

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LA QUITINASA DEL FRUTO DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) VARIEDAD MARADOL

Acilegna Janette Castillo-Sánchez¹, José Juan Virgen-Ortiz², Juan Alberto Osuna-Castro³
¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Coquimatlán, Colima, C.P. 28400,
²CONACYT - Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. - CIDAM, Morelia, Michoacán, C.P. 58341, ³Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Tecomán, Colima, C.P. 28100. acilegnajcs@ucol.mx

Palabras clave: quitinasa, Michaelis-Menten, 4-nitrofenil-N-acetilglucosamina

Introducción. Las quitinasas son inhibidoras del crecimiento de hongos fitopatógenos, al hidrolizar los enlaces glicosídicos β -(1,4) del N-acetilglucosamina de la quitina, además de producir quitooligosacáridos (COS), que tienen aplicaciones en la agricultura, industria y la salud humana. Sin embargo, se recurre a métodos químicos para la obtención de COS así como para el control de enfermedades causadas por hongos. El uso de quitinasas puede ser una alternativa ambientalmente amigable a los métodos químicos tradicionales. El propósito de este trabajo es purificar la quitinasa de frutos de papaya Maradol y estudiar sus características bioquímicas y cinéticas, para profundizar en el conocimiento de su función, que permita plantear estrategias para la producción de COS y sugerir a dicha enzima como agente de control biológico de patógenos fúngicos de plantas de interés agroalimentario.

Metodología. La extracción y precipitación se realizó a partir de un fruto maduro libre de patógenos y se purificó la enzima mediante cromatografía CM-Sepharose (1). La pureza y peso molecular (PM) se visualizaron por movilidad relativa en geles SDS-PAGE (2) mientras que, para determinar la presencia de glicosilaciones se utilizó reactivo de Schiff (3). Se calculó la velocidad de reacción específica (V_o) por un método colorimétrico usando 4-nitrofenil-N-acetilglucosamina (pNF-GlcNAc) como sustrato; con el que también se determinó la temperatura óptima (T_o) y pH óptimo (pH_o) de reacción, el efecto de iones y la cinética enzimática, la cual fue evaluada a distintas temperaturas y concentraciones de sustrato con la ecuación de Michaelis-Menten.

Resultados. Se obtuvo la quitinasa pura con 2 bandas de PMs de ~29.42 y 25.81 kDa en SDS-PAGE (Fig. 1a), no presentó glicosilaciones (Fig. 1b) y tuvo una T_o de 52°C con V_o de 0.83 $\mu\text{mol pNF/mg. min}$ (100%), mientras que el pH_o fue de 4 con V_o de 0.88 $\mu\text{mol pNF/ mg. min}$ a 52°C. Se encontró que el Hg^{2+} inhibe completamente la actividad enzimática, mientras que Cu^{2+} provoca una disminución del 75%.

Los mejores parámetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$, K_{cat} y eficiencia catalítica) se presentaron a la T_o (Tabla 1).

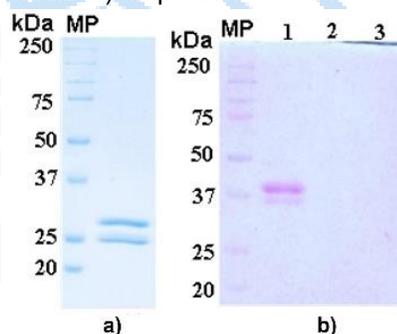


Fig. 1. a) Quitinasa pura, MP: Marcador de peso molecular en kDa b) Gel de glicoproteínas; 1: control positivo; 2: control negativo; 3: quitinasa pura.

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos usando la ecuación de Michaelis-Menten.

T (°C)	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Kcat (s^{-1})	Kcat/Km ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
34	0.62 ± 0.09	1.47 ± 0.04	3.9	6.22
40	3.22 ± 0.41	3.32 ± 0.15	8.7	2.70
46	3.54 ± 0.38	5.76 ± 0.22	15.1	4.26
52	3.49 ± 0.32	9.78 ± 0.34	25.6	7.34

Conclusiones. Se purificó en un solo paso una quitinasa nativa clase IV no glicosilada con dos monómeros, con condiciones óptimas de 52°C y pH 4; presentó comportamiento cinético Michaelis-Menten y es la primera quitinasa que se caracteriza bioquímica y cinéticamente empleando el sustrato pNF-GlcNAc.

Agradecimiento. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico (782796) para la realización de este proyecto.

Bibliografía.

Ali, Z. M., Ng, S., Othman, R. y Lazan H. (1998). *Physiologia Plantarum*, 104, 105-115.
 Laemmli, U. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
 Packer, N. H., Ball, M. S., Devine, P. L., y Patton, W. F. (2002). Detection of glycoproteins in gels and blots. En: *The protein protocols handbook*. Walker, J. M. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 761-763.