomasa y no en el extracto crudo (Van Wetter *et al.*, 2000). En el presente estudio *L. lecanii* pudo producir las HFB-I para poder captar las burbujas de oxígeno presentes en el cultivo sumergido; se ha reportado, que su producción se afecta por el ambiente en que se desarrolla el hongo, tal como ocurre en los cultivos en estado sólido, en los que se ha reportado que existe un incremento de la producción de hidrofobinas debido a que estas intervienen en la adhesión del hongo al soporte (Rocha-Pino *et al.*, 2015).

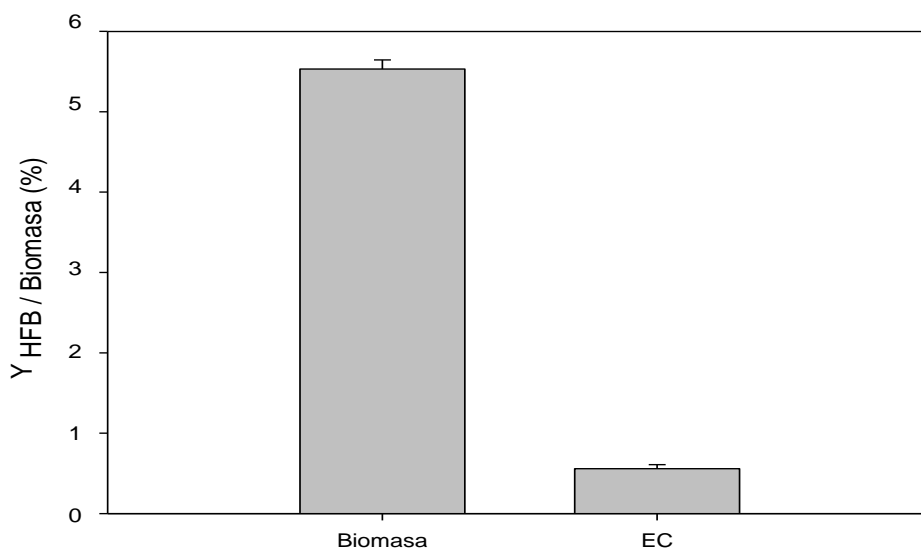


Figura 4. 1 Rendimiento de HFB extraída de la biomasa y del EC.

En la figura 4.2 se observa el electroforetograma, donde se analizó la muestra obtenida después de electroburbujeo (DEB) y posterior al tratamiento con ácido trifluoroacético. Se obtuvo una proteína de masa molecular de ≈ 12 kDa, HFB, que representa la hidrofobina, este resultado corresponde a las masas moleculares reportadas para las hidrofobinas de clase I, que van entre 8-15 kDa para los hongos ascomicetos (Kulkarni *et al.*,2017). Rocha-Pino *et al.* (2015), reporta una hidrofobina de clase I de *L. lecanii* de 12 kDa obtenida de la biomasa de un cultivo en estado sólido, donde la hidrofobicidad del soporte indujo la producción de HFB de diferente peso molecular, porque al utilizar espuma de poliuretano como soporte, *L. lecanii* produjo HFB-I para que el hongo pudiera adherirse al mismo.

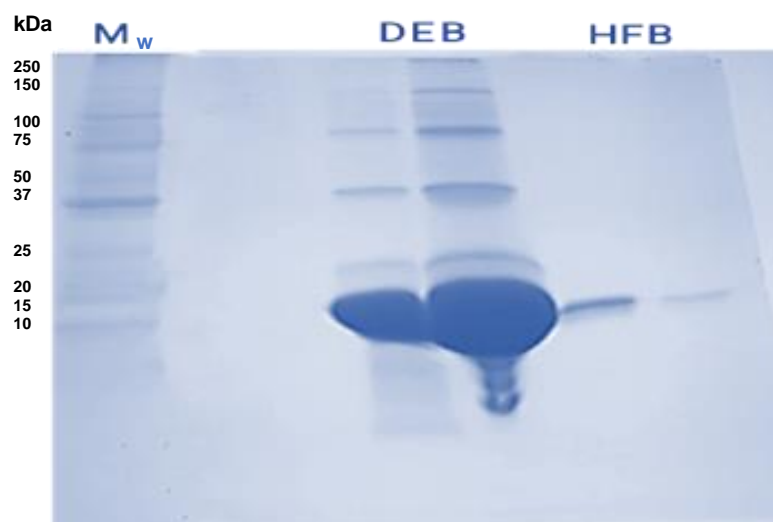


Figura 4. 2. Electroforetograma de los pasos de purificación M(marcador), DEB (Después de electroburbujeo).

Al realizar las pruebas de medición de ángulo de contacto sobre las superficies de teflón y vidrio (Figura 4.3), se pudo observar que las superficies tratadas con hidrofobinas a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lograron reducir el 46% del ángulo de contacto en la superficie de teflón. También se observó que la HFB fue capaz de modificar una superficie hidrofílica (el vidrio), teniendo un ángulo de 17.4° en el control, después de tratar el vidrio con hidrofobina, se obtuvo un ángulo de 31.8°

(Tabla 4.1). Estos resultados son similares con lo encontrado por Rocha-Pino *et al.* (2018), donde se trató la superficie de teflón con una concentración de hidrofobinas de 50 µg/mL obteniendo reducción en el ángulo de contacto de 50%, esto reafirma la presencia, obtención y funcionalidad de la HFB-I de este estudio.

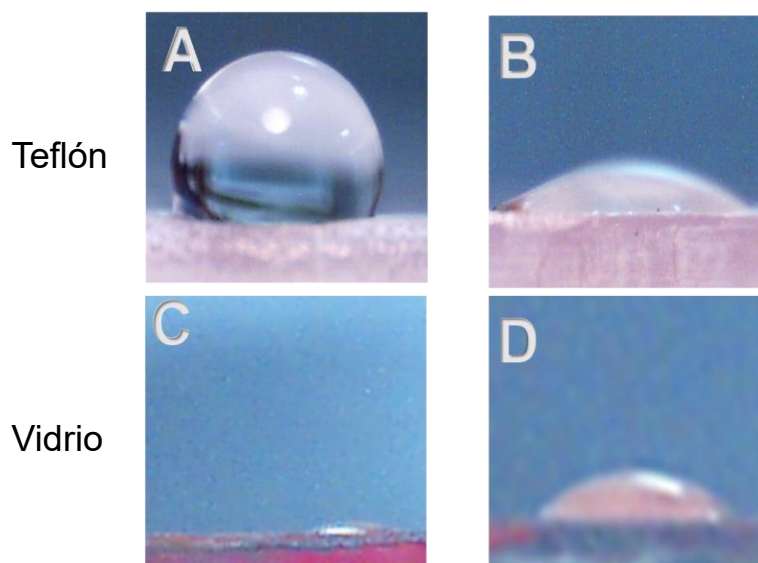


Figura 4. 3. Actividad superficial de HFB sobre vidrio y teflón. A) Control-teflón, B) HFB-teflón, C) Control-vidrio y D) HFB-vidrio.

Tabla 4. 1 Determinación del ángulo de contacto de HFB.

Muestra	Φ (°) en Vidrio	Φ (°) en Teflón
Control	17.4 ± 3.1 ^b	132.4 ± 4.1 ^a
HFB	31.8 ± 3.7 ^a	61.7 ± 3.7 ^b

Letras diferentes indican significancia ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey.

4.3.1. Identificación de HFB

Al identificar y secuenciar las masas monoisotópicas obtenidas del ESI-MS de la HFB de *L. lecanii* (Tabla 4.2) se encontraron péptidos idénticos a la HFB de *Neosartorya fumigata* denominada ASPFU, los péptidos marcados en negrita son los péptidos de HFB de *L. lecanii* que mostraron similitud en la secuencia de ASPFU (Tabla 4.3). Estos datos representan el 22% de la cobertura de la secuencia proteica de ASPFU, Los péptidos de la HFB identificados en ASPFU con masa monoisotópica de 250.1 y 1269.5 concuerdan con lo reportado, en donde se ha establecido que las hidrofobinas son proteínas que presentan regiones conservadas con cisteína distribuidas en la secuencia (Kulkarni, Nene y Joshi, 2017 y Vereman *et al.*, 2019).

Tabla 4. 2. Relación m/z monoisotópica de la HFB de *L. lecanii* obtenidas del ESI-MS

Relación m/z monoisotópica		
Experimental	Teórica	Secuencia
250.1	250.1	CK
576.3	576.2	QATEK
630.3	630.3	GNANVR
1130.6	1130.6	FPVPDDITVK
1269.5	1269.5	CGDQAQLSCCNK

Tabla 4. 3. Secuencia de aminoácidos de ASPFU, las letras marcadas en negrita son los péptidos de HFB que muestran identidad con la secuencia de ASPFU

1	MKFSLSAAVL	AFAVSVAALP	QHDVNAAGNG	VGNK GNANVR	FPVPDDITVK
51	QATEKCGDQA	QLSCCNKATY	AGDVTDIDEG	ILAGTLKNLI	GGGSGTEGLG
101	LFNQCSKLDL	QIPVIGIPIQ	ALVNQK CKQN	IACCQNPSD	ASGSLIGLGL
151	PCIALGSIL				

4.4. Conclusiones

1. Se logró purificar una hidrofobina a partir de la biomasa del cultivo sumergido de *L. lecanii*, con masa molecular de ≈ 12 kDa, también fue capaz de modificar una superficie hidrofóbica a hidrofílica y viceversa.
2. De la hidrofobina obtenida de la biomasa se logró identificar y secuenciar sus péptidos, que presentaron identidad en su secuencia de aminoácidos en 22% con la hidrofobina de *Neosartorya fumigata*.

5. Conclusiones generales

1. Se purificaron e identificaron la Hex (50 kDa) y una HFB (12 kDa) a partir de cultivo sumergido de *L. lecanii* presentando similitudes con *R. oligosporus* y *N. fumigata* respectivamente.
2. Las condiciones óptimas de Hex para la hidrólisis es de pH 6 y 37 °C en tanto que la TGA es favorecida a pH alcalino pero siendo la ideal a pH 7 y temperaturas menores a 50 °C.
3. La TGA de Hex produce oligosacáridos con DP entre 2 a 3 con sustratos acetilados y DP de 6 con desacetilados.
4. El DC corroboró que la Hex no sufre cambios conformacionales considerables para llevar acabo TGA o hidrólisis.

6. Perspectivas

1. Purificar otras enzimas producidas en el cultivo sumergido, como lipasas y endoquitinasas.
2. Purificar y caracterizar las hidrofobinas de clase II.
3. Evaluar los oligosacáridos producidos por Hex a partir de la TGA, para el campo biomédico.
4. Realizar estudios en la modificación de los aminoácidos (ácidos aspártico y glutámico) del sitio activo para favorecer la TGA.
5. Evaluar a Hex a diferentes velocidades de calentamiento para determinar si el proceso de desnaturalización se lleva a cabo bajo un control cinético.
6. Estudio de la desnaturalización térmica de la Hex por dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, para determinar el mecanismo de despegamiento de Hex y poder establecer la presencia de un intermediario y de dominios termodinámica.

7. Trabajos presentados y publicaciones

7.1 Trabajos presentados

- Conferencista en el IV Congreso Internacional de Biotecnología con el tema **“Obtención de enzimas quitinolíticas”** Puebla, México (2017).
- Ponente en el cartel: **“Producción de oligosacáridos empleando actividad de transglicosilación de las β -N-acetilhexosaminidasas”** en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en Puerto Vallarta, Jalisco, México (2017).
- Ponente en el cartel: **“Characterization of Transglycosylation Activity of β -N-Acetylhexosaminidases from *Lecanicillium lecanii*”** en el Simposio Internacional: Environmental metarhizium biotechnology. Guanajuato, Guanajuato, Mexico (2017).
- Conferencista en **“Purification of β -N-acetylhexosaminidase of *Lecanicillium lecanii* and its application in the oligosaccharides production”** XXIV Conference of Polish Chitin Society, New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives. Tynieć, Polonia (2018).
- Ponente en el cartel: **“Caracterización de la actividad de transglicosilación de β -acetilhexosaminidasas sobre oligosacáridos de quitina con diferente grado de polimerización y acetilación”** en el en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en Leon, Guanajuato, México (2019).
- Ponente en el cartel: **“Producción y purificación de una hidrofobina de *Lecanicillium Lecanii* en cultivo sumergido** en el 8 simposio: Perspectivas en Biotecnología, Ciudad de Mexico (2019).
- Ponente con el cartel **"Hex from *Lecanicillium lecanii* Produced Chitinoligosaccharides with Specific Degree of Polymerization "**, TERMIS- AM ANNUAL CONFERENCE AND EXHIBITION, Orlando, Florida, Estados Unidos de América (2019).

7.2 Estancias

Estancia de Investigación en la Universidad Claude Bernard LYON 1- Laboratorio de Ingeniería de materiales poliméricos (IMP) en Lyon, Francia en Septiembre-Diciembre 2018. Caracterización de la actividad de transglicosilación de Hex en oligosacáridos de quitina con diferentes grados de polimerización y acetilación.

7.3 Publicaciones

Rojas-Osnaya, J., Rocha-Pino, Z., Nájera, H., González-Márquez, H., & Shirai, K. (2020). Novel transglycosylation activity of β -N-acetylglucosaminidase of *Lecanicillium lecanii* produced by submerged culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 759-767.



Novel transglycosylation activity of β -*N*-acetylglucosaminidase of *Lecanicillium lecanii* produced by submerged culture

Jesús Rojas-Osnaya^a, Zaizy Rocha-Pino^a, Hugo Nájera^b, Humberto González-Márquez^a, Keiko Shirai^{a,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Biotechnology Department, Laboratory of Biopolymers and Pilot Plant of Bioprocessing of Agro-Industrial and Food By-Products, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Iztapalapa, 09340 Mexico City, Mexico

^b Universidad Autónoma Metropolitana, Natural Sciences Department, Av. Vasco de Quiroga 4871, Col. Santa Fe, Cuajimalpa, 05348 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2019

Received in revised form 26 December 2019

Accepted 26 December 2019

Available online 28 December 2019

Keywords:

Transglycosylation

N-acetylglucosaminidase

Lecanicillium lecanii

ABSTRACT

N-acetylglucosaminidase produced from *Lecanicillium lecanii* on submerged culture displayed hydrolytic and transglycosylation activities. The highest specific activity for the enzyme was 1.87 U/mg after 120 h of culture. The chromatographic purification for a single protein fraction showed a molecular weight of 50.4 kDa and hydrolytic *N*-acetylglucosaminidase activity of 17.59 U/mg at 37 °C and pH 6. This enzyme was able to transglycosylate and to synthesize oligosaccharides from 2 to 6 units with a degree of acetylation between 100 and 26% employing glucose, mannose, *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *N*-acetyl-*D*-lactosamine as donor substrates. Optimal conditions of temperature and pH were determined for both types of enzymatic activities.

1. Introduction

Chitin is an abundant biopolymer in nature, which is composed by *D*-glucosamine and *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) units with β -1,4-glycosidic bonds. This biopolymer is a structural component in the cell wall of fungi, crustacean and insect exoskeletons [1]. Chitinolytic enzymes hydrolyze chitin and are classified in chitinases and β -*N*-acetylglucosaminidases (Hex). The chitinases display endochitinase activity (EC 3.2.1.14) that randomly cleave the chitin chain, and exochitinase (EC 3.2.1.14) at the non-reducing chain ends, thus releasing *N*, *N'*-diacetyl-glucosamine (chitobiose). On the other hand the exo-type β -*N*-acetylglucosaminidase, chitobiase and Hex (EC 3.2.1.52), splits non-reducing GlcNAc residues from oligosaccharides releasing GlcNAc and they also can hydrolyze chitobiose to GlcNAc [2]. These enzymes are present in many organisms, such as the filamentous fungi, which produce chitinases for their physiological functions related to growth and nutrition. Additionally, the chitinolytic enzymes play an important role in antagonism of chitinous organisms [2,3]. Among the studied fungi to produce these enzymes, *Lecanicillium lecanii* has proven high efficacy as chitinase producer for chitin assimilation when it was added as the sole carbon source during growth in solid-state and submerged cultures [4]. The crude enzyme from *L. lecanii* submerged culture with chitin medium contains chitinases and Hex [5], which are successfully applied for the production of chitin oligosaccharides from ultrasonicated, steam-exploded and compressed fluid pre-treated chitins [6,7].

Noteworthy, the oligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis have advantages over chemical or physical depolymerizations, aiming to the best control of the hydrolytic reaction in an environmentally friendly process [8]. The non-enzymatic routes to oligosaccharides render mixtures of heterogeneous molar mass distributions which challenges the identification of which oligosaccharide has the targeted bioactivity. Other key aspects to take into account in the chitin oligosaccharides are the degrees of acetylation (DA), polymerization (DP) and the *N*-acetylation patterns. These with high DAs display specific biological activities such as anti-angiogenic [9]. Other works established that chitin oligosaccharides with three to five DP and 100% DA are biological signals to activate the mechanism of protection and induction to the formation of nodules in plants [10]. On the other hand, deacetylated and re-acetylated hexamers induce the release of interleukin-8, which is an activator of polymorphonuclear cells [1]. Chitosan and chitin oligosaccharides with DP of 2 to 8 have anti-tumor and anti-inflammatory properties as they are able to induce apoptosis and to inhibit the cyclooxygenase activity, thereby stimulating the production of prostaglandins [11]. Last but not least, the oligosaccharides with less than ten monomers are readily soluble in water which enhances their bioactivity compared to their biopolymer precursors [8].

However, despite the advantages of the enzymatic approaches for bioactive oligosaccharides production, currently, the commercialization is shackled by chemical routes. Another area of opportunity is the use of the chitinases for transglycosylation (TG) by transferring an oligosaccharide to a suitable acceptor to form a new glycosidic bond. The tailor-made oligosaccharides with a specific DA and DP are synthesized with key characteristics for further biological applications [12,13]. In spite of several advantages of the synthesis of oligosaccharides via

* Corresponding author.

E-mail address: sml@xanum.uam.mx (K. Shirai).

enzymatic reaction, such as the control of the molecular weight distributions and DA, there are scarce reports of fungal chitinolytic enzymes with TG activity (TGA). TGA was discussed by Zhang et al. as plausible explanation of the dual nature of two chitinases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* with *exo*- and *endo*chitinase activities based on the reaction products [14]. Therefore, this study is first to report to the best of our knowledge the production, purification, and characterization of a Hex from *L. lecanii* with TGA. Furthermore, the conditions for the synthesis of chitin oligosaccharides and hydrolytic activities are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture medium

Lecanicillium lecanii strain ATCC 26854 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 28 °C. A spore suspension from cultures in PDA was obtained by mechanical agitation with a solution of Tween 80 (0.01% w/v). The submerged culture was carried out in a 3 L bioreactor (Applikon BV, Netherlands) using modified Czapeck culture medium at pH 6, inoculated with 10⁷ spores/mL, 100 rpm of agitation, 1 vvm of aeration, and incubated at 25 °C for 144 h. Composition of modified Czapeck culture medium was (g/L): colloidal raw chitin with 10% of residual protein (10), NaNO₃ (3.73), Na₂HPO₄ (3.0), MgSO₄ (0.5), KCl (0.5), and FeSO₄ (0.096). Samples of 50 mL were taken every 24 h from submerged culture. Then, the biomass and crude enzyme (CE) were separated by centrifugation at 8000 rpm at 4 °C for 10 min (Thermo Scientific, Legend XTR, Waltham, Massachusetts, USA).

2.2. Hydrolytic activity and protein content

Hex activity and protein soluble concentration were determined in CE. Hex activity was carried out as followed: 200 µL of CE added to 200 µL of 0.2 M citrate/phosphate buffer pH 5.6, and 200 µL of *p*-nitrophenyl-β-*N*-acetylglucosamine used as the substrate. An enzymatic unit was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol of *p*-nitrophenol per minute [15]. The protein soluble was determined by the Lowry method modified by Peterson [16].

2.3. SDS-PAGE and zymograms

CE and protein fractions obtained from each step of purification were subjected to electrophoresis analysis with one-dimensional acrylamide gels under denaturing conditions (SDS-PAGE). A broad range SDS-PAGE molecular weight (M_w) standards was used as a reference, and gels stained by silver staining kit (Bio-Rad, Hercules USA). Gels were analyzed with the ImageJ 1.41o software (National Institutes of Health, USA). Zymograms were performed with acrylamide gels with added 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl-glucosaminide as a substrate and sampled under a non-denaturing condition to determine the chitinolytic activity of each step of purification. Enzymatic activity was visualized as fluorescent zones within a dark homogeneous background under ultraviolet illumination (Bio-rad, UV Transilluminator 2000) [15].

2.4. Enzymatic purification

CE was precipitated by adding ammonium sulfate at 60% saturation and subsequently centrifuged at 14,000 rpm, 4 °C for 45 min. The pellet was solubilized in 0.05 M Tris-HCl buffer with added 0.15 M NaCl at pH 7.8. Then, the soluble fraction was loaded into a molecular size exclusion column (SEC) HiPrepTM 26/60 Sephacryl™ S-100 (GE Healthcare, Chicago, Illinois USA) and elution was carried out under an isocratic flow of 1.3 mL/min with the same buffer [6]. Fractions with the highest hydrolytic Hex activity from SEC were subjected to an exchange of buffer to Tris-HCl 30 mM pH 7.8 using a 10 kDa membrane (Amicon, Dublin Ireland), then it was injected into an anionic

exchange column (AEC) DEAE Sepharose (Bio-Rad). The elution was carried out with a buffer of Tris-HCl 30 mM pH 7.8 with added NaCl 1 M in a gradient from 0 to 100%. Moreover, chromatography was performed in an FPLC (AKTA, GE Healthcare, Stockholm Sweden). Additionally, fractions of each purification step were analyzed by hydrolytic Hex activity assay, determination of M_w, and zymogram (Sections 2.2 and 2.3), and soluble protein content by Bradford method [17].

2.5. Characterization of the Hex

2.5.1. Determination of optimal pH and temperature of hydrolytic activity

The purified enzymatic fraction was characterized to determine an optimal pH at range from 4 to 11 and temperature of Hex activity from 7 to 37 °C. The hydrolytic activities were tested according to Section 2.2.

2.5.2. Determination of optimal pH and temperature of TGA

TGA determination was carried out by using 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl-glucosaminide as acceptor substrate and *N*-acetyl-*D*-Lactosamine (NaLac), mannose (Man), glucose (Glu) or GlcNAc as a donor substrate. 50 µL of the enzyme (concentration 50 µg/mL) was added to 50 µL of 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl-glucosaminide (1 mM), and 50 µL of a donor substrate (0.4 mM) in 50 µL citrate/phosphate buffer 0.2 M in a range of pH from 4 to 11 at 37 °C. After aliquots of 10 µL were taken at defined times (0.3, 0.6, 1 and 1.3 h), 200 µL of glycine buffer (150 mM) at pH 10.5 was added. Fluorescence was determined using an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 460 nm in a multimode micro-plate reader (Tecan M1000 PRO, Männedorf Switzerland) [12].

The rate of increase in fluorescence through time when products of TGA were at low concentrations at time near zero was defined as the initial velocity (V_0). V_0 was estimated by linear regression as the slope of the curve considering that the reverse reaction was insignificant for each pH, reaction temperature, and glycosyl donor.

The maximum production of fluorescence (FU_{max}) was estimated by adjusting TGA data with the Gompertz model (Eq. 1) with the donor substrates.

$$FU = FU_{max} \exp(-b \exp^{-kt}) \quad (1)$$

where FU is Fluorescence units in time ($t \rightarrow \infty$); k is the reaction rate (h^{-1}); b is a non-biological parameter related to the initial conditions of reaction (when $t = 0$, then $X = FU_{max}$). The yields of TGA (FU/mol) were calculated from the estimated FU_{max} and the concentration of the glycosyl acceptor.

The determination of the activation energies (E_a) of TGA of the purified enzyme with the glycosyl donors NaLac and GlcNAc were estimated by the Arrhenius equation (Eq. 2) using V_0 .

$$V_0 = A \exp \frac{E_a}{RT} \quad (2)$$

where A is a frequency factor; R is the gas constant, 8.3145 kJ⁻¹ mol⁻¹; T is the absolute temperature in Kelvin.

2.6. Characterization of chitin oligosaccharides

2.6.1. Thin-layer chromatography (TLC)

The products obtained from the TGA were analyzed by a thin layer chromatography using a silica gel plate (Merck HX745188, USA) and a mobile phase of methanol/water (7:5). Spots were developed by applying a solution of silver nitrate (3 g) and acetone (500 mL), and then it was dried at room temperature, and a solution of 50 mL of NaOH 10 N in 450 mL of ethanol added [18].

Table 1
Typical purification stepwise of Hex from *L. lecanii* produced in submerged culture at pH 6 and 25 °C.

Purification step	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
CE	1600	158.73 ± 0.001	272.55 ± 0.003	1.71 ± 0.03	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ salting out	50	19.50 ± 0.004	235.81 ± 0.001	12.09 ± 0.4	7.1	86.51
Sephacryl S-100 SEC	20	13.04 ± 0.002	171.40 ± 0.1	54.29 ± 1	31.7	62.88
DEAE-Sephacrose AEC	7	7.91 ± 0.0004	107.67 ± 0.009	82.30 ± 2.6	48.12	39.50

2.6.2. MALDI-TOF analysis of the products obtained by TGA

TGA products obtained with different donor substrates, pH (6–8) and reaction times (1.3 and 96 h) were analyzed by MALDI-TOF. 5 µL of TGA products were mixed with 5 µL of methanol/water (1:1% v/v), then 0.5 µL of this solution was mixed with 2 µL of the matrix (sinapinic acid 25 g/L in acetonitrile with 0.1% v/v trifluoroacetic acid). Spectra were obtained using a MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems 4800 plus Analyzer, Ontario Canada) equipped with a laser from 35 nm to 355 nm, and the analysis was carried out at 6500 mV in reflection mode [6]. Data of mass/charge (*m/z*) and intensity ion were used to determine the degree of polymerization (DP) and acetylation (DA), respectively. DA was calculated with Eq. 3.

$$DA(\%) = \left(\frac{\sum_i DA_{th}(\%) \times (I)}{\sum_i I} \right) \quad (3)$$

where DA (%) is the average percentage of acetylation of the products obtained; DA_{th} (%) is the theoretical DA value deduced from the

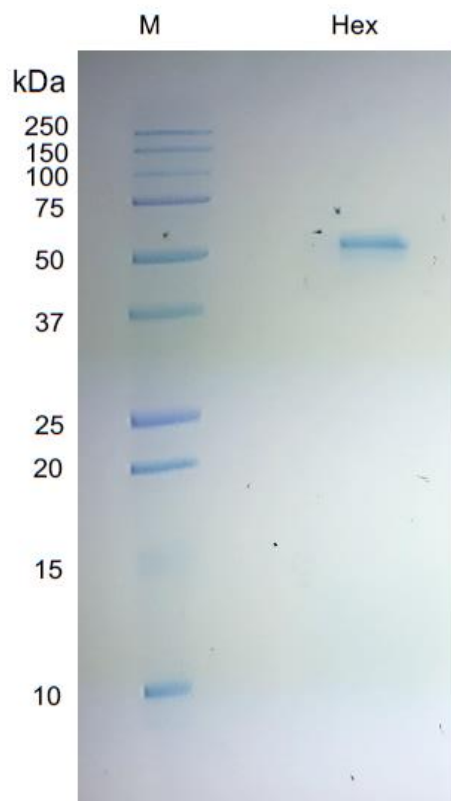


Fig. 1. SDS-PAGE electrophoresis of purified Hex from *L. lecanii* by elution in DEAE Sepharose through anionic exchange chromatography and protein marker (M).

$D \times A_y$ structure (D, for GlcN, and A, for GlcNAc) of the corresponding oligomer determined by MALDI-TOF, and *I* is ion intensity [19].

3. Results and discussion

3.1. Production and purification of Hex

L. lecanii was able to produce Hex after 72 h in a submerged culture with added chitin as sole carbon source. The maximum specific Hex activity was determined at 120 h of culture (1.87 U/mg) without significant differences compared to that at 144 h (1.71 U/mg) (Supplementary data 1). The nitrogen source in a culture media plays a relevant role in chitinases production as reported by Kumar et al. [20] using ammonium chloride and yeast extract to favor the production of chitinases by the thermophilic fungus *Humicola grisea* in submerged culture. However, the present study demonstrates that NaNO₃ and unpurified chitin as nitrogen sources sustain the fungal growth.

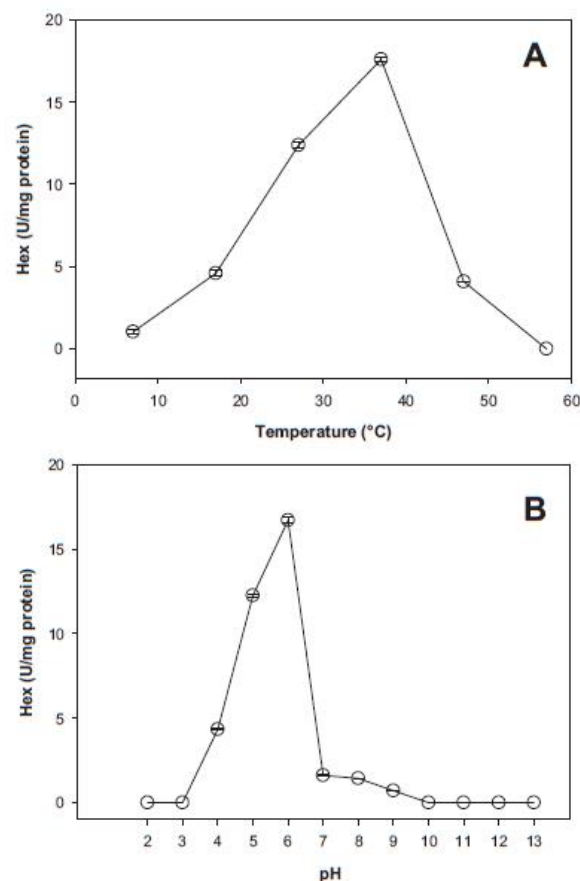


Fig. 2. Effect of temperature (A) and pH (B) of hydrolytic specific activity of purified Hex from *L. lecanii*.

According to a previous work [7], the content of residual protein in unpurified chitin (15%) favored the production of neutral protease activity in a *L. lecanii* submerged culture, which in turn reduced the Hex activity. However, it is worth to note that the unpurified chitin in this study presented residual protein (10%), which affected the production of proteases as they were not detected throughout the fermentation. This was beneficial for chitinases production because it did not reduce the Hex activity (Supplementary data 1), and also this aided further purification.

Table 1 summarizes the purification steps for Hex, where salt saturation of 60% was enough to precipitate almost all Hex in CE, with 86.5% recovery, while the remaining enzyme (ca.15%) was precipitated up to 90% of saturation. The salting out in ammonium sulfate with saturation of 80% has been reported for chitinases purification from crude enzyme of *L. muscarium* as a preliminary fractionation to remove some contaminants, such as polysaccharides [21]. A 60% salt concentration instead of 90% remitted the possible interferences caused by strong or irreversible interactions during precipitation, which reduces costs. Later on, SEC gave the presence of a single peak with Hex activity, which was assigned to the fractions 17 to 20. The enzyme recovery was 62.9%, thus the specific activity increased 5-fold (Table 1). According to the electrophoretic analysis, SEC fractions with Hex activities showed M_w of 25.2, 34.5, 50.4 and 72.3 kDa (Supplementary data 2). In previous works, Rocha-Pino et al. [5] reported that *L. lecanii* in a submerged culture with added chitin (30 g/L) produced β -N-acetylglucosaminidases with M_w of 61, 80, 96 and 111 kDa. As well, Villa-Lerma et al. [6] reported two bands with 38 kDa and 50 kDa after SEC of crude enzyme of *L. lecanii* in submerged culture. In another related study, a chitinolytic enzymatic complex of *L. muscarium* strain CCFFEE 5003 was comprised of at least seven enzymes, two of these chitinases presented β -N-acetylglucosaminidase activities and they were identified as CHI1 and CHI2 with M_w of 61 and 25 kDa, respectively [21].

Several extracellular chitinases have been isolated such as that of *Aspergillus griseoaurantiacus* produced in solid state fermentation [22] or the isoforms of *endo*- β -N-acetylglucosaminidase, which were isolated from fruiting bodies of the basidiomycete *Flammulina velutipes* employing five-steps of purification [23]. While for intracellular chitinases of *Mucor circinelloides*, a suitable detergent extraction

required only two purification steps [24]. In this work, *L. lecanii* produced extracellular chitinases, which were isolated in a three-step purification process. The purification factor and recovery of Hex in fractions 14 to 19 obtained by AEC were 48.1 and 39.5%, respectively, with a total specific activity of 82.3 U/mg (Table 1). Hex activities in these fractions were confirmed in zymograms (Supplementary data 3). The purification procedure was successfully carried out since AEC led to the isolation of a single protein band of 50.4 kDa (Fig. 1).

3.2. Determination of optimal temperature and pH for hydrolytic activity

L. lecanii is adapted for growing at low temperatures (0 °C), and therefore, its enzymes are cold-resisting. A similar fungus, the *L. muscarium* (formerly *Verticillium lecanii*) isolated in Continental Antarctica by Barghini et al. [21] produced two N-acetyl-hexosaminidases, CHI1 and CHI2 displaying their highest activity at 45 °C and 40 °C, respectively. However, at 5 °C, the latter remained 35% active and the former maintained 50% of Hex activity. In the present study, the strain produced a hydrolytic Hex with a maximum activity at 37 °C (17.59 U/mg). At 17 °C the activity was reduced to 70%, whereas above 47 °C had low hydrolytic activity (Fig. 2A).

The pH 6 rendered the maximum hydrolytic activity (16.71 U/mg), while the Hex activities were reduced to 25.9 and 73.3% for pH 4 and 5, respectively. There was a steep decline of activity followed by the shift from 6 to 7, and no hydrolytic activity above pH 9 (Fig. 2B). This indicates that basic pH had less influence in the activity, which might be attributed to the ionic changes of amino acids in the enzyme active site, thereby disrupting the enzyme-substrate complex [25]. Nguyen et al. [26] reported similar results as they obtained the highest relative chitinase activity of a purified enzyme from *L. lecanii* at pH 6, while an increase in pH up to 7.5 reduced the relative hydrolytic activities. The entomopathogenic fungi usually produced chitinolytic enzymes with high activity at the pH of the infection site in insects, which is between 6 and 8. However, there are other chitinases with optimal activity with pH 3 or 5 [26–29]. In this regard, Barghini and co-workers [21] reported CHI1 and CHI2 chitinases from *L. muscarium* with N-acetylhexosaminidase activities at pH 5.5 and 4.5, respectively.

Table 2

Degrees of polymerization (DP) and acetylation (DA) of chitin oligosaccharides obtained by TGA of Hex from *L. lecanii* at 37 °C with the estimated maximum fluorescence production (FU_{max}) and yield.

Time of reaction (h)	Donor substrate	pH of reaction	DA (%)	DP (units)	FU_{max}^a (FU)	Significance level ^a	Yield of TGA ^b (FU/mol)
13	Glu	6	58.25	4–6	1090.29	0.000	21.81
		7	52.50		1378.21	0.000	27.56
		8	54.39		1347.30	0.009	26.95
	Man	6	56.96	3–5	961.90	0.0000	19.24
		7	60.36		1411.66	0.000	28.23
		8	57.92		1048.88	0.000	20.98
	NaLac	6	66.86	4–5	269.70	0.0000	5.39
		7	67.40		1211.63	0.000	24.23
		8	68.27		360.80	0.0000	7.22
	GlcNAc	6	100.00	2–4	644.81	0.0000	12.90
		7	100.00		1414.53	0.002	28.29
		8	100.00		717.45	0.0000	14.35
96	Glu	6	21.32	4–6	5426.05	0.000	108.52
		7	26.05		24,366.12	0.00	487.32
		8	25.90		11,177.18	0.00	223.54
	Man	6	36.04	3–5	3980.75	0.000	79.62
		7	50.09		1910.79	0.00	238.22
		8	50.44		8491.67	0.000	169.83
96	NaLac	6	68.59	4–5	7483.49	0.000	149.67
		7	70.98		0912.30	0.00	418.25
		8	69.86		1321.98	0.00	226.44
	GlcNAc	6	100.00	2–4	2821.20	0.00	256.42
		7	100.00		8427.46	0.00	368.55
		8	100.00		3435.59	0.00	268.71

^a FU_{max} was estimated by the Gompertz model ($R^2 > 0.95$) from the experimental data (FU) at different pH of reaction and glycosyl donors.

^b Yields of TGA was calculated from the FU_{max} and the concentration of the glycosyl acceptor.

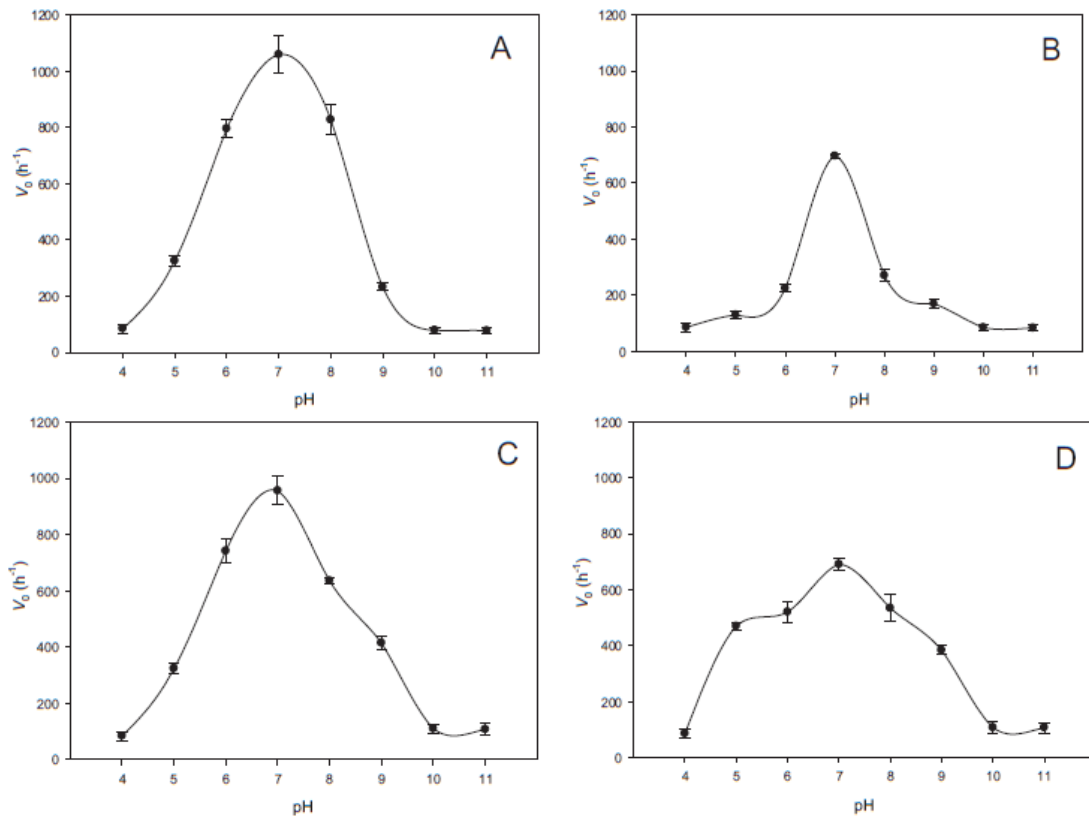


Fig. 3. Effect of pH on initial reaction velocity of TGA of Hex from *L. lecanii* using donor substrates: A) Man, B) GlcNAc, C) NaLac and D) Glu.

3.3. Effect of pH on TGA

According to Kohri and co-workers [25], the Hex from *Bacillus circulans* lost its hydrolytic activity because the glutamic or aspartic acid was deprotonated under basic conditions (pH 8 to 11), concomitantly, they were enabled as an acid catalyst. Herein, the neutral pH increased TGA that suggests a high sensibility of the enzyme to ionization when pH increased to 7. This inhibited the hydrolytic activity (optimal pH 6), and it promoted TGAs with all donor substrates tested between pH 6 and 8 (Table 2). On the other hand, the Hex presented low V_0 at pH 4 and 5, whereas from 10 to 12 the activity was significantly reduced (Fig. 3, Supplementary data 4). FU_{max} estimated by the Gompertz model from FU data pointed out the highest at pH 7 with 1378.21, 1211.63, 1411.66 and 1414.53 FU for Glu, NaLac, Man, and GlcNAc, respectively. Comparatively to pH 7, the FU_{max} at pH 6 for Glu, Man, NaLac, and GlcNAc substrates decreased 21%, 32%, 78% and 54%, respectively. Similarly at pH 8, TGAs were reduced with Glu, Man, NaLac, and GlcNAc 2%, 26%, 70% and 49%, respectively (Table 2). TGA increased with the reaction time of 120 h. The time courses production of FU by TGA reached the plateau after 72 h, indicating a plausible by-product inhibition on the enzyme active site [30,31] (Supplementary data 5). At pH 7 and 96 h, FU_{max} s were higher in 94%, 88%, 94% and 92% at pH 7 for Glu, NaLac, Man, and GlcNAc, respectively, than those estimated at 1.3 h (Table 2).

The TGA yields considering the FU_{max} and the amount of glycosyl acceptor are presented in Table 2. The highest yield was determined with Glu followed by NaLac and GlcNAc at pH 7 and 96 h, whereas the lowest was for Man. According to the study carried out by Tomabechi and co-

workers [32], the primary and secondary hydroxyl groups of the carbohydrate of the 1,3-diol structure were essential for recognition signal of the TGA of *Mucor hiemalis* Endo- β -N-acetylglucosaminidase and it also required an equatorial C-4 hydroxyl group for transglycosylate.

TGA occurred when the oxygen of glycosidic bond becomes protonated by the carboxylic acid of an aspartic acid, which promoted the formation of oxazolium by nucleophilic reaction with the carbonyl of the

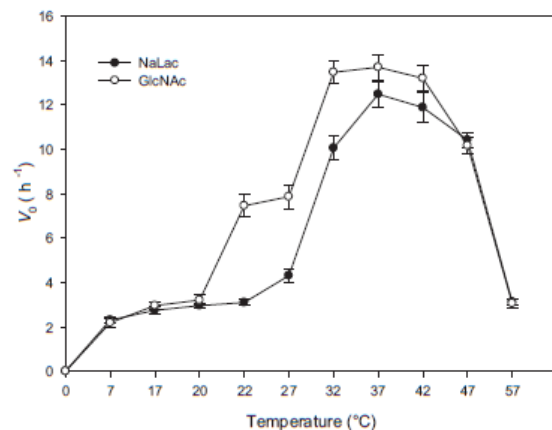
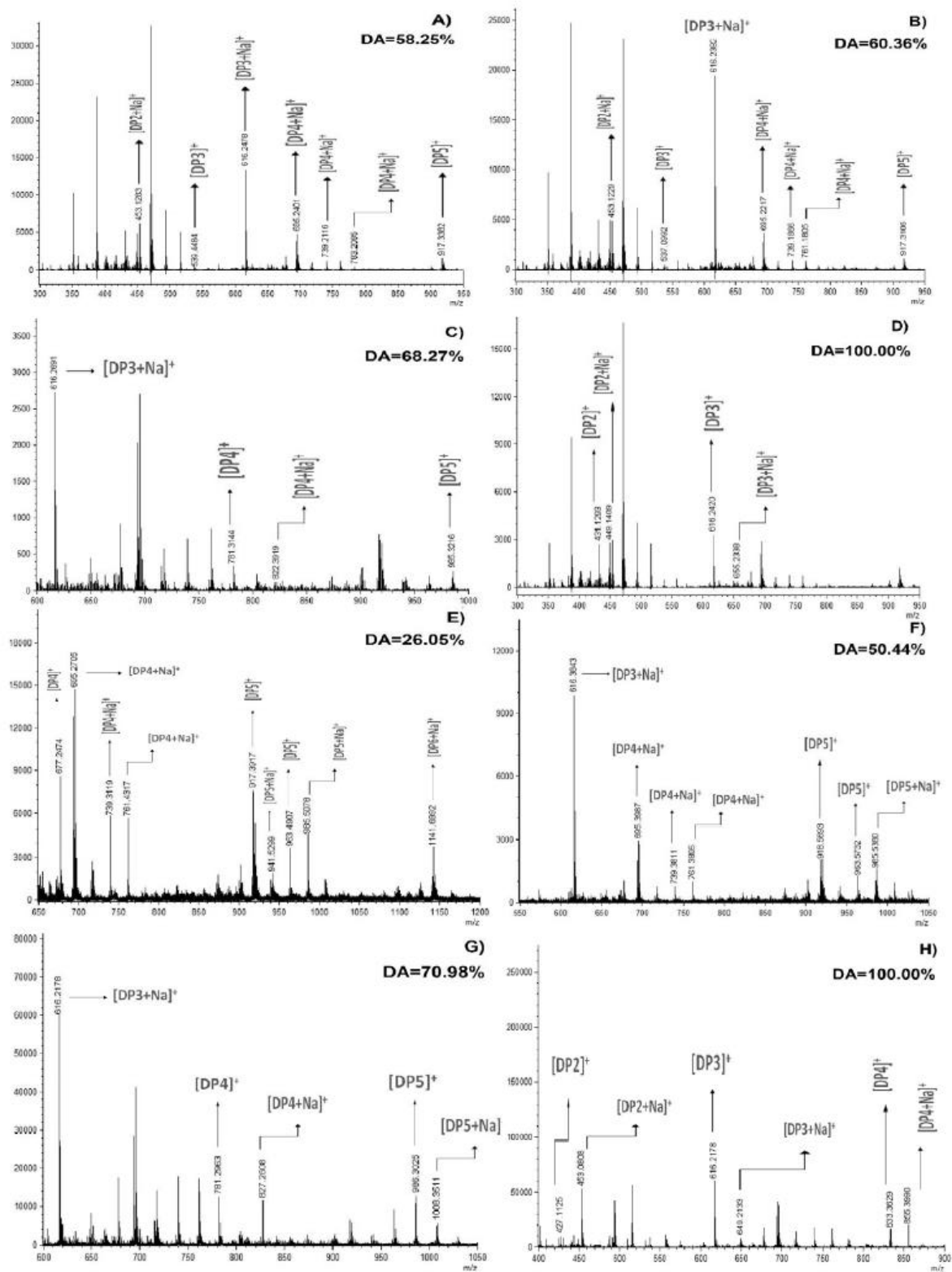


Fig. 4. Effect of temperature on initial velocity of TGA of Hex from *L. lecanii* using NaLac and GlcNAc as donor substrates.



amide group [25]. The mechanism of hydrolysis of chitinases also involved the formation of an oxazolinium ion intermediate with the nucleophilic *N*-acetamide group of the substrate. After that, the oxazolinium ion was attacked by a water molecule to render the hydrolysis products. The donor substrates outcompeted with the water molecule to form the glycosidic bond between donor and acceptor sugar molecules [33]. TGA of Hex reported in this study represented the overall FU of hydrolysis and TG activities when the reaction reached the plateau (Supplementary data 5). The TGA of bacterial chitinases often requires a GlcNAc in a position –2 for recognition and it could not hydrolyze 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl-glucosaminide, and instead, it carried out the bonding of saccharide donor [12,13]. Noteworthy, in this study, the Hex produced less overall FU (24,366.12 after 96 h) than that obtained by chitinases from *Bacillus* sp. with high TGA (ca. 100,000 FU) and low hydrolytic activity [12]. TGA from native Hex in this study was in the same order of magnitude with 90,000 overall FU than that from mutated strain of *Streptomyces griseus* with inactivated hydrolytic activity [34]. Therefore, the reports established enhanced TGA when the hydrolytic activity is low or absent. Other examples were the endochitinase of *Serratia proteamaculans* that presented significant TGA on trimer to hexamer substrates to produce up to DP 13 oligosaccharides, due to its low hydrolytic activity [35]. Aronson et al. [31] reported that *Serratia marcescens* produced chitinases with enhanced TGA after mutation of tryptophan to alanine in the chitin-binding cleft that could use GlcNAc in position –1. Additionally, the saccharide acceptor also varied with the enzyme as for the fungal Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from *Flammulina velutipes* that transglycosylated glycoasparagine to Glu, but did not present TGA on galactose [23].

3.4. Determination of E_a of Hex from *L. lecanii* with TGA

The effect of temperature on TGA was studied and the highest production of fluorescence was obtained at 37 °C with 922.7 ± 2.5 FU and 1037 ± 2 FU, whereas the lowest was at 7 °C with only 201 ± 1.5 for NaLac and GlcNAc, respectively (Supplementary data 6). It is worth noting that TGA for both substrates, NaLac and GlcNAc, showed a reduction of FU at 57 °C, which indicated an effect of deactivation by denaturation of the enzyme. Therefore, only the results from 7 to 47 °C were used for the determination of V_0 , which was the slope of the curve at the beginning of the reaction (Supplementary data 6, Fig. 4). The E_a of TGA estimated by Arrhenius was 54.47 kJ/mol and 46.36 kJ/mol for NaLac and GlcNAc, respectively (Supplementary data 6). The differences on E_a relied not only on the substrates but also on the activity, as E_a of TGA was lower than that for hydrolysis, as reported elsewhere with modified enzymes of *Bacillus circulans* by site-directed mutagenesis [26].

3.5. Determination of DP of oligomers by MALDI-TOF spectrometry

Fig. 5 shows the reaction products of TGA at several pHs and donor substrates analyzed by MALDI-TOF. Noteworthy, TGA was detected with Glu, Man, NaLac, and GlcNAc. Glu as donor produced oligomers of DP of 2, 3, 4, and 5. The peaks with the highest intensities were those with $[DP4 + Na]^+$ at pH 7, $[DP3 + Na]^+$ at pH 8, and $[DP2 + Na]^+$ at pH 6, while the lowest intensities were for oligomers of $[DP3]^+$ and $[DP5]^+$ for all pHs. TGA using Man produced oligomers between DP of 2 and 5 with the highest intensities for $[DP3 + Na]^+$ at pH 7 and $[DP4 + Na]^+$ at pH 6 and 8. TGA with NaLac rendered 3 and 5 DP oligomers, therein, $[DP3 + Na]^+$ was present in all pHs. GlcNAc produced oligomers of 2 and 3 with the highest intensities for $[DP2]^+$ and $[DP2 + Na]^+$.

DP was affected by the reaction time as the increase from 1.3 to 96 h incremented the intensity of peaks assigned to oligomers for each

substrate without correlation to the pHs (Fig. 5 and Table 2). The TGA for Glu at pH 6, 7, and 8 showed DP of 5 and 6 with a high abundance of $[DP4 + Na]^+$. Man with pH 6 produced oligomers with DP of 4 and 5, where the highest abundance was for $[DP4 + Na]^+$, and also increased for $[DP5]^+$ and $[DP5 + Na]^+$. NaLac with reaction pH of 6, 7, and 8 produced oligomers of 3, 4, and 5, with the highest intensities for $[DP3 + Na]^+$, $[DP5]^+$, and $[DP5 + Na]^+$. TGA using GlcNAc produced oligomers of 2, 3, and 4 at pH 6, 7, and 8 with the highest intensities for $[DP2 + Na]^+$ and $[DP3]^+$.

The oligomers by chitinolytic enzymes with TGA have been reported in several microorganisms. In this regard, Li et al. [12] studied a chitinase from *S. marcescens* that transformed different donor substrates to oligomers. However, the enzyme was not able to recognize the hydroxyl group of the Man in position –2. In the present study, Hex polymerized Man to produce oligomers with DP of 5. The enzyme recognized Glu, GlcNAc, and NaLac as donor substrates for TGA. Glu and Man produced tetraoligomers with low acetylation degree as well as homologs tetramers with a DA of 25% and 50%, while pentamer and hexamer showed DA of 50 and 60%, respectively. NaLac produced oligosaccharides of DP of 4 and 5, and the tetramer had GlcNAc₂ and a homolog with GlcNAc₃. In the first case, the molecule was assigned to the polymerization between NaLac and 2 units. It is worth to note that GlcNAc produced oligosaccharides with DP of 4 and 100% DA, while with other substrates, it was capable of producing partially deacetylated oligosaccharides with DP of 6 (Supplementary data 7).

Hex displayed an affinity for several donor substrates, acetylated or fully deacetylated. However, Hex produced oligosaccharides with DP between 2 and 6 with different DA (25 to 100%) but was unable to synthesize oligosaccharides with DP higher than 6. A plausible explanation for TGA inhibition might be that the oligosaccharides bound to an amino acid of the enzyme active site. This is in agreement to Chen et al. [36] who observed that the fully deacetylated oligosaccharides with DP between 2 and 7 bound to the glutamic acid present in the active site of the chitinase of the insect *Ostrinia furnacalis*.

According to Madhuprakash et al. [37], the fully deacetylated oligomers (GlcN)₃ and (GlcN)₄ did not inhibit the hydrolysis and TGA of chitinase D from *Serratia proteamaculans*, thus showing that the chitinase belonged to family G18 and a TGA that promoted high DA oligomers production.

TGA after 1.3 h of reaction produced oligomers with 58.2, 60.4 and 68.3% DA for Glu, Man, and NaLac, respectively (Table 2). Reduction of DA was observed for almost all substrates when reaction time TGA increased until 96 h. Glu was the most affected with 26% DA, followed by Man and NaLac (Fig. 5E, F, and H). Concomitantly with the reaction time, it also increased the bonding of units of the substrate and it reduced the acetylated groups. Therefore, products with null DA were related to Glu and Man. In contrast, GlcNAc was an acetylated substrate and its products of TGA showed 100% DA for any reaction time owing to the similar acetyl group to monomer unit ratio for all products (Fig. 5; Table 2).

Glu, Man, GlcNAc, and NaLac observed in lanes 1, 2, 3 and 4 and their products in TL chromatogram (Supplementary data 8). The R_f of Man, Glu and GlcNAc were 0.83, and that for NaLac was 0.78. TGA products showed different bands with R_f of 0.71, 0.58, and 0.12. TGA products from Man and Glu showed bands at 0.59 and 0.71 R_f assigned to oligomers with 2 and 3 DP with low concentration, and bands at 0.12 R_f with high intensity for all pHs. TGA products of NaLac and GlcNAc showed higher intensity bands with R_f of 0.71 than that of 0.58 R_f assigned to oligomers with 3 DP.

TLC proved that Hex conducted TGA using substrates with DP between 1 and 2 to synthesize new oligosaccharides with DP between 2 and 6. In this study, the production of oligomers with DP 5 and 6 was obtained after 96 h of reaction. However, it was shown that Hex could

Fig. 5. MALDI-TOF spectra of TGA products obtained by Hex from *L. lecanii* at 37 °C after 1.3 h: A) Glu, pH 6; B) Man, pH 7; C) NaLac, pH 8; D) GlcNAc, pH 7; and after 96 h: E) Glu, pH 7; F) Man, pH 8; G) NaLac, pH 7; H) GlcNAc, pH 7.

produce oligosaccharides with higher DP in a short reaction time by genetic modification of the chitinases that favored the oligosaccharides production by TGA [36].

4. Conclusion

Hex from *L. lecanii* showed Mw 50.4 kDa and hydrolytic as well as TG activities. TGA produced oligosaccharides with DP between 2 and 5 with different substrates. Hex with TGA had the highest affinity with GlcNAc, which was corroborated with the lowest activation energy. The produced Hex allowed transglycosylation towards the production of novel polysaccharide structures.

CRediT authorship contribution statement

Jesús Rojas-Osnaya: Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Zaizy Rocha-Pino:** Supervision, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft. **Hugo Nájera:** Supervision, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft. **Humberto González-Márquez:** Supervision, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft. **Keiko Shirai:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Resources, Supervision, Writing - review & editing, Visualization, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgments

The authors would like to thank Secretary of Education, Science Technology and Innovation of Mexico City (SECTEI) of Government of Mexico City for funding Project No. SECTEI/196/2019 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for funding and scholarship grant (JRO). Ms. Claudia H. Barrera is greatly acknowledged for diligent proofreading of this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.237>.

References

- B.B. Aam, E.B. Heggset, A.L. Norberg, M. Sorlie, K.M. Varum, V.G.H. Eijsink, Production of chito oligosaccharides and their potential applications in medicine, *Mar. Drugs* 8 (2010) 1482–1517, <https://doi.org/10.3390/md8051482>.
- S. Yang, S. Song, Q. Yan, X. Fu, Z. Jiang, X. Yang, Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N Acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 5181–5190, <https://doi.org/10.1021/jf500912b>.
- M. Fenice, The psychrotolerant Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: a powerful producer of cold-tolerant chitinolytic enzymes, *Molecules* 21 (2016) 447, <https://doi.org/10.3390/molecules21040447>.
- Y. Matsumoto, G. Saucedo-Castañeda, S. Revah, K. Shirai, Production of β -N-acetyl hexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid-state and submerged fermentation utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer, *Process Biochem.* 39 (2004) 665–671, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00140-7).
- Z. Rocha-Pino, G. Viguera, K. Shirai, Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34 (2011) 681–686, <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0517-z>.
- G. Villa-Lerma, H. González-Márquez, M. Gimeno, A. López-Luna, E. Bárzana, K. Shirai, Ultrasonication and steam-explosion chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*, *Bioresour. Technol.* 140 (2013) 794–798, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.003>.
- G. Villa-Lerma, H. González-Márquez, M. Gimeno, S. Trombotto, L. David, S. Ifuku, K. Shirai, Enzymatic hydrolysis of chitin pretreated by rapid depressurization from supercritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane toward highly acetylated oligosaccharides, *Bioresour. Technol.* 209 (2016) 180–186, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.138>.
- F. Liaqat, R. Eltem, Chito oligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review, *Carbohydr. Polym.* 184 (2018) 243–259, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>.
- H. Wu, B.B. Aam, W. Wang, A.L. Norberg, M. Sorlie, V.G.H. Eijsink, Y. Du, Inhibition of angiogenesis by chito oligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 511–518, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.037>.
- I. Robina, S. Gómez-Bujedo, J.G. Fernández-Bolaños, J. Fuentes, H.P. Spink, Synthesis and biological evaluation of oligosaccharides related to the molecule signals in plant defense and the *Rhizobium*-legume symbiosis, *Tetrahedron* 58 (2002) 521–530, [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)01148-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)01148-6).
- S. Masuda, K. Azuma, S. Kurozumi, M. Kiyose, T. Osaki, T. Tsuka, N. Itoh, T. Imagawa, S. Minami, K. Sato, Y. Okamoto, Anti-tumor properties of orally administered glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine oligomers in a mouse model, *Carbohydr. Polym.* 111 (2014) 783–787, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.102>.
- C. Li, W. Huang, L. Wang, Chemoenzymatic synthesis of N-linked neoglycoproteins through a chitinase-catalyzed transglycosylation, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 8366–8372, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.08.042>.
- K. Suma, A.R. Podile, Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities, *Bioresour. Technol.* 133 (2013) 213–220, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.103>.
- M. Zhang, A. Puri, A. Govender, Z. Wang, S. Singh, K. Permaul, The multi-chitinolytic enzyme system of the compost-dwelling thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*, *Process Biochem.* 50 (2015) 237–244.
- A. Tronsmo, G.E. Harman, Detection, and quantification of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels, *Anal. Biochem.* 208 (1993) 74–79, <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1010>.
- G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal. Biochem.* 83 (1977) 346–356, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).
- M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- A.E. Gal, Separation, and identification of monosaccharides from biological materials by thin-layer chromatography, *Anal. Biochem.* 24 (1968) 452–461, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90152-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90152-8).
- S. Trombotto, C. Ladavière, F. Delolme, A. Domard, Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers, *Biomacromolecules* 9 (2008) 1731–1738, <https://doi.org/10.1021/bm800157x>.
- M. Kumar, A. Brar, V. Vivekanand, N. Pareek, Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chito oligosaccharides, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 1641–1647, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.100>.
- P. Barghini, D. Moscatelli, A.M.V. Garzillo, S. Crognale, M. Fenice, High production of cold-tolerant chitinases on shrimp wastes in a bench-top bioreactor by the antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: bioprocess optimization and characterization of two main enzymes, *Enzyme. Microbi. Technol.* 53 (2013) 331–338, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.07.005>.
- A.N. Shehata, A.A. Abd El Aty, D.A. Darwish, W.A.A. Wahab, F.A. Mostafa, Purification, physicochemical studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 990–999, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.071>.
- T. Hamaguchi, T. Ito, Y. Inoue, T. Limpaseni, P. Pongsawadsi, K. Ito, Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Hammulina velutipes*, *Glycobiology* 20 (2010) 420–432, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp188>.
- K. Struszczyk, M. Szczesna-Antczak, M. Walczak, E. Pomianowska, T. Antczak, Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes, *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 16–24, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.010>.
- M. Kohri, A. Kobayashi, S. Shoda, Design and utilization of chitinases with low hydrolytic activities, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 19 (2007) 165–180, <https://doi.org/10.4052/tigg.19.165>.
- H.Q. Nguyen, D.T. Quyen, S.T. Nguyen, V.H. Vu, An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi, *Turk. J. Biol.* 39 (2015) 6–14, <https://doi.org/10.3906/biy-1402-28>.
- S. Adrangi, M.A. Faramarzi, From bacteria to human: a journey into the world of chitinases, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1786–1795, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.012>.
- Z.X. Lu, A. Laroche, H.C. Huang, Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*, *Can. J. Microbiol.* 51 (2005) 1045–1055, <https://doi.org/10.1139/w05-088>.
- M.B. Kaczmarek, K. Struszczyk-Swita, X. Li, M. Szczesna-Antczak, M. Daroch, Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chito oligosaccharides, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 243, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00243>.
- P. Fialová, L. Weignerová, J. Rauvolfová, V. Prikrýlová, A. Písejcová, R. Etrich, M. Kuzma, P. Sedmera, V. Kren, Hydrolytic and transglycosylation reactions of N-acyl modified substrates catalyzed by β -N-acetylhexosaminidases, *Tetrahedron* 60 (2004) 693–701, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.10.111>.
- N.N. Aronson, B.A. Halloran, M.F. Alexeyev, X.E. Zhou, Y. Wang, E.J. Meehan, L. Chen, Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of *Serratia marcescens* chitinase A enhances transglycosylation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 243–251, <https://doi.org/10.1271/bbb.70.243>.
- Y. Tomabechi, Y. Odate, R. Izumi, K. Haneda, T. Inazu, Acceptor specificity in the transglycosylation reaction using Endo-M, *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 2458–2463, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.08.022>.
- J. Madhupratkash, K. Tanneeru, P. Purushotham, L. Guruprasad, A.R. Podile, Transglycosylation by chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44619–44627, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400879>.

- [34] S. Hauser, H. Song, H. Li, L.X. Wang, A novel fluorescence-based assay for the transglycosylation activity of endo- β -N-acetylglucosaminidases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328 (2005) 580–585, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.012>.
- [35] P. Purushotham, A.R. Podile, Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 4260–4271, <https://doi.org/10.1128/JB.06473-11>.
- [36] L. Chen, Y. Zhou, M. Qu, Y. Zhao, Q. Yang, Fully deacetylated chitooligosaccharides act as efficient glycoside hydrolase family 18 chitinase inhibitors, *J. Bio. Chem.* 289 (2014) 17932–17940, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564534>.
- [37] J. Madhuprakash, N.E. El Gueddari, B.M. Moerschbacher, A.R. Podile, Production of bioactive chitosan oligosaccharides using the hypertransglycosylating chitinase-D from *Serratia proteamaculans*, *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 503–509, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.052>.

8. Bibliografía

Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine drugs*, 8(5), 1482-1517.

Adrangi, S., & Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnology advances*, 31(8), 1786-1795.

Alsina, C., Faijes, M., & Planas, A. (2019). Glycosynthase-type GH18 mutant chitinases at the assisting catalytic residue for polymerization of chitooligosaccharides. *Carbohydrate research*, 478, 1-9.

Aronson, N. N., Halloran, B. A., Alexeyev, M. F., Zhou, X. E., Wang, Y., Meehan, E. J., & Chen, L. (2006). Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of *Serratia marcescens* chitinase A enhances transglycosylation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(1), 243-251.

Barghini, P., Moscatelli, D., Garzillo, A. M. V., Crognale, S., & Fenice, M. (2013). High production of cold-tolerant chitinases on shrimp wastes in bench-top bioreactor by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: bioprocess optimization and characterization of two main enzymes. *Enzyme and microbial technology*, 53(5), 331-338.

Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., & Marinelli, F. (2018). Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology advances*, 36(3), 818-838.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Chen, L., Zhou, Y., Qu, M., Zhao, Y., & Yang, Q. (2014). Fully deacetylated chitooligosaccharides act as efficient glycoside hydrolase family 18 chitinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17932-17940.

Fenice, M. (2016). The psychrotolerant Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: a powerful producer of cold-tolerant chitinolytic enzymes. *Molecules*, 21(4), 447.

Fialová, P., Weignerová, L., Rauvolfová, J., Přikrylová, V., Pišvejcová, A., Ettrich, R., ... & Křen, V. (2004). Hydrolytic and transglycosylation reactions of N-acyl modified substrates catalyzed by β -N-acetylhexosaminidases. *Tetrahedron*, 60(3), 693-701.

Gal, A. E. (1968). Separation and identification of monosaccharides from biological materials by thin-layer chromatography. *Analytical biochemistry*, 24, 452-461.

Halder, S. K., Jana, A., Paul, T., Das, A., Ghosh, K., Pati, B. R., & Mondal, K. C. (2016). Purification and biochemical characterization of chitinase of *Aeromonas hydrophila* SBK1 biosynthesized using crustacean shell. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 211-218

Hamaguchi, T., Ito, T., Inoue, Y., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Ito, K. (2009). Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo- β -N-acetylglucosaminidase from the basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Glycobiology*, 20(4), 420-432.

Hauser, S., Song, H., Li, H., & Wang, L. X. (2005). A novel fluorescence-based assay for the transglycosylation activity of endo- β -N-acetylglucosaminidases. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(2), 580-585.

Hennessey Jr, J. P., & Johnson Jr, W. C. (1982). Experimental errors and their effect on analyzing circular dichroism spectra of proteins. *Analytical biochemistry*, 125(1), 177-188.

Johnson Jr, W. C. (1988). Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 17(1), 145-166.

Kaczmarek, M. B., Struszczyk-Swita, K., Li, X., Szczesna-Antczak, M., & Daroch, M. (2019). Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan and Chitooligosaccharides. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 243.

Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G. (2013). Fragmentation of chitosan by acids. *The Scientific World Journal*, 2013.

Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139.

Kohri, M., Kobayashi, A., & Shoda, S. I. (2007). Design and utilization of chitinases with low hydrolytic activities. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 19(107), 165.

Kulkarni, S., Nene, S., & Joshi, K. (2017). Production of hydrophobins from fungi. *Process Biochemistry*, 61, 1-11.

Kumar, M., Brar, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2017). Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitooligosaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1641-1647.

Li, C., Huang, W., & Wang, L. X. (2008). Chemoenzymatic synthesis of N-linked neoglycoproteins through a chitinase-catalyzed transglycosylation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(18), 8366-8372.

Li, K., Green, A. R., Dinges, M. M., & Larive, C. K. (2019). ¹H NMR characterization of chitin tetrasaccharide in binary H₂O: DMSO solution: Evidence for anomeric end-effect propagation. *International journal of biological macromolecules*, 129, 744-749.

Liaqat, F., & Eltem, R. (2018). Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydrate polymers*, 184, 243-259.

Linder, M. B. (2009). Hydrophobins: proteins that self assemble at interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(14), 356-363.

Lu, Z. X., Laroche, A., & Huang, H. C. (2005). Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*. *Canadian journal of microbiology*, 51(12), 1045-1055.

Madhuprakash, J., El Gueddari, N. E., Moerschbacher, B. M., & Podile, A. R. (2015). Production of bioactive chitosan oligosaccharides using the hypertransglycosylating chitinase-D from *Serratia proteamaculans*. *Bioresource technology*, 198, 503-509.

Madhuprakash, J., Tanneeru, K., Purushotham, P., Guruprasad, L., & Podile, A. R. (2012). Transglycosylation by chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44619-44627.

Manavalan, P., & Johnson, W. C. (1983). Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature*, 305(5937), 831-832.

Masuda, S., Azuma, K., Kurozumi, S., Kiyose, M., Osaki, T., Tsuka, T., ... & Okamoto, Y. (2014). Anti-tumor properties of orally administered glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine oligomers in a mouse model. *Carbohydrate polymers*, 111, 783-787.

Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., & Shirai, K. (2004). Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*, 39(6), 665-671.

Mourya, V. K., Inamdar, N. N., & Choudhari, Y. M. (2011). Chitooligosaccharides: synthesis, characterization and applications. *Polymer Science Series A*, 53(7), 583-612.

Nguyen, H. Q., Quyen, D. T., Nguyen, S. L. T., & Van Hanh, V. U. (2015). An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 6-14.

Opwis, K., & Gutmann, J. S. (2011). Surface modification of textile materials with hydrophobins. *Textile Research Journal*, 81(15), 1594-1602.

Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*, 83(2), 346-356.

Poklar, N., & Vesnaver, G. (2000). Thermal denaturation of proteins studied by UV spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, 77(3), 380.

Purushotham, P., & Podile, A. R. (2012). Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568. *Journal of bacteriology*, 194(16), 4260-4271.

Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C., & Hollenstein, G. O. (2003). Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*, 64(2), 339-366.

Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2015). Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. *Enzyme research*, 2015.

Robina, I., Gómez-Bujedo, S., Fernández-Bolaños, J. G., Fuentes, J., & Spaink, H. P. (2002). Synthesis and biological evaluation of oligosaccharides related to the molecule signals in plant defence and the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Tetrahedron*, 58(3), 521-530.

Rocha-Pino, Z., Ramos-López, J. I., Gimeno, M., Barragán-Aroche, F., Durán-Valencia, C., López-Ramírez, S., & Shirai, K. (2018). Enhanced oil recovery by hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Fuel*, 224, 10-16.

Rocha-Pino, Z., Viguera, G., & Shirai, K. (2011). Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(6), 681-686.

Rocha-Pino, Z., Viguera, G., Sepúlveda-Sánchez, J. D., Hernández-Guerrero, M., Campos-Terán, J., Fernández, F. J., & Shirai, K. (2015). The hydrophobicity of the support in solid state culture affected the production of hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*. *Process Biochemistry*, 50(1), 14-19.

Rojas-Osnaya, J., Rocha-Pino, Z., Nájera, H., González-Márquez, H., & Shirai, K. (2020). Novel transglycosylation activity of β -N-acetylglucosaminidase of *Lecanicillium lecanii* produced by submerged culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 759-767.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.

Shehata, A. N., El Aty, A. A. A., Darwish, D. A., Wahab, W. A. A., & Mostafa, F. A. (2018). Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. *International journal of biological macromolecules*, 107, 990-999.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856.

Shokribousjein, Z., Deckers, S. M., Gebruers, K., Lorgouilloux, Y., Baggerman, G., Verachtert, H., ... & Derdelinckx, G. (2011). Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia*, 35(4), 85-101.

Singh, V. R., Verma, V. K., Ishigami, K., Shibata, G., Fujimori, A., Koide, T., ... & Yamamoto, M. (2015). Electronic and magnetic properties of off-stoichiometric Co₂Mn β Si/MgO interfaces studied by x-ray magnetic circular dichroism. *Journal of Applied Physics*, 117(20), 203901.

Slàmová, K., Bojarová, P., Petrásková, L., & Křen, V. (2010). β -N-acetylhexosaminidase: what's in a name...?. *Biotechnology advances*, 28(6), 682-693.

Sreerama, N., & Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical biochemistry*, 287(2), 252-260.

Struszczyk, K., Szczęśna-Antczak, M., Walczak, M., Pomianowska, E., & Antczak, T. (2009). Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes. *Carbohydrate polymers*, 78(1), 16-24.

Suginta, W., Sirimontree, P., Sritho, N., Ohnuma, T., & Fukamizo, T. (2016). The chitin-binding domain of a GH-18 chitinase from *Vibrio harveyi* is crucial for chitin-chitinase interactions. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1111-1117.

Sugiyama, H., Hisamichi, K., Sakai, K., Usui, T., Ishiyama, J. I., Kudo, H., ... & Senda, Y. (2001). The conformational study of chitin and chitosan oligomers in solution. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(2), 211-216.

Suma, K., & Podile, A. R. (2013). Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. *Bioresource technology*, 133, 213-220.

Tello, D., Rodríguez-Rodríguez, M., Yélamos, B., Gómez-Gutiérrez, J., Peterson, D. L., & Gavilanes, F. (2015). High-yield production of a chimeric glycoprotein based on permuted E1 and E2 HCV envelope ectodomains. *Journal of virological methods*, 213, 38-44.

Tello-Solís, S. R., & Arroyo-Reyna, A. (2002). Estudio por dicroísmo circular de la desnaturalización térmica de la subtilisina BPN': Modelo irreversible de dos estados. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46(2), 105-108.

Tello-Solis, S. R., & Hernandez-Arana, A. (1995). Effect of irreversibility on the thermodynamic characterization of the thermal denaturation of *Aspergillus saitoi* acid proteinase. *Biochemical journal*, 311(3), 969-974.

Tello-Solís, S. R., & Romero-García, B. (2001). Thermal denaturation of porcine pepsin: a study by circular dichroism. *International journal of biological macromolecules*, 28(2), 129-133.

Tomabechi, Y., Odate, Y., Izumi, R., Haneda, K., & Inazu, T. (2010). Acceptor specificity in the transglycosylation reaction using Endo-M. *Carbohydrate research*, 345(17), 2458-2463.

Trombotto, S., Ladavière, C., Delolme, F., & Domard, A. (2008). Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers. *Biomacromolecules*, 9(7), 1731-1738.

Tronsmo, A., & Harman, G. E. (1993). Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical biochemistry*, 208(1), 74-79.

Van Wetter, M. A., Wösten, H. A., & Wessels, J. G. (2000). SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Molecular microbiology*, 36(1), 201-210.

Vereman, J., Thysens, T., Derdelinckx, G., Van Impe, J., & Van de Voorde, I. (2019). Extraction and spray drying of Class II hydrophobin HFBI produced by *Trichoderma reesei*. *Process biochemistry*, 77, 159-163.

Villa-Lerma, G., González-Márquez, H., Gimeno, M., López-Luna, A., Bárzana, E., & Shirai, K. (2013). Ultrasonication and steam-explosion as chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. *Bioresource technology*, 146, 794-798.

Villa-Lerma, G., González-Márquez, H., Gimeno, M., Trombotto, S., David, L., Ifuku, S., & Shirai, K. (2016). Enzymatic hydrolysis of chitin pretreated by rapid depressurization from supercritical 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane toward highly acetylated oligosaccharides. *Bioresource technology*, 209, 180-186.

Wolz, M., & Kulozik, U. (2015). Thermal denaturation kinetics of whey proteins at high protein concentrations. *International Dairy Journal*, 49, 95-101.

Wu, H., Aam, B. B., Wang, W., Norberg, A. L., Sørli, M., Eijsink, V. G., & Du, Y. (2012). Inhibition of angiogenesis by chitooligosaccharides with specific degrees of acetylation and polymerization. *Carbohydrate polymers*, 89(2), 511-518.

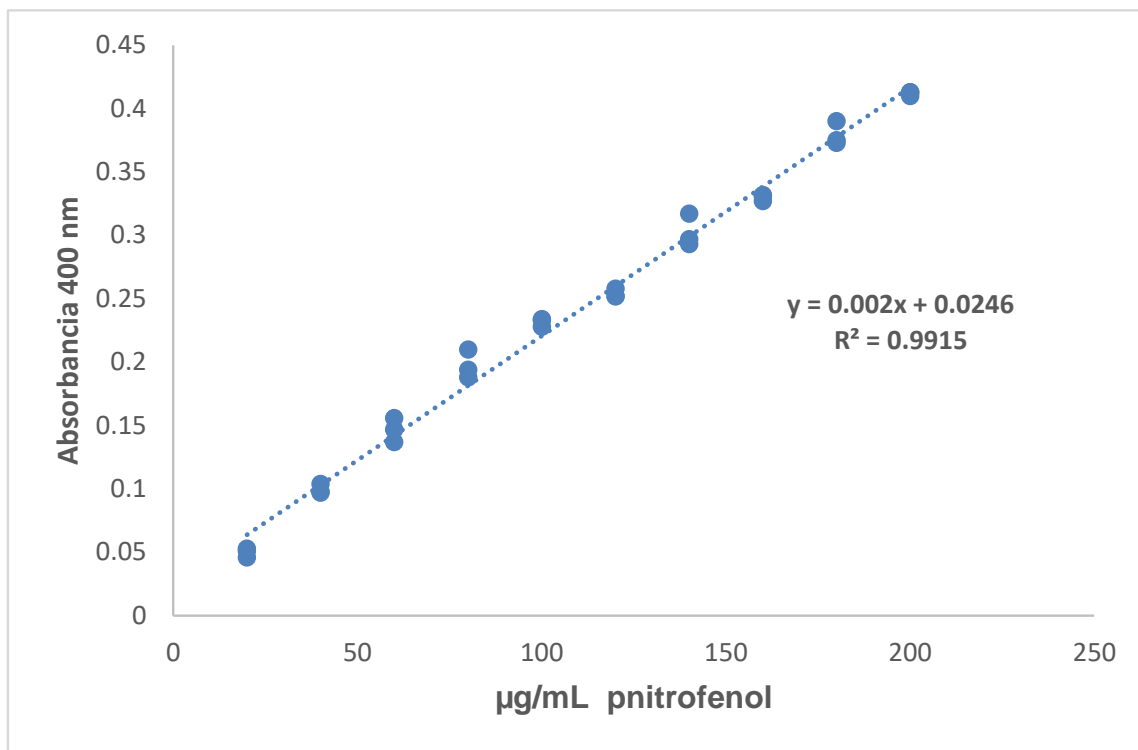
Yang, S., Song, S., Yan, Q., Fu, X., Jiang, Z., & Yang, X. (2014). Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3 β -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(22), 5181-5190.

Yao, K., & Liu, Y. (2018). Enhancing circular dichroism by chiral hotspots in silicon nanocube dimers. *Nanoscale*, 10(18), 8779-8786.

Zhang, M., Puri, A. K., Govender, A., Wang, Z., Singh, S., & Permaul, K. (2015). The multi-chitinolytic enzyme system of the compost-dwelling thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, 50(2), 237-244.

9. Anexos

Anexo 1. Curva patrón de p-nitrofenol para la determinación de actividad Hex



Anexo 1. Curva patrón de p-nitrofenol para la determinación de Hex (Tronsmo y Harman, 1993)

Anexo 2. Metodología para determinación de proteína por Lowry - Peterson y curva patrón de seroalbúmina

Reactivo A

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

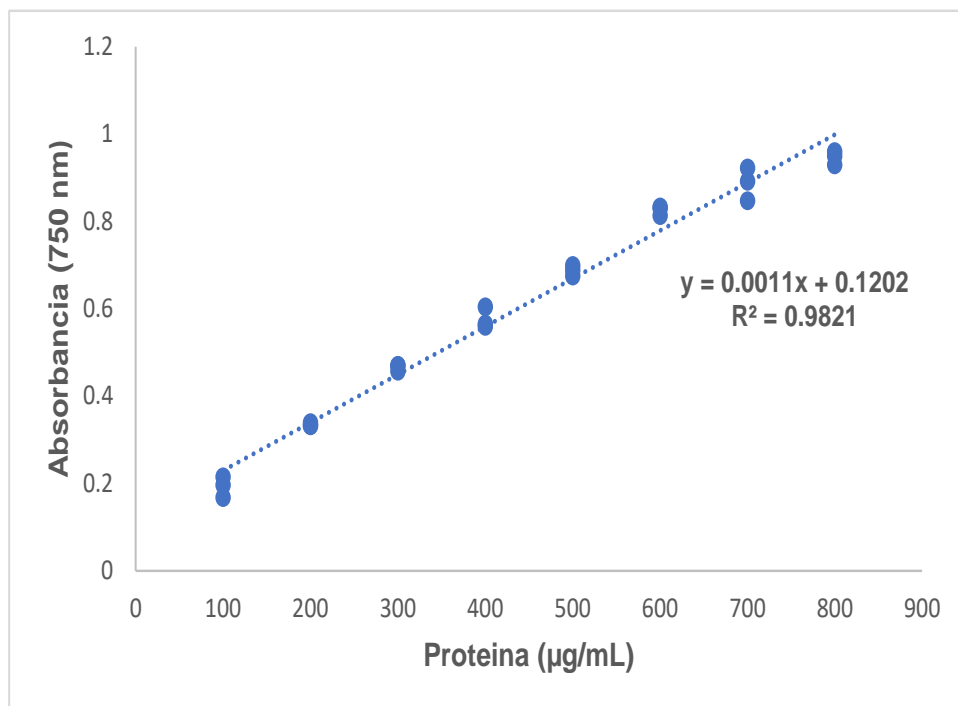
B) Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS): 25g de SDS fueron disueltos en 250 ml de agua destilada.

C) Solución de hidróxido de sodio: Se disolvieron 8g de NaOH en 250 ml de agua destilada. Se mezclan las soluciones A, B y C aforándose con agua destilada a 1L.

Reactivo B

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

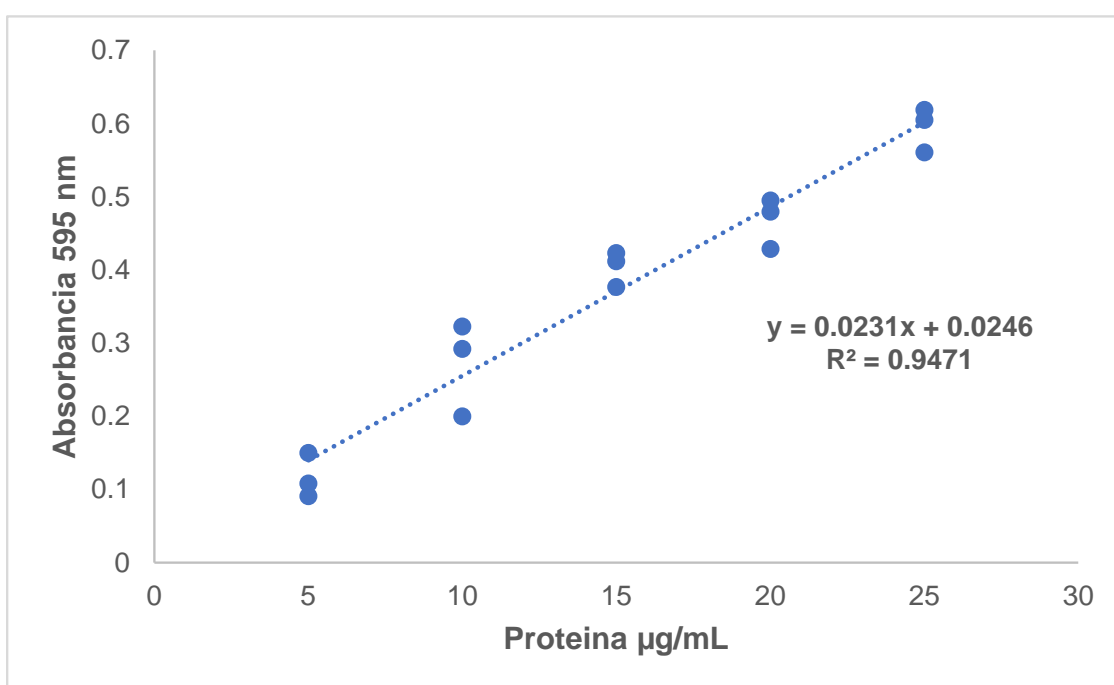
El método consistió en la adición de 1mL de reactivo de Lowry A a un 1mL de muestra previamente centrifugada (8,000 rpm por 5 minutos), se mezclaron y se incubaron por 10 min a 25°C, posteriormente se añadieron 0.5 mL de reactivo B (Fenol- Folin Ciocalteu en proporción 1:1 con agua desionizada), se agitó e incubó por 30 min a 25°C se determinó la absorbancia a 750 nm.



Anexo 2. Curva patrón para la determinación de proteína por Lowry-Peterson (Peterson, 1977).

Anexo 3. Determinación de proteína por el método de Bradford.

Se realizó de acuerdo con lo reportado por Bradford, (1976), 160 μL de muestra se mezclaron con 40 μL del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, número de catálogo 500-0006), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595nm. La concentración de proteína se obtuvo mediante una curva patrón utilizando seroalbúmina bovina como estándar.



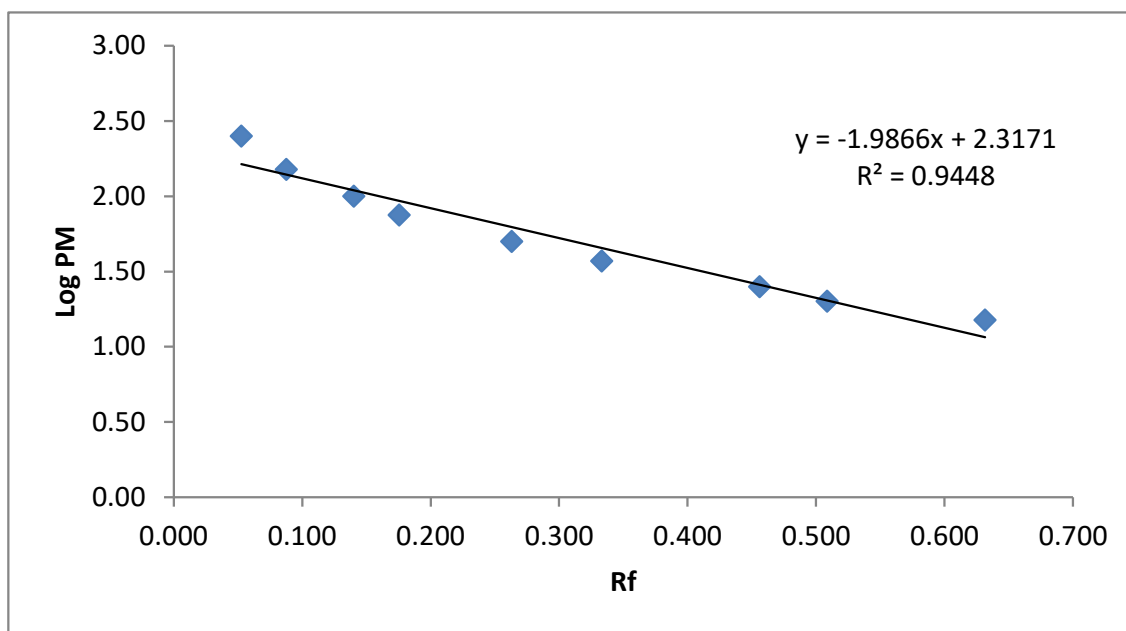
Anexo 3. Curva patrón para la determinación de proteína por microensayo (Bradford, 1976).

Anexo 4. Determinación del peso molecular de una proteína problema

Se determino la movilidad relativa (Rf) de la proteína problema como de cada una de las proteínas de referencia utilizando la siguiente ecuación:

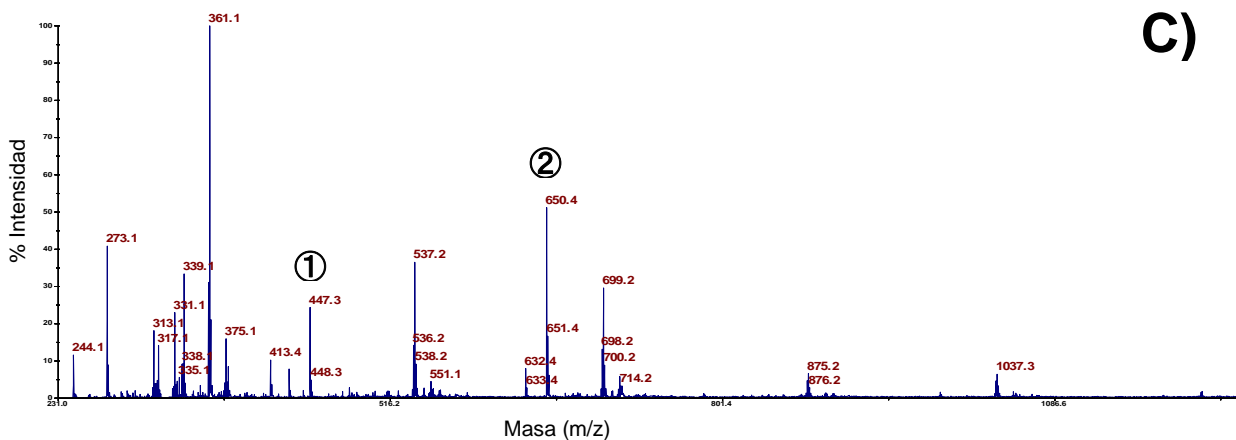
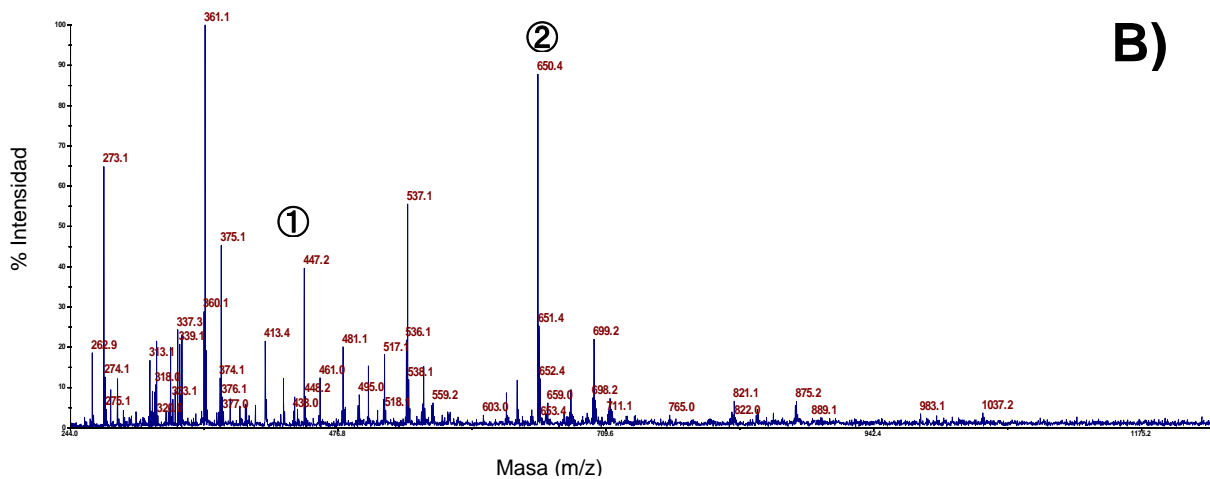
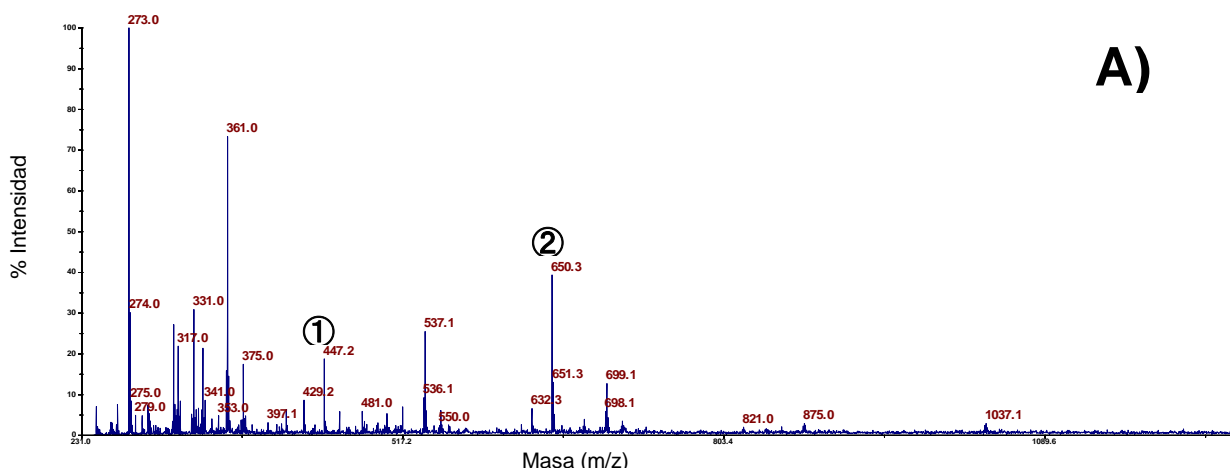
$$Rf = \frac{\text{Distancia de migracion de la proteina (cm)}}{\text{Distancia de migracion del frente del gel (cm)}}$$

Los valores del logaritmo del peso molecular de cada una de las proteínas de referencia se graficaron frente al Rf correspondientes a cada una de ellas, obteniendo la siguiente curva patrón.



Anexo 4. Curva patrón para la determinación del peso molecular de una proteína problema

Anexo 5. Espectros MALDI-TOF de 96 y 144 h



Anexo 5. Espectros de MALDI-TOF de los productos de la TGA obtenidos de la Hex de *L. lecanii* a 37°C, utilizando GlcNAc después de 96 (A), 144 (B) y (C) horas después de 144 h, adicionando GlcNAc a las 96 h.



Estudio de la producción
de β -N-acetilglucosaminidasas
e hidrobobinas en cultivo
sumergido de *Lecanicillium*
lecanii



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 10 del mes de julio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
DR. HUGO NAJERA PEÑA
DRA. ZAIZY ROCHA PINO
DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: JESUS ROJAS OSNAYA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

CUAJERA

DR. HUGO NAJERA PEÑA

DRA. ZAIZY ROCHA PINO

DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella