EFECTO DE LA QUITINASA CHIA 74 SOBRE LEVADURAS SILVESTRES AISLADAS DE UN QUESO ARTESANAL

M. Rico-Vela [a*], Y. Ceballos-Polina [a], R.G. Campos-Montiel[b], J.E. Barboza-Corona[c], R. Salcedo-Hernández[c].

[a] Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. [b] Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario s/n Km.1 C.P. 43760, Tulancingo, Hgo., México. [c] Departamento de Alimentos División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. *monicaa_rive@hotmail.com

RESUMEN:
Algunas especies de hongos son útiles en la elaboración de queso, sin embargo, otras pueden ser causantes de deterioro, cambio de sabor y consistencia. La pared de los hongos puede ser un blanco para atacarlos, está compuesta básicamente de proteínas y polisacáridos, entre los cuales destaca la quitina. Dada la importancia de la quitina en la estructura de la pared, las quitinasas son una buena opción como bioconservadores en alimentos. Por otro lado, *Bacillus thuringiensis*, es una importante alternativa biotecnológica, primero como un bioinsecticida y segundo como un sistema genéticamente bien caracterizado; entre las que se encuentran sus quitinasas. Actualmente estamos estudiando la capacidad de la quitinasa ChiA 74 de como una alternativa contra hongos deteriodadores de quesos. En este trabajo presentamos el efecto de la quitinasa recombinante ChiA 74 Δsp-6H en la morgología de 5 cepas de hongos aislados de un queso artesanal en deterioro.

ABSTRACT:
Some species of fungi are useful in the manufacture of cheese, however, others may be causing deterioration, change in taste and texture. Fungi wall could be a target for attack them, it is basically composed of proteins and polysaccharides, chitin among them. Given the chitin importance in the structure of the wall, chitinases are a good choice as food bioconservative. Furthermore, Bacillus thuringiensis, is an important alternative biotechnology, first as a biopesticide and second as a genetically well characterized system with other biotechnological potential; among which are their chitinases. We are currently studying the ability of chia 74 chitinase as an effective alternative against fungal spoilage of cheese. This paper presents the effect of recombinant chitinase chia 74 Δsp-6H in the morphology of 5 strains of fungi isolated from a deteriorated artisanal cheese.

Palabras clave: levaduras, queso, quitinasa.
Keywords: yeast, cheese, chitinase.
Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN
Los hongos (filamentosos y levaduriformes) se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, pueden encontrarse en la flora normal de algunos alimentos, o presentarse por malas prácticas de manufactura En el caso particular de los derivados lácteos, contaminaciones por hongos pueden darse desde el manejo del ganado lechero, hasta la distribución de los productos. Algunas especies de hongos

pueden ser inocuos, incluso útiles en la elaboración de quesos artesanales, sin embargo, otros pueden ser causantes de deterioro, patógenas (*v.g. Candida* spp.) o productoras de micotoxinas. Aunado a esto, causan malos olores, sabores y cambios de coloración en los alimentos, en particular en quesos. Razones por las cuales es importante investigar alternativas que refuercen los métodos estándar de conservación, y en particular que sustituyan el uso de conservadores químicos.

Un factor importante en la búsqueda de un método para evitar el crecimiento de organismos, potencialmente deterioradores, es atacar un punto de su fisiología o estructura que no sea común al ser humano. Es decir, seleccionar un blanco contra el que se pueda dirigir un "ataque", de tal manera que el "arma" no afecte al consumidor; la pared fúngica es un blanco importante, debido a que las células humanas carecen de esa estructura. La pared de los hongos está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, glucanas y mananas. Las proteínas de la pared generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida (Portón, 2008). De entre los polisacáridos de la pared fúngica la quitina ocupa un lugar destacado.

La quitina es uno de los compuestos orgánicos más abundantes de la naturaleza, después de la celulosa y es un componente esencial (además de la pared de hongos), del exoesqueleto los artrópodos, como insectos y crustáceos. La quitina está compuesta por unidades de N-acetil glucosamina polimerizada por la enzima quitinsintetasa, resultando un polímero lineal con enlaces β 1-4. En el caso particular de los hongos, la quitina se deposita en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica. El contenido en quitina de la pared fúngica varía según el tipo de hogo y de su fase morfológica; representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de algunas levaduras mientras que en los hongos filamentosos varía del 10 al 20% (Portón, 2008). Dada su importancia en la estructura de la pared, la síntesis de quitina es una buena opción en la búsqueda de antifúngicos, y una opción en la búsqueda de aditivos naturales para alimentos, que auxilien su conservación. Una característica esencial del crecimiento de los hongos es que los polisacáridos de la pared (rígida por naturaleza), es el equilibrio entre la degradación de dichos polisacáridos y la síntesis de nuevos componentes, de tal manera que no se comprometa la estabilidad de la célula fúngica. En el caso particular de la quitina cristlana, es muy lenta su degradación (forma estructural de la pared), sin embargo, la quitina sintetizada *de novo*, es más susceptible al ataque de quitinasas, razón por la cual estas enzimas pueden constituir una herramienta para controlar el crecimiento de éstos microorganismo, una opción son las quitinasas bacterianas.

En nuestro grupo de investigación hemos estudiamos la endoquitinasa ChiA74 de *Bacillus thuringiensis* sub sp. *Israelensis*, el gen *chiA 74* ha sido clonado y modificado para mejorar su expresión y agilizar su purificación, en la primera modificación se elimina la secuencia del péptido señal, lo que resulta en su acumulación en citoplasma, en segundo lugar se añade una etiqueta de 6 Histidinas, lo que permite

purificar la enzima en un solo paso mediante cromatografía de afinidad. En este trabajo mostramos el estudio del efecto de la quitinasa ChiA 74 Δsp-6H sobre el desarrollo de tres cepas fúngicas levaduriformes y 2 cepas pseudo miliares aisladas de un queso en proceso de deterioro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una muestra de queso artesanal de Manuel Villalongin, Michoacán, adquirido en una miscelánea local y con muestras de deteriorio, fue usado como material para el aislamiento de hongos. Se tomó una muestra de 1 gr de queso y se dispersó en 9 ml de agua peptonada, se hicieron una serie de diluciones 1:10 y se sembraron 100 µL de cada dilución en agar papa dextrosa. Pasadas 24 horas se seleccionaron colonias aisladas con diferencias aparentes y cada una se sembró en agar papa dextrosa colonial y morfología con muestras teñidas con azul de algodón lactofenol, al microscopio compuesto-en campo claro.

Expresión y purificación de ChiA74Δsp

La cepa recombinante *Escherichia coli* BL21 Rosetta2/pCold I-*chiA74Δsp* (Barboza *et al.* 2014) se cultivó toda la noche en 2.5 ml de caldo de Luria-Bertani suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/mL), y después se transfirió a 250 mL de medio fresco suplementado con los mismos antibióticos. El cultivo se dejó crecer a 37°C y 200 rpm hasta una $O.D._{600}$ de 0.5 ±0.1. A continuación, el cultivo se incubo a 16°C durante 30 min, añadiendo IPTG con una concentración final de 0.5 mM, la incubación continuó a 16°C por otras 16 horas. El cultivo se centrifugó 3000 rpm 5 minutos y el sobrenadante se descartó Casados et al. 2014. El sedimento se resuspendió en 10 mL de PBS 1x (NaCl 140 mM, NaH_2PO_4 2.8 mM, KH_2PO_4 7.2 mM, imidazol 10 mM). Luego la suspensión de bacterias se rompió con ultrasonido con tres pulsos de 30 s, una amplitud de 30 Hz en baño de hielo y periódos de reposo de 1 minuto. El extracto se centrifugó a 4°C por 30 min a 13.000 g y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante fue agitado lentamente en frío y se añadió 2.0 mL de una suspensión de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) y se incubó por una hora. La resina de agarosa Ni-NTA fue recuperada pro centrifugando en tubos de fondo cónico de 50 Ml (500 RPM por un minuto en un rotor de columpio), se desechó el sobrenadante y la resina se empacó en columna en una jeringa de 3.0 mL con soporte de papel filtro del diámetro de la columna. La resina de Ni-NTA se lavó con 15 mL de Buffer de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM) y la quitinasa se recuperó en fracciones de 0.5 mL con Buffer de elusión (NaH_2PO_4 10 mM, imidazol 250 mM). Las fracciones con mayor actividad quitinolítica se juntaron y se dializaron con Fosfatos de potasio 10 mM pH 6.8.

Determinación de la actividad de las quitinas bacterianas usando sustratos sintéticos

La actividad endoquitinasa se determinó en ensayos por triplicado a 37°C en 100 mM buffer fosfato, pH 7, usando el sustrato 4-metilumbeliferil β-D-N, N´, N´´-triacetyl chitotrioside (4-MUGlcNAc3) (Sigma). La cantidad de 4-MU liberado midió fluorométricamente (excitación a 360 nm y emisión a 455 nm) con el Sistema de

Detección de Glomax Multi Jr. (Promega, Sunnyvale CA, EE.UU.) utilizando una curva estándar de 4-MU. Una unidad (U) de actividad quitinolítica se define como la cantidad de enzima requerida para liberar de 1 µmol de 4-metilumbeliferona en 1 h (Casados *et al*. 2014).

Micro cultivos

En una caja Petri estéril, en el fondo se colocó papel filtro y se le agrego 3 ml de agua estéril para mantener la humedad relativa al 100%, se puso varilla de vidrio en forma de "V" y sobre esta un porta-objetos en el que se agregó YPD (30 µl), se inoculó por punción a partir de una colonia aislada, se agregaron 1.476 U de la quitinasa ChiA74Δsp en 20 µL, al control se le agregó el mismo volumen de buffer de fosfato de potasio 10 mM pH 6.8. Se dejaron a temperatura ambiente por toda la noche y se observaron al microscopio, teñidas con azul de algodón-lactofenol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hongos aislados y selección del material

De un conjunto inicial de 35 cepas aisladas se eliminaron 13 que no fueron capaces de crecer en pH3.0 (PDA-tartárico), a partir de las 22 cepas restante se seleccionaron, 5 cepas. Las cepas seleccionadas se denominaron 1Q, 1O 4H, 4IR y 5Ca. Las cepas 1Q, 4H y 4IR, fueron levaduras, no se detectó la formación de micelio o psudomicelio en las condiciones usadas. La cepa 4IR además de ser levaduriforme, presentó coloración roja tanto en medio sólido como líquido, por lo que es probable que pertenezca al género *Rhodotorula*, además tuvo un tamaño de poco más de 20µM y forma ovoide, características compatibles con el género. Las cepas 1O y 5Can, crecieron en medio líquido con apariencia de micelio septado, sin embargo las células alargadas se fraccionan generando gran cantidad de células alargadas (alrededor de 100 µm) por lo que el crecimiento observado puede ser calificado de pseudo micelio. A pesar de las simulitudes de 1O y 5Can al ser observadas al microscopio, la primera presentó colonias lisas y 5Can colonias aterciopeladas expansivas, lo que inicialmente fue interpretado como crecimiento micelial. Hasta el momento tenemos 5 cepas con claras diferencias, sin embargo, hace falta identificar los hongos estudiados, para ello hemos aislado el ADN de las 5 cepas seleccionas para amplificar los ITS y secuenciarlos, con el fin de hacer una identificación lo más precisa posible.

Producción de quitinasas y actividad

Escherichia coli recombinante (*E. coli* BL21 Rosetta2/pCold I-chiA74Δsp) se cultivó en condiciones de inducción con IPTG y frio y ChiA74Δsp se obtuvo después de la ruptura celular de acuerdo al protocolo arriba descrito. La preparación tuvo una actividad de 73.76 U/ml de muestra, con la cual se desafiaron las 5 cepas de hongos seleccionadas.

Efecto de ChiA 74 Δsp sobre la morfología de los hongos

Fue posible observar daño producido por la quitinasa ChiA 74 recombinante; en general se observaron (ver Figura 1) cambios en la morfología, vacuo-lizacion y células que no se tiñeron (la menor fijación del azul de algodón se asocia con una disminución del contenido de quitina) Se observó que la quitinasa ChiA 74 en la cepa H4 produjo disminución de tamaño promedio en las levaduras maduras y se observó una población de células pequeñas poco teñidas (probablemente levaduras que al desprenderse de la célula madre no pudieron continuar su desarrollo). En el caso de la cepa 1Q, el efecto no fue tan evidente, aunque se observó una cantidad discreta de células que aparentemente se lisaron (flechas negras), una mayor aglutinación y un aumento de levaduras pequeñas con tinción deficiente. Para de las levaduras 4IR, el efecto fue más claro; una disminución de tamaño, células, vacuolizadas y células lisadas (flechas negras). Se observaron dos cepas que crecen en medio líquido como

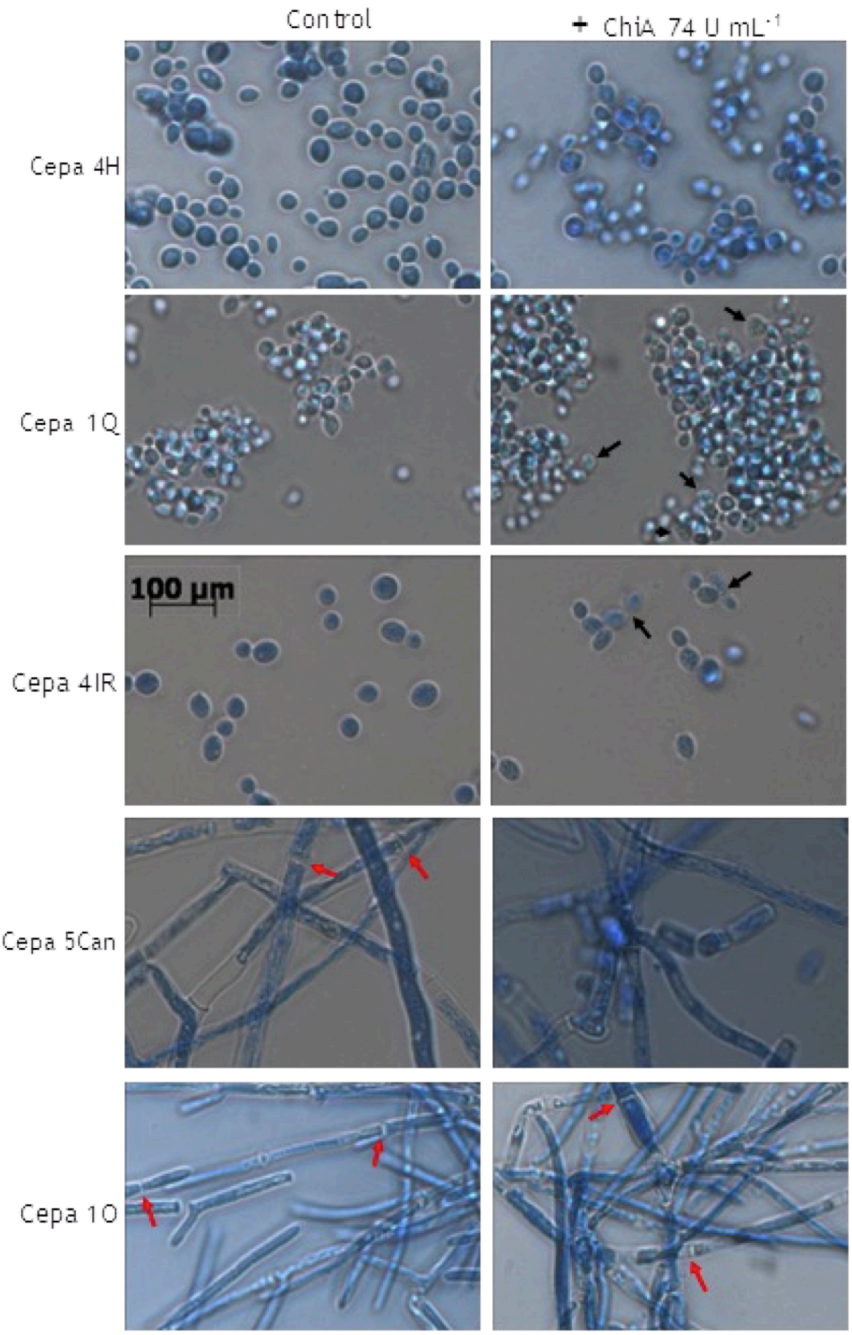

Figura 1. Respuesta de hongos aislados de un queso en deterioro a la presencia de ChiA 74 Δsp-6H. Cada cepa fue crecida en microcultivo y desafiada con quitinasa aislada. Las flechas negras muestran levaduras aparentemente lisadas, las flechas rojas señalas algunos ejemplos de septos.

pseudomicelio (5Can y 1O), el psedomicelo formó septos (flechas rojas) por los que tienden a separarse levaduras de gran tamaño (más de 100 µm) de forma rectangular. La quitinasa ChiA74Δsp produjo efectos visibles en la morfología de ambas cepas: aumento del diámetro de las células, así como evidente deformación y una tendencia desprender levaduras de menor tamaño. Así mismo se observó una mayor tendencia a la vacuolización y pseudohifas que fijaron poco azul de algodón. En general se observó que las 5 cepas probadas respondieron a la qutinasa, las alteraciones se observaron en células que crecieron más de 16 horas, en estado estacionario; por lo que es probable que la enzima mantuviera su efecto por varias horas aún a 28°C. El trabajo posterior tiene múltiples vertientes: medir el efecto de la quitinasa durante el crecimiento exponencial así como los cambios morfológicos, determinar para cada cepa las dosis óptimas de quitinasa, entre otras posibilidades. Es importante señalar que diversas cepas de Rhodotórula son patógenas

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten concluir que la quitinasa ChiA74Δsp es una enzima que puede ser útil como bioconservador para de inhibir o restringir el crecimiento de hongos en alimentos, no obstante, su uso directamente en la masa del alimento sería muy costoso. Una alternativa importante es el uso de la quitinasa en biopelíulas, dado que la principal fuente de contaminación de los alimentos por hongos se da en la superficie de los alimentos. Por lo que la investigación se dirigirá al estudio de las condiciones en las cuales la quitinasa ChiA74Δsp pueda ser usada como bioconservador. La diversidad de hongos aislados de un queso artesanal, muestra la importancia de continuar buscando alternativas para su control en alimentos. Alternativas que, por supuesto, complemente las buenas prácticas de manofactura.

BIBLIOGRAFÍA

Barboza-Corona, J.E., Delgadillo-Ángeles, J.L., Castañeda-Ram!ırez, J.C., Barboza-P!erez, U.E., Casados-Vázquez, L.E., Bideshi, D.K. and del Rincón-Castro, M.C. (2014) *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 as a factory to synthesize alkali-labile ChiA74Δsp chitinase inclusions, Cry crystals and spores for applied use. Microb Cell Fact. 13, 15.

Casados-Vázquez LE, Avila-Cabrera S, Bideshi D, Barboza-Corona JE (2015) Heterologous expression, purification and biochemical characterization of endochitinase ChiA74 from *Bacillus thuringiensis.* Protein Expr Purif. 109:99-105

Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina (2008). Rev Iberoam-Micol. 25: 78-82