



## EXPRESION DE ENDOQUITINASAS BACTERIANAS EN *Escherichia coli* Y PRODUCCION DE QUITOOLIGOSACARIDOS

Olga Brigida Gutierrez-Acosta, Maribel Imperial-Cervantes, Rubén Salcedo-Hernández, y J. Eleazar Barboza-Corona\*. Universidad de Guanajuato, Instituto de Ciencias Agrícolas. Ex Hacienda El Copal, carretera Irapuato-Silao Km 9, Irapuato Guanajuato, México. Fax: 01 462 624 2484, e-mail: josebar@dulcinea.ugto.mx

*Palabras clave:* Endoquitinasas, bacterias, quitooligosacáridos,

**Introducción.** La producción de quitooligosacáridos por una bacteria es difícil de controlar, ya que tienen una batería de enzimas quitinolíticas (1) que transforman la quitina hasta N-acetilglucosamina. En nuestro laboratorio hemos clonado varios genes de endoquitinasas (1,2) con utilidad en el control de insectos (3) cuyo uso podría extenderse al procesamiento y transformación de la quitina en quitooligosacáridos, compuestos que pudieran tener diversos usos biotecnológicos.

En este trabajo realizamos un análisis comparativo de la expresión en *Escherichia coli* de endoquitinasas bacterianas, y mostramos la utilidad de una de ellas en la producción de quitooligosacáridos.

**Metodología.** Se realizaron varias construcciones en *E. coli* con los genes *chiA74* de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* y *chiA Nima* de *S. marcescens* en los vectores pHT3101 o pBSKS(+), plásmidos de bajo o alto número de copias respectivamente. Todas las construcciones tenían los genes *chi* con sus regiones de regulación silvestres. Se analizó la producción de las quitinasas recombinantes a nivel traduccional mediante su cuantificación con derivados sintéticos de quitina fluorescentes y por zimogramas (1). Muestras de quitina fueron puestas a reaccionar con ChiA Nima a pH y temperatura óptima y los productos de hidrólisis fueron visualizados mediante cromatografía en capa fina.

**Resultados y Discusión.** Las endoquitinasas fueron detectadas en el sobrenadante de los cultivos, lo que implica el reconocimiento y procesamiento por el sistema de secreción de *E. coli*. Uno de los factores más importante que afectó la expresión, fue el número de copias. Al analizar la síntesis de las quitinasas en *E. coli*, se observó que cuando *chiA Nima* se encontraba en un plásmido de bajo número de copias (*E. coli*-ChiANima-pHT3101), la producción de endoquitinasa era mayor que si dicho gen se encontraba en uno de alto número de copias. Este resultado fue contrario a lo esperado, ya que un alto número de copias aseguraba alta síntesis de RNAm y un bajo número de copias poca producción. Este resultado probablemente se debió a que la alta síntesis de las endoquitinasas uso gran parte de la maquinaria de síntesis de proteínas, ocasionando un

detrimento en la fisiología celular, disminuyendo probablemente su división celular y ocasionando al final una disminución en la producción total de la endoquitinasa. De igual forma, la producción de quitinasa por *E. coli*-ChiANima-pHT3101 fue mayor que cuando se usaron construcciones diferentes (Tabla 1), lo cual fue también confirmado mediante zimogramas. Con estos resultados, ChiA Nima fue utilizada para la producción de quitooligosacáridos usando quitina como sustrato. Los resultados confirmaron que ChiA Nima tiene un efecto endoquitinolítico y produce quitooligosacáridos de más de 3 unidades de N-Acetilglucosamina.

Tabla 1. Actividad quitinolítica de cepas recombinantes de *E. coli* con diferentes quitinasas

Cepa	mU/mL	Relación
ChiA74-pBSKS (+)	3460	1.4
ChiA74-pHT3101	5490	2.3
ChiANima-pBSKS(+)	2440	1.0
ChiANima-pHT3101	11590	4.8
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ F'	0	-

**Conclusiones.** La expresión de las quitinasas bacterianas en *E. coli* depende del tipo de gen *chi* y del plásmido usado como vector. Es posible la producción de quitooligosacáridos mediante el uso de quitinasas bacterianas, lo cual podría ayudar a la transformación de residuos de quitina en productos con un valor agregado.

**Agradecimiento:** A SEP-CONACYT por el apoyo del proyecto 44990.

### Bibliografía.

1. Barboza-Corona J.E., Nieto Mazzoco E., Velásquez-Robledo R., Salcedo Hernández, R., Bautista M., Jiménez B. and Ibarra, J. 2003. Cloning, sequencing, and expresión of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 69(2): 1023-1029.
2. Ruiz-Sanchez A, Cruz-Camarillo R., Salcedo-Hernández R., Ibarra J. and Barboza-Corona J.E. 2005. Molecular cloning and purification of an endochitinase from *Serratia marcescens* (Nima). Mol. Biotechnol. 31(2): 103-112.
3. Casique-Arroyo G., Bideshi D. Salcedo-Hernández R., and Barboza-Corona J.E. 2007. Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74. Antonie van Leeuwenhoek. In Press.