



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



SINTESIS DE ENDOQUITINASAS BACTERIANAS EN UNA CEPA DE *Escherichia coli* RECONOCIDA COMO SEGURA (GRAS) Y SU USO EN LA PRODUCCION DE QUITO-OLIGOSACÁRIDOS QUE INHIBEN BACTERIAS PATÓGENAS

José Cristobal Castañeda-Ramírez¹, Rubén Dario Pacheco-Cano¹, Norma de la Fuente-Salcido^{1,2}, J. Eleazar Barboza-Corona^{*1}. Universidad de Guanajuato, División Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas. *Correo electrónico: josebar@dulcinea.ugto.mx

Palabras clave: Endoquitinasas, quito-oligosacáridos, GRAS.

Introducción. Las endoquitinasas ChiA74 y ChiA Nima son enzimas producidas por *Bacillus thuringiensis* y *Serratia marcescens* Nima, respectivamente. Los genes que las codifican fueron recientemente clonadas y expresadas por nuestro grupo en *Escherichia coli* DH5 α F' y las proteínas recombinantes fueron capaces de generar oligosacáridos que inhiben bacterias patógenas (1,2). Sin embargo, su uso se ve limitado ya que fueron producidas en una bacteria que no tiene el reconocimiento como segura (GRAS) y no podrían usarse para generar un producto o derivado para consumo humano. En este trabajo nuestro objetivo fue producir esas endoquitinasas en *E. coli* K12, bacteria reconocida como segura, y demostrar su utilidad en la producción de quito-oligosacáridos con capacidad antagonista contra bacterias de importancia en salud pública.

Metodología. Los plásmidos que contienen los genes *chiA74* y *chiA* Nima fueron introducidos en *E. coli* K12 y las transformantes seleccionadas mediante PCR. Estas fueron cultivadas en LB con antibiótico, se tomaron alicuotas a diferentes tiempos, se evaluó la densidad óptica a 600 nm y la actividad de endoquitinasa fue determinada mediante un sustrato fluorescente sintético (1). La integridad de las enzimas producidas en las cepas recombinantes fue corroborada mediante zimogramas, empleando un sustrato fluorescente. Adicionalmente, las enzimas fueron puestas a reaccionar con quitina coloidal para generar quito-oligosacáridos, los cuales fueron analizados por azúcares reductores, cromatografía en capa fina (TLC) y por su actividad antagonista hacia bacterias patógenas (1,2).

Resultados. Cuando las cepas transformantes fueron cultivadas en LB se observó que la producción de las enzimas ChiA74 y ChiA Nima comenzó en la fase exponencial pero su máxima producción fue alcanzada en la fase estacionaria de crecimiento, aproximadamente a las 40 h (Fig. 1). Es importante hacer notar que la máxima producción de esas enzimas en *E. coli* DH5 α F' se logra ~ a las 20 h (1,2). La enzima fue detectada en el sobrenadante, indicando que *E. coli* K12 fue capaz de reconocer las señales de transporte de las endoquitinasas ChiA74 y ChiA Nima y secretarlas. Mediante zimogramas se observó que la masa molecular

de las enzimas producidas por *E. coli* K12 fue de ~ 70 kDa (Fig. 2), el cual corresponde al peso molecular esperado.

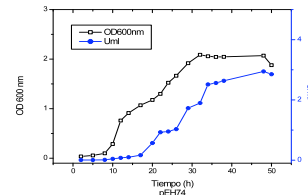


Fig. 1. Producción de ChiA74 (—○—) en *E. coli* K12 a diferentes tiempos. Obsérvese que la máxima producción sucede en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

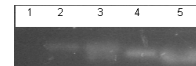


Fig. 2. Zimogramas. Carril 1, *E. coli* K12 JM109; carril 2, *E. coli* K12 JM109-pBS74; carril 3, *E. coli* K12 JM109-pEH74; carril 4, *E. coli* K12 JM109-pBSNima; carril 5, *E. coli* K12 JM109-pEANima.

Cuando las enzimas recombinantes fueron puestas a reaccionar con quitina coloidal se generaron quito-oligosacáridos con grados de polimerización de 3 y 5, los cuales presentaron actividad inhibitoria contra diversas bacterias patógenas entre las que se incluyen *B. cereus* y *Staphylococcus* sp.

Conclusiones. (i) Las enzimas ChiA74 y ChiA Nima fueron generadas en una bacteria con el reconocimiento GRAS, la cual fue capaz de sintetizar, procesar y secretar a ChiA74 y ChiA Nima. (ii) La bacteria es capaz de producir enzimas recombinantes que se mantienen estables y son capaces de generar quito-oligosacáridos con propiedades antibacterianas.

Agradecimiento. A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado de la Universidad de Guanajuato por el apoyo financiero.

Bibliografía.

1. Barboza-Corona JE, Gutierrez-Acosta OB, Imperial-Cervantes M, Bideshi DK, de la Fuente-Salcido N, Bautista-Justo M, and R. Salcedo-Hernández (2008) *J Appl Microbiol* 105(5): 1511-1520.
2. Ortiz-Rodríguez T, de la Fuente-Salcido N, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE (2010) *Lett Appl Microbiol* 51:184-190.