



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ZIMOGRÁFICO PARA LA  
CARACTERIZACIÓN DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD DE N-  
ACETILGLUCOSAMINIDASA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**

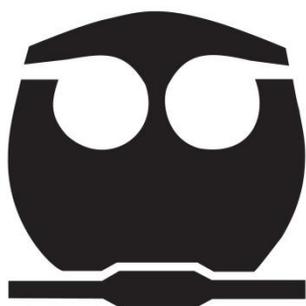
**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**PAOLA ANDREA BARBOSA GONZÁLEZ**

**MEXICO, D.F.**

**2015**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE** Profesor Agustín López Munguía Canales

**VOCAL** Profesor Eleazar Martínez Barajas

**SECRETARIO** Profesor Amelia María de Guadalupe Farrés  
González-Saravia

**1° SUPLENTE** Profesor Carolina Peña Montes

**2° SUPLENTE** Profesor Carmina Montiel Pacheco

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 312,  
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto “E”, Facultad  
de Química, Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad  
Universitaria, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA**

---

**DRA. AMELIA MARÍA GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA**

**SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**DR. ISRAEL GARCÍA CANO**

**SUSTENTANTE**

---

**PAOLA ANDREA BARBOSA GONZÁLEZ**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> -----	2
<b>2. GENERALIDADES</b> -----	5
2.1 Las enzimas-----	5
2.2 N-acetilglucosaminidasas-----	7
2.3 Peptidoglucano hidrolasas (PGHs)-----	12
2.4 Técnicas de detección de N-acetilglucosaminidasas-----	17
2.5 Validación de métodos analíticos-----	21
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> -----	24
<b>3. HIPÓTESIS</b> -----	26
<b>4. OBJETIVOS</b> -----	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	27
6.1 Diseño del método zimográfico para detección de N-acetilglucosaminidasas usando 4-NP-NAG-----	27
6.2. Validación del método zimográfico para detección de N-acetilglucosaminidasas usando 4-NP-NAG-----	29
6.3 Detección de la actividad N-acetilglucosaminidasa de la PGH de 99-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 nativa y recombinante en zimograma con 4-NP-NAG-----	33
6.4 Caracterización bioquímica de la PGH de 99-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 de 99-kDa recombinante en zimograma con 4-NP-NAG-----	38
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> -----	40
7.1 Diseño del método zimográfico para detección de N-acetilglucosaminidasas usando 4-NP-NAG-----	40
7.2 Validación del método zimográfico para detección de N-acetilglucosaminidasas usando 4-NP-NAG-----	42
7.3 Detección de la actividad de la N-acetilglucosaminidasa de 99-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 nativa y recombinante-----	52
7.4 Caracterización bioquímica de la N-acetilglucosaminidasa de 99-kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042 recombinante-----	54
<b>7. CONCLUSIONES</b> -----	64
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> -----	65

## RESUMEN

Las N-acetilglucosaminidasas son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de enlaces glucosídicos en moléculas que contienen residuos con grupos N-acetil- $\beta$ -D-hexosamina. En las bacterias, pueden actuar como peptidoglucano hidrolasas (PGHs), enzimas cuya función principal es llevar a cabo la hidrólisis del peptidoglucano, lo cual ha permitido que algunas de ellas inhiban el desarrollo de microorganismos patógenos (Callewaerth *et al.*, 2011).

*Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 es reconocida por su efecto bioconservador en embutidos madurados (Rivera, 2004). Estudios recientes (García-Cano *et al.*, 2011) demostraron que esta cepa sintetiza una PGH de 99-kDa con efecto inhibitorio para el crecimiento de diversos microorganismos patógenos. Dicha proteína fue secuenciada y se determinó la presencia de dos sitios catalíticos: uno con actividad de N-acetilglucosaminidasa y otro, de amidasa. Esta enzima bifuncional fue clonada y expresada en un sistema heterólogo (García-Cano, 2013).

El método más utilizado para la detección de PGHs es la zimografía con *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato (Leclerc y Asselin, 1989), sin embargo, éste no brinda información acerca de la especificidad de la enzima, pues es imposible saber que enlace del peptidoglucano es el que se hidrolizó. Por tal motivo esta tesis tuvo como objetivo diseñar y validar un método zimográfico que permita al mismo tiempo la detección y determinación del peso molecular de enzimas con actividad de N-acetilglucosamina, mediante la hidrólisis de un sustrato sintético.

La primera fase experimental consistió en la determinación de las condiciones óptimas de detección y revelado del método zimográfico para la detección de N-acetilglucosaminidasas utilizando una enzima comercial. Una vez concluida esta etapa, la técnica se sometió a validación; algunos de los parámetros evaluados fueron: selectividad, linealidad, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

Con el fin de corroborar que la metodología establecida permitía la detección de PGHs con actividad de N-acetilglucosaminidasa, se evaluó la actividad de la enzima de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 nativa y recombinante. Por último, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la enzima N-acetilglucosaminidasa de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante mediante la técnica zimográfica anteriormente descrita y por espectrofotometría con el fin de determinar si existía diferencia entre los resultados arrojados por ambas metodologías, lo que ocurrió y parece deberse a problemas difusionales en la prueba en gel.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos Gram-positivos, microaerófilicos, no esporulados en forma de cocos o bacilos que son capaces de producir ácido láctico como principal metabolito ya sea por homofermentación o heterofermentación (De Vuyst y Van Damme, 1994; Klaenhamer *et al.*, 2002). Dentro de este grupo podemos encontrar a: *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las BAL y en especial los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* han sido tradicionalmente usados como cultivos iniciadores para la producción de una gran cantidad de alimentos y bebidas fermentados; ya que contribuyen a la producción de aromas, sabores y a la preservación de los mismos (De Vuyst y Van Damme, 1994); cabe destacar que este grupo también forma parte de la microbiota indígena humana, por ejemplo, el género *Streptococcus* está presente en la boca y la cavidad nasofaríngea, *Enterococcus* en los intestinos y *Lactobacillus* en la mucosa vaginal (Rehm *et al.*, 1993).

El género *Pediococcus* está conformado por BAL, con morfología cocoide, catalasa negativo, no móviles; que son conocidas por su habilidad de crecer a pH cercano a 5 y su resistencia a vancomicina (Holland *et al.*, 2011).

Hasta el momento se encuentran 12 especies descritas para este género: *P. acidilactici*, *P. argentinicus*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. lolii*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* y *P. stilesii*, los cuales son generalmente usados como cultivos iniciadores en la

fermentación de vegetales, ensilados, quesos, productos cárnicos y de panadería (Raccach, 2014).

**Tabla 1.** Alimentos fermentados en los que el género *Pediococcus* es usado como cultivo iniciador (De Vuyst y Van Damme, 1994).

Alimento	Microorganismo iniciador
Burong dalag ( pescado fermentado acompañado de arroz)	<i>P. pentosaceus</i>
Pepinillos	<i>P. pentosaceus</i>
Dosa (crepé especiada hecha a base de masa de arroz y de lentejas negras)	<i>P. pentosaceus</i>
Aceitunas	<i>P. pentosaceus</i>
Idli (crepé hecho a base de legumbres y lentejas negras)	<i>P. pentosaceus</i>
Bolonia de Lebanon ( embutido hecho de carne de vaca similar al salami)	<i>P. acidilactici</i>
Embutidos	<i>P. pentosaceus</i> y <i>P. acidilactici</i>
Ensilados	<i>P. acidilactici</i>
Sauerkraut (col agria)	<i>P. pentosaceus</i>

*Pediococcus* sp. ha mostrado ser productor de bacteriocinas (pediocinas), las cuales son sustancias termoestables con actividad antibacteriana, que han demostrado inhibir el crecimiento de algunos microorganismos patógenos Gram-positivos.

La pediocina A de *P. pentosaceus* y las pediocinas AcH y PA-1 producidas por *P. acidilactici* han sido las estudiadas con mayor detalle, dichas bacteriocinas han demostrado inhibir la proliferación de cepas de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Propionobacterium* y *Listeria*.

*P. acidilactici* ATCC 8042 es una cepa no patógena que se ha utilizado como cultivo iniciador de productos cárnicos madurados (Llorente, 1998) en los que se ha observado su efecto bioconservador e inhibidor del crecimiento de *S. aureus* y de mesófilos aerobios (Rivera, 2004), sin embargo, también existen reportes en

los que se indica que dicha cepa no es productora de pediocinas (Mora *et al.*,2000; Mora *et al.*,2003), por lo tanto la producción de PGHs resultó una posible respuesta a los efectos observados por *P. acidilactici* ATCC 8042 en los productos alimenticios donde se había evaluado.

En investigaciones realizadas anteriormente por el grupo de trabajo se reportó la producción de dos PGHs con pesos moleculares de 99-kDa y 110-kDa por parte de *P. acidilactici* ATCC 8042, la actividad antimicrobiana de dichas enzimas se evaluó en pruebas de difusión en agar contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. pyogenes*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Lactobacillus paracasei*, *S. typhimurium* y *Escherichia coli* con resultados positivos (García-Cano *et al.*, 2011; Velasco-Pérez, 2011; García-Cano, 2013)

García Cano (2013) secuenció ambas enzimas y encontró que la proteína de 99-kDa presentaba dos dominios correspondientes a una enzima con actividad de N-acetilglucoamidasas y otro dominio con actividad de N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa, ambas PGHs. En la misma investigación el gene que codifica para la producción de la enzima de 99-kDa se clonó y expresó en un sistema heterólogo, obteniendo resultados positivos para la producción de la misma.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 LAS ENZIMAS

Las enzimas son proteínas con función catalítica, es decir, que pueden acelerar la velocidad a la cual ocurren las reacciones químicas al transferir electrones, átomos o grupos funcionales, con una alta quimio-, regio- y estereoselectividad. Desempeñan un rol importante en múltiples procesos y productos biotecnológicos en industrias tan diversas como la alimentaria, la de elaboración de productos de limpieza, la textil, la papelera, la farmacéutica, etc. (Saha *et al.*, 2009). Las enzimas difieren de los catalizadores químicos en cuatro aspectos importantes (Voet *et al.*, 2009):

- 1. Mayor velocidad de reacción:** En general, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas son  $10^6$  a  $10^{12}$  veces más altas que las correspondientes reacciones no catalizadas y es al menos varios órdenes de magnitud mayor que la de las reacciones catalizadas con catalizadores químicos.
- 2. Condiciones de reacción moderadas:** Las reacciones catalizadas por enzimas se producen en condiciones relativamente moderadas; por el contrario de la catálisis química que a menudo requiere de temperaturas y presiones elevadas, además de pH extremos.
- 3. Mayor especificidad de reacción:** Las enzimas tienen un grado de especificidad mucho mayor respecto de las identidades de sus sustratos y sus productos que los catalizadores químicos; por lo que rara vez se generan productos secundarios.
- 4. Capacidad de regulación:** Las actividades catalíticas de muchas enzimas varían en respuesta de las concentraciones de sustancias distintas de sus sustratos. Entre los mecanismos de estos procesos regulatorios se incluyen el control alostérico, modificación covalente de las enzimas y variación de la cantidad de enzima sintetizada.

## Clasificación de las enzimas

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), establecieron el sistema EC (Enzyme Commission Number) como una herramienta para la clasificación de las enzimas, en el cual cada una de ellas posee un nombre sistemático de acuerdo a la reacción que cataliza así como un código formado por cuatro números separados por puntos, que indican la clase, la sub-clase, la sub-subclase y el número de serie de la enzima (Saha *et al.*, 2009).

Las seis principales clases de enzimas son las que se enlistan a continuación (Tabla 2):

**Tabla 2.** Principales clases de enzimas

Clasificación	Reacción catalizada
1.Oxidorreductasas	Transferencia de electrones del sustrato a otra molécula
2.Transferasas	Transferencia de grupos funcionales del sustrato a otra molécula
3.Hidrolasas	Transferencia de grupos funcionales del sustrato a una molécula de agua
4.Liasas	Eliminación de grupos funcionales del sustrato mediante la formación de dobles enlaces
5.Isomerasas	Transferencia de grupos funcionales de una posición a otra en la misma molécula
6.Ligasas	Adición de grupos funcionales a un sustrato

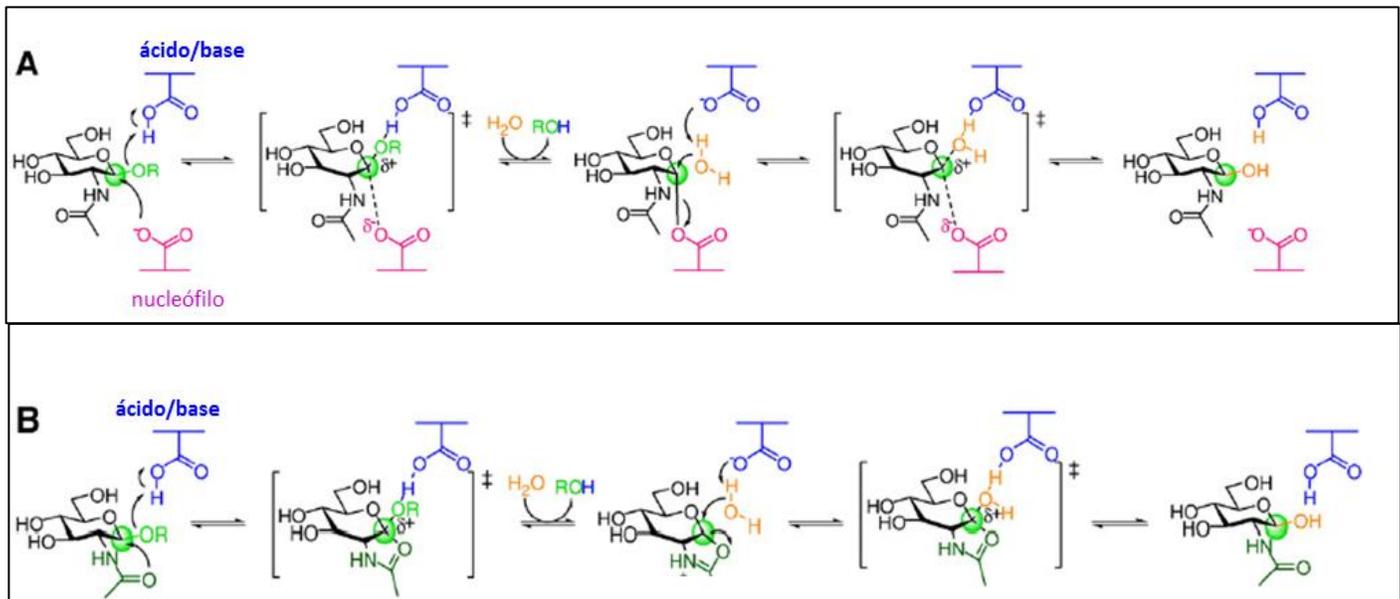
## Glicosidasas

Las glicosidasas o glicósido hidrolasas (EC 3.2.1.X) es el nombre con el que se conoce a un vasto grupo de enzimas que son capaces de hidrolizar enlaces glicosídicos y que tienen como sustrato un gran número de moléculas incluyendo oligosacáridos, polisacáridos, glicolípidos, glicoproteínas, glicoconjugados, etc. (Kötzler *et al.*, 2014)

En el sistema EC existen 165 tipos glicosidasas descritas, sin embargo, dicha clasificación resulta no satisfactoria cuando se desea establecer una relación estructura/función entre estas enzimas, por lo que en 1991 se propuso para este grupo el sistema GH (Henrissat, 1991), en el cual estas enzimas se han organizado de acuerdo a la similitud de secuencias de aminoácidos y estructura predicha en 113 familias (Vuong y Wilson, 2010). Dicho sistema permite la predicción del mecanismo de reacción, así como de los residuos presentes en el sitio catalítico (Davies y Henrissat, 1995).

### 2.2 N-ACETILGLUCOSAMINIDASAS

Las 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-hexopiranosido acetamidodeoxihexohidrolasas (E.C. 3.2.1.52, familia GH 3, 20 y 84) llamadas comúnmente como  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas, N-acetilglucosaminidasas o simplemente hexosaminidasas son glicósido hidrolasas que catalizan la ruptura de moléculas que contienen residuos de N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminas no reductores (Slámová *et al.*, 2010), presentando mayor afinidad por aquéllas con gluco- y galacto- configuración (Muramatsu 1968; Mega *et al.*, 1970). Los mecanismos descritos para la acción catalítica de dichas enzimas se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Mecanismos catalíticos propuestos para las hexosaminidasas (Tomado de Slámová *et al.*, 2010). A) Doble desplazamiento con retención de la configuración: en el primer paso, un nucleófilo enzimático ataca el centro anomérico del sustrato, formándose un intermediario glicosilado con la enzima. La liberación de la aglicona es catalizada por la acción de un grupo ácido. En el segundo paso el centro anomérico es atacado por una molécula de agua, dando lugar a la hidrólisis del complejo glicosil-enzima y un nuevo enlace glicosídico es formado. B) Doble desplazamiento con retención: el nucleófilo no es proporcionado por la enzima si no que el grupo 2-acetamido actúa como tal, formándose una oxazolina como intermediario

### Importancia de las N-acetilglucosaminidasas en los seres vivos

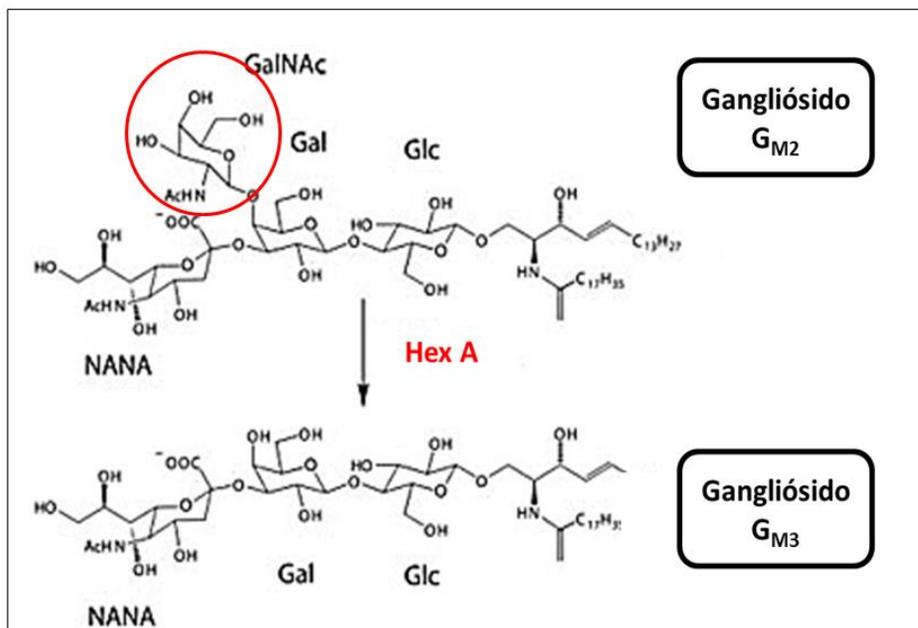
Las N-acetilglucosaminidasas se encuentran universalmente distribuidas en la naturaleza, sin embargo, presentan diversas funciones de acuerdo al organismo y localización tisular. A continuación se enlistan algunas de las principales:

#### N-acetilglucosaminidasas en los humanos.

En humanos la deficiencia de N-acetilglucosaminidasas, conocidas como Hex A y Hex B, provoca las enfermedades de Tay-Sachs y de Sandhoff, respectivamente (Mahuran, 1999). Dichos padecimientos son producidos por mutaciones en los genes que codifican para la síntesis de estas proteínas. La prevalencia de la

enfermedad de Tay-Sachs en la población mundial es de 1 caso por cada 300 habitantes, mientras que en comunidades de judíos Ashkenazi es de 1 por cada 30 (Lemieux *et al.*, 2006).

Las enzimas Hex A y Hex B se encuentran involucradas en la degradación de gangliósidos  $G_{M2}$  (Figura 2) en el sistema nervioso central y periférico, cuya acumulación, conlleva a la neurodegeneración que se ve reflejada en debilitamiento muscular, deficiencia mental, ceguera y muerte a edades tempranas. Actualmente no existe cura para este padecimiento (Mark *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Degradación de los gangliósidos  $G_{M2}$  por medio de la acción de Hex A (tomado y modificado de Lemieux *et al.*, 2006).

Hex A y Hex B también llevan a cabo la degradación de gangliósidos en otros órganos como riñón, próstata, laringe y glándulas salivales, en los cuales se ha observado una producción irregular de dichas enzimas en células cancerígenas, por lo que algunos autores proponen el uso de estas hexosaminidasas para

detección de carcinomas (Olszewska *et al.*, 2009; Costanzi *et al.*, 2014; Borzimi-Kluczyk *et al.*, 2009).

#### N-acetilglucosaminidasas en los animales.

Las N-acetilglucosaminidasas se encuentran involucradas en un gran número de funciones fisiológicas en el reino animal. Un ejemplo es la interacción inicial de los gametos durante la fertilización del oocito, la cual es realizada por una enzima perteneciente a este grupo que se localiza en la superficie del espermatozoide de los mamíferos, vertebrados inferiores e invertebrados (Zitta *et al.*, 2006; Cattaneo *et al.*, 2006; Pérez Martínez, 2007).

En los insectos, las hexosaminidasas juegan un papel importante durante su ciclo de vida, principalmente durante la renovación del exoesqueleto, por lo que se ha analizado el posible control y eliminación de especies que puedan ser perjudiciales para los seres humanos mediante la regulación de la expresión de dichas enzimas (Filho *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2006; Geisler *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009).

#### N-acetilglucosaminidasas en las plantas.

En plantas se ha observado que estas enzimas actúan durante la germinación del arroz y el maíz (Jin *et al.*, 2001; Oikawa *et al.*, 2003). Jagadeesh y colaboradores (2004) encontraron un aumento significativo en la actividad de las N-acetilglucosaminidasas y de otras glicosidasas durante la maduración de jitomates, pimientos y duraznos (Jagadeesh y Prabha, 2002; Jagadeesh *et al.*, 2004, Cao *et al.*, 2014), sin embargo, su rol durante estas etapas del ciclo vegetal aún no es claro.

#### N-acetilglucosaminidasas en los hongos.

Las hexosaminidasas de origen fúngico son bien conocidas por el rol que desempeñan en el sistema quitinolítico (Figura 3), responsable de la regulación del crecimiento y expansión de la hifa, y evitan la ruptura celular (Rast *et al.*, 1991),

así como por su función durante el micoparasitismo y el saprofitismo permitiendo a los hongos acceder fácilmente a los nutrientes (St Leger *et al.*, 1991).

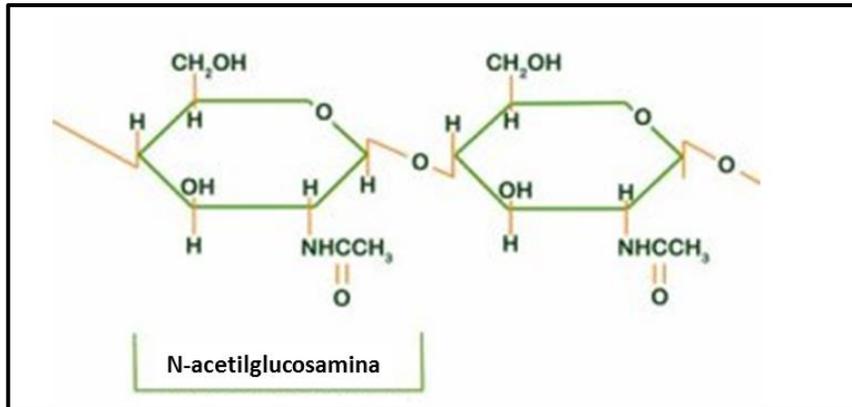


Figura 3. Estructura base de la quitina

### N-acetilglucosaminidasas en las bacterias

Las N-acetilglucosaminidasas producidas por bacterias han sido intensamente investigadas debido a la importancia que tiene en la producción de la pared celular de las mismas, así como en otras funciones necesarias para su supervivencia. Dichas enzimas, además, están involucradas en la degradación de quitina en bacterias quitinolíticas de origen marino como son *Vibrio furnissi* y *Alteromonas sp.* (Keyhani y Roseman, 1996; Tsujibo *et al.*, 1999).

En bacterias Gram-negativas productoras de NagZ  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, enzima que es capaz de hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido anhidro-N-acetilmurámico de la pared celular, se ha observado que los péptidos del ácido 1,6-anhídrido-N-acetilmurámico producidos de dicha reacción favorecen la actividad de la Amp  $\beta$ -lactamasa ocasionando resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Stubbs *et al.*, 2007; Balcewich *et al.*, 2009).

### 2.3 PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS (PGHs)

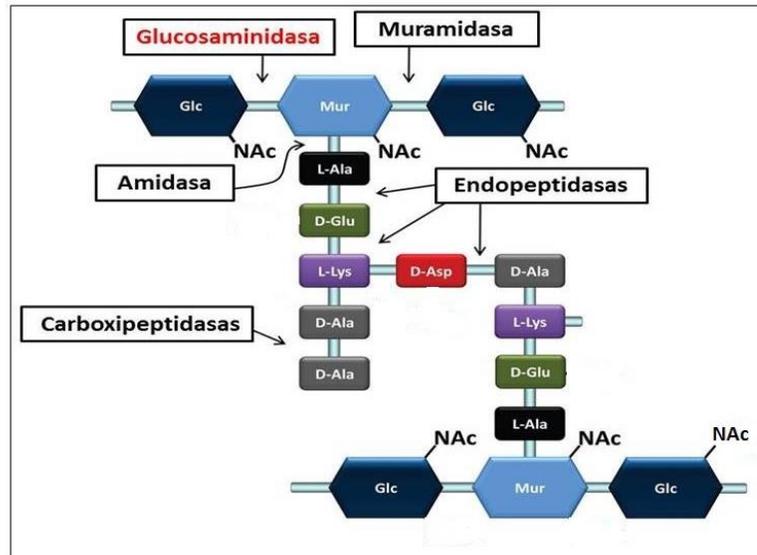
El peptidoglucano es uno de los principales componentes en la pared celular de las bacterias y el mayoritario en bacterias Gram-positivas, es un heteropolímero formado por cadenas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, que a su vez se asocian transversalmente por cadenas de aminoácidos, dichas cadenas interpeptídicas tienen típicamente L-alanina y D-glutamina en los primeros dos residuos y en el último D-alanina (Humann y Lenz, 2009). Se conocen más de 100 tipos diferentes de peptidoglucanos, cuya principal diferencia es la cadena de aminoácidos que lo conforman (Madigan *et al.*, 2003).

Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son un grupo amplio de enzimas que han sido encontrados en todos los grupos taxonómicos y en algunos virus, cuya función principal es llevar a cabo la hidrólisis del peptidoglucano o mureína en fragmentos solubles (Vollmer, 2008).

#### Clasificación de PGHs

Estas enzimas se pueden clasificar de acuerdo al enlace que hidrolizan en:

- N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasas (glucosaminidasa): hidrolizan el enlace glucosídico  $\beta$ -1,4 de la cadena de glicanos dejando un extremo N-acetilglucosamina reductor.
- N-acetil-muramoil-L-alanina-amidasa (amidasa): hidrolizan el enlace amídico entre el N-acetil-ácido murámico y el N-terminal de la L-alanina.
- Endopeptidasas y carboxipeptidasas: hidrolizan los enlaces peptídicos formados por los aminoácidos que unen transversalmente a las cadenas formadas por el N-acetil-ácido murámico y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina.
- N-acetil- $\beta$ -D-muramidasa (N-acetilmuramidasa o muramidasa): hidrolizan en el enlace  $\beta$ -1,4 entre el N-acetil-ácido murámico y la N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina dejando un extremo de ácido N-acetilmurámico libre.



**Figura 4.** Representación esquemática del peptidoglucano de *L. lactis*, donde se observan las enzimas responsables de la hidrólisis del mismo. (Tomado y modificado de Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014).

#### Función de las PGHs en los organismos que las sintetizan

En los animales, las PGHs juegan un papel clave en su sistema inmune innato proveyéndoles de protección contra algunos de los principales microorganismos patógenos como lo son *Listeria monocytogenes*, y algunas especies del género *Staphylococcus* y *Clostridium* (Callewaert *et al.*, 2011).

En las bacterias, las PGHs son también conocidas como endolisinas, y se encuentran involucradas en muchos de los procesos fisiológicos llevados a cabo por las mismas como el ensamblaje y desensamblaje de la pared celular, el crecimiento bacteriano, la división celular, esporulación, germinación, formación de biofilms, fijación de organelos en la superficie celular, etc. (Firdich y Gaynor, 2013), en la Tabla 3 se describe más detalladamente estas funciones

**Tabla 3.** Función de las PGHs en las bacterias (Vollmer *et al.*, 2008; Fridrich y Gaynor, 2013)

Función	Descripción
<b>Funciones en la fisiología celular bacteriana</b>	
Regulación del crecimiento celular	Remoción del exceso de pentapéptidos en el peptidoglucano recién formado
Elongación del sáculo de peptidoglucano	Ruptura de enlaces en el peptidoglucano para permitir la elongación del sáculo
Recambio del peptidoglucano	Liberación de fragmentos solubles de peptidoglucano que pueden ser reutilizados
Señalización	Inducción de la $\beta$ -lactamasa por productos de recambio
Separación celular	Ruptura del septum durante la división celular en bacterias Gram-negativas
Esporulación y germinación	Maduración del córtex de la espora y digestión del peptidoglucano de la célula madre para la liberación de la endospora
Ensamblaje del pili	Ensamblaje mediante PGHs especializadas en esta función
Ensamblaje del flagelo	
<b>Funciones en poblaciones bacterianas</b>	
Autólisis durante la transformación genética	Fraticidio de células no competentes en <i>S. pneumoniae</i>
Lisis durante el desarrollo	Formación de cuerpos fructificantes en <i>M. xhantus</i>
Formación de biopelículas	Adhesión inicial de células a soporte hidrofóbicos
Interacción patógeno-hospedero	Modificación de la estructura del peptidoglucano del patógeno para evitar la acción en el hospedero sobre el mismo

#### N-acetilglucosaminidasas con actividad tipo PGH.

A pesar de la gran variedad de N-acetilglucosaminidasas presentes en la naturaleza, sólo unas cuantas han sido identificadas como peptidoglucano hidrolasas, cabe destacar que existen pocos reportes de enzimas de este tipo que sean de origen distinto al bacteriano; es decir la mayoría de las N-acetilglucosaminidasas que son PGHs son autolisinas (Nelson *et al.*, 2012).

A continuación se enlistan algunas de las PGHs tipo N-acetilglucosaminidasas reportadas hasta el momento (Tabla 4).

**Tabla 4.** Ejemplo de PGHs tipo N-acetilglucosaminidasa descritas en la literatura

Origen :Enzima (s) producida	Referencia
<b><i>Bacillus subtilis</i></b> : Lyt D	Smith <i>et al.</i> , 2000
<b><i>Leuconostoc citreum</i></b> : mur 1 (con actividad de N-acetilglucosaminidasa y muramidasa)	Cibik <i>et al.</i> , 2001
<b><i>Lactococcus lactis</i></b> : Acm A, Acm B, Acm C y Acm D (hipotética)	Huard <i>et al.</i> , 2004
<b><i>Clostridium difficile</i></b> : Acd	Dhalluin <i>et al.</i> , 2005
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b> : Atl A	Eckert, <i>et al.</i> , 2006
<b><i>Staphylococcus warneri W</i></b> : Atl <sub>WM</sub> (con actividad de amidasa y N-acetilglucosaminidasa)	Yokoi <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Staphylococcus lugdunensis</i></b> : AtlL	Bourgeois <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Clostridium perfringens</i></b> : TcpG	Bantwal <i>et al.</i> , 2012

### Importancia de las PGHs en la industria alimentaria

Desde el descubrimiento de la lisozima (muramidasa) en 1922 por Alexander Fleming, estas enzimas han atraído el interés de los investigadores, debido a su posible aplicación como antibacterianos en productos alimenticios, ya que poseen una alta especificidad y acción bactericida comprobada contra microorganismos patógenos que pueden estar presentes en éstos.

La lisozima de huevo de gallina (HEWL por sus siglas en inglés) es la PGH más ampliamente estudiada y la única de este grupo aprobada para su uso en alimentos como aditivo alimentario, siendo su mayor campo de aplicación la prevención del abombamiento en quesos maduros y semi-maduros causado por *Clostridium tyrobutiricum* y el control de la actividad bacteriana en vinos (Callewaert *et al.*, 2011).

En Japón, la industria alimentaria ha tenido gran interés por la aplicación de la lisozima como conservador en diferentes productos, algunos ejemplos son (Proctor *et al.*, 1988):

- Taiyo Food Co. que elabora “tofu” con leche de soya a la cual se le ha adicionado lisozima.
- Kanebo Ltd cubre el interior de sus empaques con una capa de dicha enzima con el fin de evitar su contaminación microbiana.
- Eisai Company diseñó una mezcla de NaCl-lisozima que incrementa la vida de anaquel de los mariscos que comercializa, así como otra de ésteres p-hidroxibenzoicos-lisozima para conservación de vino y “sake”.
- Amicannon desarrolló procesos más eficaces de conservación en los que se mezclan diversos aditivos con lisozima para aumentar la vida de anaquel de “kimchi”, “sushi”, fideos y crema pastelera.

Es importante destacar que existe un gran número de investigaciones en las cuales se ha evaluado el efecto antimicrobiano de la lisozima contra diferentes microorganismos patógenos con buenos resultados (Facon y Skura, 1996; Chen *et al.*, 2005; lucci *et al.*, 2007; Koo *et al.*, 2007; Chai *et al.*; 2015); sin embargo, su aplicación a nivel industrial de estos procesos aún no se ha llevado a cabo.

El uso de lisozimas de otras fuentes contra microorganismos patógenos también ha sido evaluado. En el caso de la lisozima de ostra en alginato de calcio ha demostrado suprimir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella anatum* en muestras de salmón ahumado (Callewaert *et al.*, 2011) o la lisozima de ganso con efecto antimicrobiano contra *Salmonella enteriditis* (Naknukool *et al.*, 2009).

La lisostafina, endopeptidasa sintetizada por algunas especies del género *Staphylococcus*, es la segunda PGH más estudiada, su efecto bactericida ha sido evaluado principalmente contra *Staphylococcus aureus* (Szweda *et al.*, 2007), sin embargo, su uso como aditivo alimentario aún no es permitido debido a que la enzima deriva de una cepa catalogada como patógena.

El efecto de antimicrobiano de las PGHs ha sido principalmente evaluado contra bacterias Gram-positivas debido a que el peptidoglucano se localiza en la capa más superficial en dichos microorganismos, sin embargo, muchos patógenos causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias forman parte del grupo de los Gram-negativos, por lo que se ha valorado el uso de estas enzimas contra paredes celulares sensibilizadas de este tipo de bacterias (Briers *et al.*, 2011).

## 2.4 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINIDASAS

### Métodos de detección

Para la detección de enzimas con actividad de N-acetilglucosaminadas se han utilizado diferentes técnicas de detección, las cuales se describen y compilan en la siguiente tabla.

Tabla 5. Principales técnicas de detección de hexosaminidasas.

<b>Técnicas</b>	<b>Características de la técnica</b>	<b>Referencia</b>
<b>Espectrofotométricas</b>	-Técnica más común -Se basa en la hidrólisis de un sustrato cromogénico o fluorogénico y la emisión o absorción de energía por el cromóforo o fluoróforo liberado	Horak <i>et al.</i> , 1981; Shibata y Yagi, 1995.
<b>Inmunológicas</b>	-Técnica usada principalmente para la detección de HexA -Uso del anticuerpo comercial 634-7E4	Isaksson <i>et al.</i> , 1993
<b>Secuenciación</b>	-Comparación de la secuencia de aminoácidos que conforman a la enzima con distintas bases de datos y/o del gen que codifica para la proteína. -Acompañada generalmente de otra técnica que corrobore la actividad esperada	Hogenkamp <i>et al.</i> , 2008; Cao <i>et al.</i> , 2014; Ferrara <i>et al.</i> , 2014.
<b>Cromatografía</b>	-Principalmente para hexosaminidasas con actividad quitinolítica -Acoplada generalmente a MS	Koga <i>et al.</i> , 1998; Yang <i>et al.</i> , 2008.
<b>Zimográficas</b>	-Técnica similar a un SDS-PAGE en la cual se coloca el sustrato en el gel o en la solución de incubación -Detección de actividad y peso molecular de una o varias enzimas en una matriz -Sensible sólo a enzimas activas	Leclerc y Asselin, 1989; Lincoln <i>et al.</i> , 1994; Chen <i>et al.</i> , 1994; Chen <i>et al.</i> , 2011; Ferrara <i>et al.</i> , 2014.

## Sustratos

- Sustratos naturales

Para el estudio de las hexosaminidasas se han utilizado una gran cantidad de sustratos, como aquéllos que son hidrolizados por dichas enzimas en los sistemas biológicos, por ejemplo quitina (Koga *et al.*, 1998; Liao y Lin, 2008), gangliósidos G<sub>M2</sub> (Fuller *et al.*, 2014), liofilizados bacterianos de *Micrococcus lysodeikticus* (en los que la enzima provocaría la hidrólisis de la pared celular) (Leclerc y Asselin, 1989), sin embargo, éstos presentan algunas desventajas como: a) la dificultad para determinar si una enzima tipo N-acetilglucosaminidasa es la responsable de llevar a cabo la hidrólisis de los mismos; b) los complejos procesos necesarios para obtener o sintetizar estos sustratos; c) el costo que tienen algunos equipos usados para la detección de los productos de la reacción; d) el hecho de que no todas estas enzimas son capaces de hidrolizar al mismo sustrato. En la tabla 6 se muestran los sustratos de origen natural y el método de detección de la actividad de PGH.

**Tabla 6.** Principales sustratos naturales para detección de hexosaminidasas.

Sustrato	Detección	Referencia
Pared celular de <i>M. lysodeikticus</i>	Zimograma	Leclerc y Asselin, 1989
Quitina	Zimograma	Liao y Lin, 2008
Oligosacáridos de quitina	HPLC	Koga <i>et al.</i> , 1998
Gangliósido G <sub>M2</sub>	LC/ESI-MS/MS*	Fuller <i>et al.</i> , 2014
Peptidoglucano de <i>Bacillus subtilis</i> 168 HR	RP-HPLC/MALDI-TOF**	Dhalluin <i>et al.</i> , 2005

\*LC/ESI-MS/MS: Liquid Chromatography/ Electrospray Ionisation-Tandem Mass Spectrometry Quantification

\*\* Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography/ Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time of Flight

- Sustratos sintéticos

Con el fin de simplificar la determinación, cuantificación y caracterización de N-acetilglucosaminidasas en matrices complejas, se han diseñado análogos sintéticos cromogénicos y fluorogénicos a partir de los sustratos naturales de estas enzimas, obtenidos de la condensación en un compuesto cromóforo y una molécula de N-acetilglucosamina, los cuales al ser hidrolizados por dichas enzimas generan una respuesta capaz de ser detectada por métodos espectrofotométricos o zimográficos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Principales sustratos sintéticos para detección de hexosaminidasas

Sustrato	Detección	Producto de hidrólisis	Referencia
4-NP-NAG (4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina)	Espectrofotometría	4-nitrofenol (amarillo) $\lambda_{\text{abs máx}}$ (nm)=405	Shibata y Yagi, 1995
4-MU-NAG (4-metilumbeliferil-β-N-acetil-D-glucosamina)	Espectrofotometría	4-metilumbeliferona $\lambda_{\text{abs máx}}$ (nm)=366	Horak <i>et al.</i> , 1981
	Zimograma		Lincoln <i>et al.</i> , 1994
Naftol-AS-BI-NAG (Naftol-AS-BI-β-N-acetil-D-glucosamina)	Zimograma	Naftol-AS-BI (amarillo verdoso) $\lambda_{\text{abs máx}}$ (nm)=580	Chen <i>et al.</i> , 2011
X-NAG (5-bromo-4 cloro-3 indolil-N-acetil- β-D glucosamina)	Espectrofotometría	5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (azul) $\lambda_{\text{abs máx}}$ (nm)=515	Ferrara <i>et al.</i> , 2014

### Zimografía

La zimografía es una técnica de estudio para detectar la actividad y el peso molecular de una enzima sobre un gel de poliacrilamida, la cual puede ser observada por la aparición del producto o la desaparición del sustrato usando diferentes técnicas analíticas (Tabla 8).

El proceso tradicional para la elaboración de zimogramas consiste en la copolimerización del sustrato con la matriz de poliacrilamida en la cual las muestras son cargadas y sometidas a electroforesis en condiciones no reductoras, con o sin adición de SDS, el cual posteriormente se puede eliminar por tratamiento

con un detergente como el Tritón. Por último el gel es incubado con los cofactores y condiciones necesarias para que la enzima catalice la reacción (Vandooren *et al.*, 2013).

En contraste con las técnicas tradicionales para detectar actividad enzimática, los zimogramas son capaces de brindar información cualitativa y cuantitativa, acerca del peso molecular y la presencia de diversas enzimas con el mismo tipo de actividad presentes en una muestra, además a diferencia de la técnica de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), es capaz de discriminar entre las moléculas intactas y los productos degradados (Vandooren *et al.*, 2013).

**Tabla 8.** Técnicas zimográficas reportadas en la literatura para la detección de enzimas con posible actividad de hexosaminidasa.

Sustrato	Especificidad	Origen de la enzima de estudio	Referencia
Pared celular de <i>M. lysodeikticus</i>	PGHs	- <i>Bacillus sp.</i> - <i>Bacillus cereus</i> - <i>Bacillus megaterium</i> - <i>Bacillus subtilis</i> - <i>S. aureus</i> - <i>Clostridium perfringens</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i>	Leclerc y Asselin; 1989
Quitina	Quitinasas	- <i>Streptomyces griseus</i>	Liau <i>et al.</i> , 2008
4-MU-NAG	Hexosaminidasas	- <i>Agaricus bisporus</i> - <i>Aspergillus niger</i> - <i>Canavalia ensiformis</i> -Higado de <i>Bos taurus</i>	Lincoln <i>et al.</i> , 1994.
Naftol-AS-BI-NAG	Hexosaminidasas	- <i>Carica papaya</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011
X-NAG	Hexosaminidasas	- <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Ferrara <i>et al.</i> , 2014.

## 2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que es adecuado para los fines previstos. (Duffau *et al.*, 2010). Los métodos nuevos que se introduzcan en un laboratorio o que sean desarrollados en el mismo deberán validarse. Los métodos comercializados o normalizados requerirán al menos una verificación o validación parcial; en caso de que se introduzcan cambios notables, se necesitará una validación completa. (ONU, 2011).

Para realizar una validación es importante contar con un protocolo de validación aprobado, en el cual se describe el método a ser validado, se especifican los parámetros que deben de ser evaluados, los criterios de aceptación y los pasos a seguir en caso de que no se cumplan (ICH, 1996; FDA, 2013). Dicho protocolo deberá contener al menos:

- Alcance de la validación (método, analito, matrices y requerimientos del método)
- Diseño experimental: establecer la(s) muestra(s) a ser analizada(s): testigos reactivos, blanco matriz, material(es) de referencia, etc.
- El (los) parámetro(s) y pruebas a desarrollar
- Numero de análisis requeridos para cada prueba y/o parámetro.
- Criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación.
- Materiales, insumos y equipos necesarios para desarrollar la validación.

## Parámetros de validación

Los ensayos o mediciones realizadas durante la validación tienen como objetivo principal evaluar los siguientes parámetros (Karnes *et al.*, 1991; ICH, 1996; Duffau *et al.*, 2010; FDA, 2013):

### **-Selectividad**

Es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés.

### **-Linealidad**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

### **-Sensibilidad**

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición.

Se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.

### **-Límites**

*Límite de detección:* Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas.

*Límite de cuantificación:* Es la concentración más baja a la cual del analito puede cuantificarse con precisión y veracidad bajo las condiciones experimentales.

**-Sesgo (Exactitud)**

Es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de prueba aceptado o conocido

**-Repetibilidad (Precisión)**

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismo instrumentos y métodos en intervalos cortos de tiempo

**-Reproducibilidad (Precisión intermedia)**

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el proceso se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas, instrumentos diferentes, en un periodo largo de tiempo o cambiando cualquier condición

**-Robustez**

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la confiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas, se pueden obtener a través de éste resultados confiables. Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas. Entre las condiciones analíticas que podrían afectar a un método se encuentran:

\*Analistas

\*Equipos

\*Reactivos

\*pH

\*Temperatura

### 3. JUSTIFICACIÓN

La cepa *P. acidilactici* ATCC 8042 tiene un reconocido efecto antimicrobiano contra diversos organismos patógenos, el cual ha sido atribuido a dos enzimas con pesos moleculares de 99 y 110 kDa.

En 2013 García Cano secuenció ambas enzimas y encontró que la proteína de 99-kDa era una PGH que presentaba dos dominios, correspondientes a una enzima con actividad de N-acetilglucosaminidasa y otro dominio con actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. Dicha enzima también fue clonada y expresada en un sistema heterólogo.

La actividad de PGH de la enzima de 99 kDa ya había sido detectada anteriormente en zimograma contra *M. lysodeikticus*, mientras que la actividad de N-acetilglucosaminidasa para el extracto proteico que la contiene también fue evaluada por medio de espectrofotometría, usando 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (4-NP-NAG) como sustrato. Sin embargo, hasta el momento no existía un método que permitiera evaluar el peso molecular y la actividad de N-acetilglucosaminidasa ni tampoco que pudiera relacionar simultáneamente dicha actividad con el efecto lítico contra *M. lysodeikticus*, puesto que los zimogramas con *M. lysodeikticus* son “pruebas gruesas” que no permiten saber si la actividad lítica de la PGH de 99 kDa se debe al dominio de N-acetilglucosaminidasa o al de N-acetilmuramoil-L-alanin amidasa, y la espectrofotometría sólo es capaz de realizar una evaluación total de las N-acetilglucosaminidasas presentes en la muestra.

En esta investigación se propone el uso de una técnica zimográfica que permita la detección de la actividad de N-acetilglucosaminidasa específicamente y no de otras PGHs, fusionando la técnica espectrofotométrica para la detección de N-acetilglucosaminidasas y la zimografía con el fin de determinar si la enzima de 99-

kDa presenta esta actividad y si ésta es la responsable de la actividad lítica contra *M. lysodeikticus*

En la literatura existen reportes de zimogramas para detección de N-acetilglucosaminidasas usando sustratos naturales y sintéticos. Hasta el momento ninguna técnica ha sido validada y muchas de ellas presentan reportes incompletos del método. Se debe realizar la validación de la técnica zimográfica diseñada con el fin de corroborar que los resultados arrojados por la misma son confiables

#### 4. HIPÓTESIS

La PGH de 99-kDa con actividad de N-acetilglucosaminidasa producida por *P. acidilactici* ATCC 8042 puede ser detectada en zimogramas con 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (4-NP-NAG)

#### 5. OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL

Detectar la actividad de N-acetilglucosaminidasa de la PGH nativa y recombinante de 99-kDa producida por *P. acidilactici* ATCC 8042 por un método zimográfico específico para este tipo de enzimas.

##### OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar y validar un método zimográfico que permita la detección de n-acetilglucosaminidasas mediante la hidrólisis de un sustrato sintético
- detectar mediante el método zimográfico diseñado la actividad de N-acetilglucosaminidasa de la PGH de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 nativa y recombinante
- Caracterizar bioquímicamente la PGH de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 recombinante mediante el método zimográfico desarrollado en esta investigación y compararlo con los resultados obtenidos mediante espectrofotometría

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 DISEÑO DEL MÉTODO ZIMOGRÁFICO PARA DETECCIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINIDASAS USANDO 4-NP-NAG.

La primera etapa experimental consistió en la determinación de las condiciones de electroforesis e incubación óptimas para la detección de N-acetilglucosaminidasas; para la cual se utilizó una enzima comercial, N-acetilglucosaminidasa de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich®) de 99.7% de pureza como control positivo.

Los ensayos experimentales se diseñaron de acuerdo a las condiciones descritas en la literatura para la detección de hexosaminidasas por espectrofotometría usando 4-NP-NAG (Shibata y Yagi, 1995; Kimura *et al.*, 2002) y por zimograma utilizando otros sustratos (Lincoln *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2011; Ferrara *et al.*, 2014).

#### Elaboración de zimogramas con 4-NP-NAG.

Para la elaboración de zimogramas para la detección de N-acetilglucosaminidasas con 4-NP-NAG se siguió la metodología descrita para la elaboración de geles de poli(acrilamida) al 10% (Manual Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 Cell) empleando los siguientes reactivos: bis-acrilamida al 30%, Tris-HCl 2 M pH 8.8, SDS\*, agua desionizada, APS 10%, TEMED y la cantidad de 4-NP-NAG indicada en la tabla 9 en cada condición evaluada

La alícuota de control positivo a evaluar se diluyó en Tris-HCl 100 mM pH 8.0 hasta obtener un volumen de 30 µL, se le adicionaron 5 µL de buffer de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS\*, 2.5% de glicerol y 0.5% de azul de bromofenol) y se cargó en el gel, el cual se corrió a 120 V por 1:30 h.

\* Para los ensayos en condiciones nativas se siguió la metodología indicada anteriormente pero sin la adición de SDS en las soluciones utilizadas.

## Revelado de enzimas con actividad N-acetilglucosaminidasa

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para revelar la presencia de N-acetilglucosaminidasas en la muestra, se evaluaron amortiguadores con distinta composición, concentración y pH que se describen en la tabla 9. A cada gel se le adicionaron 30 mL del amortiguador a probar y se incubó con agitación a 60 rpm (Max Q™ 4000 Benchtop Orbital Shaker) por el tiempo y temperatura indicados, en aquellos ensayos donde se usaron dos o más soluciones, el gel se enjuagó con agua desionizada entre cada cambio de amortiguador.

**Tabla 9.** Condiciones experimentales probadas para la elaboración de zimogramas con 4-NP-NAG

Ensayo	Medio de incubación	[Buffer] (mM)	pH	[sustrato] <sub>gel</sub> (mg/mL)	Proteína/carril (µg)	t <sub>incubación</sub> (minutos)	T <sub>incubac</sub> (°C)		
<b>CONDICIONES DESNATURALIZANTES</b>									
1	Citrato de Sodio	100	4.8	0.35	10.5	15	37		
2							50		
3							37		
4			6.0				31.5	15	37
5									50
6									
7	1. Citrato de sodio 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 4.8 2. 10	0.35	10.5	15	37		
8		1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10						
9	1. Citrato de Sodio 2. Acetato de Sodio 3. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 50 3. 100	1. 4.8 2. 5.0 3. 10	0.35	10.5	15	25		
10	MOPS	100	6.0	0.35	10.5	15	25		
11							20	30	25
12									
13	1. Tritón X-100 2. Citrato de sodio	1. 1% 2. 100	1. ND 2. 6.0	0.35	10.5	15	25		
14	1. Tritón X-100 2. Acetato de Sodio	1. 1% 2. 50	1. ND 2. 5.0						
15	1. Tritón X-100 2. MOPS	1. 1% 2. 100	1. ND 2. 6.0						
								1. 15 2. 15	
<b>CONDICIONES NATIVAS</b>									
16	1. Citrato de sodio 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	0.35	10.5	15	1. 50 2. 37		
17	MOPS	20	6.0				30	50	
18		100							
19	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 20 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	
20		1. 100 2. 100							1. 30 2. 15

El ensayo que generó los mejores resultados se utilizó para las etapas experimentales posteriores

## 6.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ZIMOGRÁFICO PARA DETECCIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINIDASAS USANDO 4-NP-NAG.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la detección de enzimas con actividad N-acetilglucosaminidasa se evaluaron los siguientes parámetros con el fin de validar la metodología, la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software TotalLab Quant®

### Selectividad

Una prueba de selectividad comúnmente utilizada, consiste en analizar un mínimo de tres testigos reactivos (solución que contiene todos los reactivos usados en los mismos volúmenes y concentraciones, que son utilizados en el procesamiento de la muestra), tres blancos de matriz (matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado) y tres estándares de concentración conocida del analito.

Para determinar este parámetro se estableció como testigo reactivo la solución de Tris-HCl 100 mM pH 8.0, que sirvió para diluir todas las muestras que se cargaron en los zimogramas de 4-NP-NAG. El blanco reactivo se conformó por dos tipos de PGHs que podrían estar presentes en una matriz biológica que fuera a ser analizada por este método: lisozima (muramidasa) y lisostafina (endopeptidasa), de ambas se colocó la misma cantidad de enzima (3.5 µg). El estándar se preparó con una mezcla de lisozima, lisostafina y N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* (Sigma-Aldrich® 99.7% de pureza) en la misma cantidad (3.5 µg de cada una). Las muestras se cargaron por triplicado en zimogramas de 4-NP-NAG y se sometieron a las condiciones óptimas de incubación.

## Linealidad y Sensibilidad

Con el fin de determinar el intervalo de linealidad de la técnica, se evaluó por triplicado la intensidad de la respuesta generada por seis muestras con diferente cantidad de proteína de la enzima de referencia (N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis*); las soluciones probadas contenían: 0.875, 1.75, 2.1, 2.45, 3.5 y 10.5 µg de proteína; las muestras en las que al graficar la cantidad de proteína (µg) (x) vs intensidad de la respuesta (y) tuvieron una variación proporcional, se evaluaron 7 veces más, para tener un total de 10 repeticiones, con las que se llevó a cabo una regresión lineal. La pendiente obtenida de dicha función matemática correspondió a la sensibilidad del método.

## Límites

El límite de detección y el de cuantificación fueron evaluados de acuerdo al método propuesto por la ICH (International Conference Organization of Technical Requirements of Pharmaceutical Human Use) (1995 y 1996) y recomendado para electroforesis capilar por la ONU (2011).

El límite de detección corresponde a la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del mismo:

$$Y_{LD} = Y_B + 3Sb$$

El límite de cuantificación es la cantidad de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más diez veces la desviación estándar del mismo:

$$Y_{LC} = Y_B + 10Sb$$

La señal del blanco se evaluó por triplicado y la cantidad de analito que corresponde a  $Y_{LD}$  y  $Y_{LC}$  se calcularon usando la ecuación de la recta (aparta 5.2.2).

## Sesgo

Para evaluar este parámetro se comparó el peso molecular promedio de tres mediciones de cinco soluciones con diferente cantidad de enzima de referencia (1.75, 2.1, 2.45, 3.5 y 10.5 µg) con el peso molecular reportado en la literatura (Li *et al.*, 1970) para la N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* (100 kDa). Como referente del peso molecular se utilizó el marcador Broad-Range SDS-PAGE Standard.

El sesgo fue determinado con la siguiente función:

$$Sesgo = \overline{Peso\ molec}_{exp} - Peso\ molec\ de\ referencia$$

Una vez calculado el sesgo se determinó mediante la prueba de t de Student, si existía diferencia significativa entre las mediciones:

$$t = \frac{|\overline{Peso\ molec}_{exp} - Peso\ molec\ de\ referencia|}{s \sqrt{n}}$$

Donde:

S= desviación estándar

n= número de repeticiones

## Repetibilidad y Reproducibilidad

Con el fin determinar la repetibilidad se evaluó por triplicado la intensidad y el peso molecular generado por tres soluciones con diferente concentración de N-acetilglucosaminidasa de *C.ensiformis* de referencia (2.1, 2.45 y 3.5 µg) al someterlas a las condiciones óptimas de electroforesis e incubación, el experimento se repitió en dos días consecutivos.

Para la evaluación de la reproducibilidad, se llevó a cabo la misma metodología anteriormente descrita preparando nuevamente todos los reactivos para la

electroforesis para la elaboración de geles de electroforesis y dejando pasar dos semanas entre cada medición.

Los datos obtenidos en la fase experimental fueron usados para calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de varianza en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

### Robustez

Siguiendo la metodología descrita por Youden y Steiner (1975), se identificaron seis factores que pudieran tener un efecto significativo en el desempeño del método. Las condiciones a evaluadas fueron las siguientes.

**Tabla 10.** Condiciones probadas durante la determinación de la Robustez de la técnica

Condición variable			Análisis							
Tipo	Valor superior	Valor inferior	1	2	3	4	5	6	7	8
T <sub>incubac</sub> (°C)	50	37	50	50	50	50	37	37	37	37
t <sub>incubac</sub> (min)	60	30	60	60	30	30	60	60	30	30
pH <sub>incubac</sub>	7	6	7	6	7	6	7	6	7	6
Amortiguador <sub>incubac</sub>	MOPS (M)	MES (E)	M	M	E	E	E	E	M	M
Agitación	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO	SI	NO	SI
Amortiguador (mM)	40	20	40	20	20	40	40	20	20	40
Vol de amortiguador (mL)	100	30	100	30	30	100	30	100	100	30

El análisis estadístico de los datos se describe detalladamente en la sección de Resultados.

### 6.3 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD N-ACETILGLUCOSAMINIDASA DE LA PGH DE 99-kDa DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 NATIVA Y RECOMBINANTE EN ZIMOGRAMA CON 4-NP-NAG.

#### Cepas utilizadas

Las cepas usadas durante esta investigación, la procedencia y el medio de cultivo de preservación se describen en la siguiente tabla (Tabla 11). Todas las cepas se almacenaron a -20°C.

**Tabla 11.** Descripción de las cepas usadas

Cepa	Procedencia	Medio de almacenamiento
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	CINVESTAV, IPN	Medio MRS modificado/glicerol (80/20)
<i>E. coli</i> pET 19-99	García-Cano <i>et al.</i> , 2015	Medio LB/glicerol (80/20)
<i>M. lysodeikticus</i>	Sigma-Aldrich®	Producto liofilizado

#### Medios de cultivo utilizados

##### *Medio LB*

Todos los componentes de este medio (Tabla 12) se mezclan y esterilizan juntos a 121°C/10 lbs/15 min (Sterilizer SM300 Yamato).

**Tabla 12.** Medio LB (Luria-Bertani)

Componente	g/L
<b>Bacto triptona (DIFCO)</b>	10
<b>Extracto de levadura (DIFCO)</b>	5
<b>Cloruro de sodio (J.T. Baker)</b>	10
<b>pH=7.0±0.2</b>	

### Medio MRS modificado (Llorente, 1998)

Todos los componentes de este medio (Tabla 13) se esterilizan juntos a 121°C/10 lbs/15 min, con excepción del ácido ascórbico y la sacarosa, los cuales deben prepararse y esterilizarse por separado en las condiciones anteriormente descritas.

Tabla 13. Medio MRS modificado

Componente	g/L
Peptona proteosa	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Sacarosa	10
Tween 80	1 mL/L
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.25
Fosfato de potasio dibásico	2
Ácido ascórbico	1.5
pH=7±0.2	

### Extracción de la enzima nativa de *P. acidilactici* ATCC 8042

Siguiendo la metodología descrita por García Cano (2013), la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042 almacenada a -20°C se reactivó realizando un preinóculo al 1% en medio MRS modificado fresco, el cual se incubó estáticamente a 29°C por 24 h (Precision Gravity Convection Incubator Modelo 4), para posteriormente realizar una resiembra que se dejó crecer 12 h en las condiciones anteriormente descritas. A un matraz Fernbach con un litro de MRS modificado se le adicionó 1 mL de la fermentación de 12 h y se incubó a 29°C durante 8 h; a partir de este último medio inoculado se cosecharon las células, centrifugando el medio a 8500 rpm, 15 min a 4°C (Beckman Coulter Avanti J-25); el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 100 mL de amortiguador de extracción (10 mM de Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA, 10 mM NaCl y 2% SDS). La solución resultante se

calentó por 10 minutos a ebullición y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 15°C en el mismo equipo. Los restos celulares se desecharon, mientras que el sobrenadante que contenía las proteínas adheridas a membrana se congeló a -70°C para su liofilización (Labconco Freezone 4.5). La muestra se dializó con membrana de tamaño de corte de 50 kDa por 12 h a 4°C con agitación constante con el fin de eliminar la mayor cantidad de SDS de la muestra. El producto dializado se ultrafiltró con membrana de corte de 10 kDa (Amicon, Millipore) hasta reducir el volumen a 1-2 mL con el fin de concentrar las proteínas, se realizaron también dos lavados con Tris-HCl pH 8.0.

#### Extracción de la enzima recombinante de *P. acidilactici* ATCC 8042, expresada en *E. coli* BL21

A partir de la cepa de *E. coli* BL 21 pET 19-99 almacenada a -20°C en medio LB, se realizó un preinóculo (1% del medio inicial) en medio LB+ampicilina (100 µg/mL) con incubación a 250 rpm a 37°C por 12 h (New Brunswick Innova 4000 Benchtop Incubator Shaker), posteriormente se resembró (1% del preinóculo) en un matraz con 50 mL del mismo medio y se incubó en las condiciones anteriormente descritas hasta llegar a una D.O.<sub>600 nm</sub> 0.6-0.8, momento en el cual se adicionó IPTG (0.1 mM concentración final) para inducir la expresión del gene que se encarga de sintetizar la proteína de interés, se continuó la incubación en las mismas condiciones por 3 h.

Las células fueron cosechadas centrifugando el medio a 8500 rpm, 15 min a 4 °C (Biofuge primo R Centrifuge, Heraeus), el sobrenadante se ultrafiltró con una membrana de tamaño de corte de 10 kDa hasta reducir su volumen al 1% del volumen inicial.

Para determinar que la cepa de *E. coli* BL21 y la cepa con el vector sin inserto, para la expresión de la enzima de interés carecían de actividad N-

acetilglucosaminidasa se realizaron cultivos con dichos microorganismos y se siguió la metodología anteriormente descrita para la extracción de la enzima.

#### Detección de la actividad de N-acetilglucosaminidasa de la enzima de 99-kDa nativa y recombinante de *P. acidilactici* ATCC 8042 en zimograma con 4-NP-NAG.

A partir de las condiciones óptimas para la detección de actividad de N-acetilglucosaminidasas establecidas en la sección 5.1\*, se evaluó la actividad en las fracciones obtenidas durante la extracción de la enzima nativa y recombinante tomando 35 µL de cada muestra; la intensidad y el peso molecular de las bandas de actividad fueron cuantificadas usando el software TotalLab Quant.

\* La electroforesis para estas enzimas se llevó a cabo en condiciones semidesnaturalizantes (con adición de SDS), ya que se observó que no existía diferencia entre la intensidad de las bandas al adicionar este sustrato a los geles.

#### Determinación del perfil proteico por SDS-PAGE

El perfil proteico de cada muestra se determinó por SDS-PAGE según la metodología descrita por Laemmli (1970). Los geles prepararon con los siguientes reactivos (Bis-acrilamida 30%, Tris-HCl 2 mM, pH 8.8, SDS 10%, H<sub>2</sub>O destilada, TEMED y APS 10%). Se tomaron 35 µL de la muestra a evaluar y se le adicionó 5 µL de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% de glicerol, 0.5% de azul de bromofenol), el gel se corrió a 120 V para teñirse posteriormente con azul de Coomasie, durante 12 h y se destiño con solución desteñidora (10% de metanol, 10% de ácido acético, 80% de agua destilada).

#### Determinación de la actividad de PGH (Zimogramas con *M. lysodeikticus*)

Se realizaron con la misma metodología utilizada para los SDS-PAGE adicionando 0.2 % de *M. lysodeikticus* (Leclerc y Asselin 1989). El gel se incubó con solución renaturalizante (Tris-HCl 100mM, pH 8.0 con Tritón X-100, 1% v/v) por 12 h,

posteriormente el gel se tiñó con azul de metileno al 0.1% y KOH 0.01% por media hora y se destiñó con agua.

#### Determinación de la actividad específica.

##### *Cuantificación de la cantidad de proteína*

La concentración de proteína en cada una de las muestras se determinó por microensayo usando el método de Bradford (Bradford, 1976) con un kit comercial (Bradford Protein Assay Bio-Rad®).

##### *Cuantificación de la actividad*

Se determinó la actividad de N-acetilglucosaminidasa a cada una de las muestras obtenidas siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® para la detección de enzimas con actividad de N-acetilglucoamidasa y modificado por García Cano (2013). Se utilizó una microplaca de 96 micropozos; para cada prueba se adicionaron 80  $\mu$ L de buffer de MOPS pH 6.0 20 mM, 10  $\mu$ L de una solución de 4-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (1 mg/mL) y 10  $\mu$ L de la muestra; la reacción se incubó a 37°C por 20 min y se detuvo adicionando 100  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 140 mM. La concentración de proteína y la actividad enzimática en cada fracción se determinaron con un lector de placas (EPOCH Biotek).

## 6.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PGH DE 99-KDA DE *P.ACIDILACTICI* ATCC 8042 DE 99-KDA RECOMBINANTE EN ZIMOGRAMA CON 4-NP-NAG.\*

### Efecto de la temperatura

#### *Temperatura óptima de actividad*

Se realizaron zimogramas con 4-NP-NAG para la detección de N-acetilglucosaminidasas; los geles se corrieron en las condiciones óptimas cambiando únicamente temperatura de incubación, las temperaturas evaluadas fueron: 37, 50 (control) y 70°C.

#### *Estabilidad térmica*

El concentrado obtenido durante la extracción de la enzima recombinante, se sometió a 3 tratamientos térmicos diferentes (Thermomixer 5350 Eppendorf) a 37, 50 y 70°C por 30 min a 300 rpm; cada una de las muestras se cargó por triplicado en zimogramas con 4-NP-NAG y se sometió a las condiciones óptimas de electroforesis e incubación anteriormente descritas.

### Efecto del pH

Se realizaron zimogramas con 4-NP-NAG para la detección de N-acetilglucosaminidasas; los geles se corrieron en las condiciones óptimas cambiando únicamente el pH del medio de incubación, los pH evaluados fueron: 4, 6 (control), 8 y 10.

### Efecto de iones metálicos y agentes quelantes

Se realizaron zimogramas con 4-NP-NAG para la detección de N-acetilglucosaminidasas. Los geles se corrieron en las condiciones óptimas y durante la incubación se probó la adición al buffer de incubación de cuatro iones

metálicos en dos concentraciones diferentes: NaCl (1 y 10 mM), CaCl<sub>2</sub> (1 y10 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 y10 mM) y ZnCl<sub>2</sub> (1 y10 mM) y de dos agentes quelantes y un inhibidor, en dos concentraciones diferentes EDTA (1 y 10 mM), EGTA (1 y 10 mM) y PMSF (1 y 10 mM).

\*Cada condición fue evaluada por triplicado mediante espectrofotometría y zimografía; la cantidad de muestra en cada pozo fue 376.6 µg.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

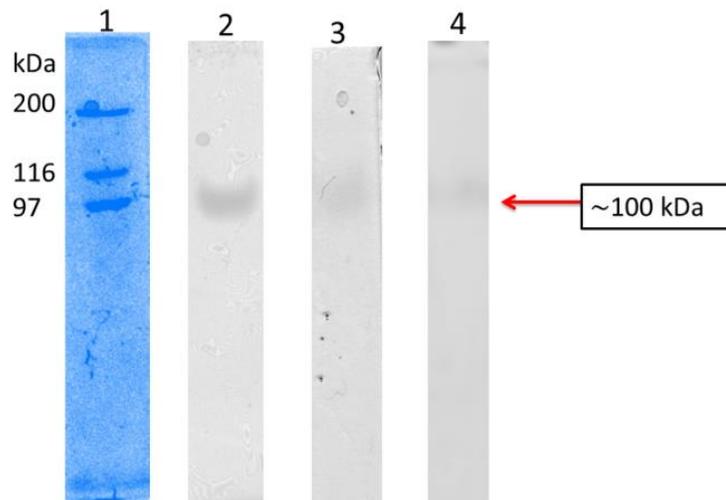
### 7.1 Diseño del método zimográfico para detección de N-acetilglucosaminidasas usando 4-NP-NAG.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de cada una de las condiciones probadas durante el diseño de la técnica, de las cuales se seleccionó aquella que generó las bandas con mayor intensidad.

**Tabla 14.** Resultado de las condiciones experimentales probadas para la elaboración de zimogramas con 4-NP-NAG

Ensayo	Medio de incubación	[Buffer ] (mM)	pH	[sustrato] <sub>del</sub> (mg/mL)	Proteína/ carril (µg)	t <sub>incubac</sub> (minutos)	T <sub>incubac</sub> (°C)	Presencia de bandas		
<b>CONDICIONES DESNATURALIZANTES</b>										
1	Citrato de Sodio	100	4.8	0.35	10.5	15	37	NO		
2							50	NO		
3							37	NO		
4			6.0		31.5	15	37	NO		
5							50	NO		
6							37	NO		
7	1. Citrato de sodio 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100	1. 4.8	0.35	10.5	1. 15 2. 15	37	NO		
8		2. 100	2. 10					NO		
9	1. Citrato de Sodio 2. Acetato de Sodio 3. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100	1. 4.8			0.35	10.5	1. 15 2. 15 3. 15	25	NO
10		2. 50	2. 5.0							NO
11		3. 100	3. 10							NO
12	MOPS	100	6.0			0.35	10.5	15	25	NO
13		20		50	NO					
14	1. Tritón X-100 2. Citrato de sodio	1. 1%	1. ND	1. 15 2. 15	25			NO		
15		2. 100	2. 6.0							
16	1. Tritón X-100 2. Acetato de Sodio	1. 1%	1. ND	1. 15 2. 15	25			NO		
17		2. 50	2. 5.0							
18	1. Tritón X-100 2. MOPS	1. 1% 2. 100	1. ND 2. 6.0	1. 15 2. 15	25	NO				
19	1. Citrato de sodio 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				0.35	10.5	15	1. 50 2. 37
20	MOPS	20 100	6.0	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
21	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 20 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
22	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
23	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
24	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
25	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
26	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
27	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
28	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
29	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
30	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
31	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
32	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
33	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
34	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
35	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
36	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
37	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
38	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
39	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
40	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
41	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
42	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
43	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
44	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
45	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
46	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
47	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
48	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
49	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
50	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
51	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
52	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
53	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
54	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
55	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
56	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
57	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
58	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
59	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
60	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
61	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
62	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
63	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
64	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
65	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
66	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
67	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
68	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
69	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
70	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
71	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
72	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
73	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
74	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
75	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
76	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
77	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
78	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
79	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
80	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
81	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
82	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
83	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
84	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
85	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
86	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
87	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
88	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
89	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
90	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
91	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
92	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
93	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
94	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
95	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
96	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10	1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO				
97	1. MOPS 2. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1. 100 2. 100	1. 6.0 2. 10				1. 30 2. 15	1. 50 2. 37	NO	
98	1. MOPS 2. Na									

En la siguiente figura se muestra el resultado obtenido en aquellas condiciones en las que se observó la presencia de bandas de actividad.



**Figura 5.** Detección de la actividad de la N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* (10.5 µg/carril) en zimograma con 4-NP-NAG (0.35 mg/mL gel). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, ensayo 17 (incubación en MOPS 20 mM pH 6.0 por 30 minutos a 50°C); carril 3, ensayo 18 (incubación en MOPS 20 mM pH 6.0 por 30 minutos a 50°C); carril 4, ensayo 20 (incubación en MOPS 20 mM pH 6.0 por 30 minutos a 50°C con una posterior incubación en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por 15 minutos a 37°C).

La presencia de bandas de actividad lítica sólo se observó en zimogramas nativos, debido probablemente a la inhibición de la enzima de referencia en presencia de SDS, efecto que ya ha sido reportado para otras N-acetilglucosaminidasas de origen bacteriano (Trimble *et al.*, 1982; Sakai *et al.*, 1994).

En los zimogramas con 4-MU-NAG reportados por Lincoln y colaboradores (1994) se observó una disminución significativa de la intensidad de la respuesta de la N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* en los geles corridos en condiciones semidesnaturalizantes, aun después de incubar con Tritón X-100, con respecto a los nativos; mismo efecto que se presenta en este experimento en los ensayos 13-15.

El citrato de sodio, a pesar de ser uno de los amortiguadores más utilizados para la detección de N-acetilglucosaminidasas por espectrofotometría (Horak *et*

*al.*,1981;Shibata y Yagi, 1996; Jagadeesh y Phabha, 2002; Cao *et al.*, 2014) y ser la primera opción probada, no resultó una buena elección para esta técnica ya que no generó resultados positivos; el acetato de sodio ha sido reportado anteriormente como amortiguador de incubación en zimogramas para detección de N-acetilglucosaminidasas (Lincoln *et al.*,1994), no obstante presenta un efecto inhibitorio en la actividad de la N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* (Li y Li., 1970), así como de muchas enzimas de este mismo grupo (Bedi *et al.*,1984; Barber y Ride, 1989; Frohwein *et al.*,1999; Jin *et al.*,2002).

El MOPS, se propuso como amortiguador, ya que es muy similar estructuralmente al MES, reactivo que ha sido usado para detectar HexA y Hex B (Kimura *et al.*, 2002) por espectrofotometría y no tiene reportes de actuar como inhibidor de N-acetilglucosaminidasas. Al ser el único amortiguador en el que se observaron bandas de actividad (Figura 5.), el MOPS fue elegido como amortiguador de incubación y se utilizó para el resto de la investigación.

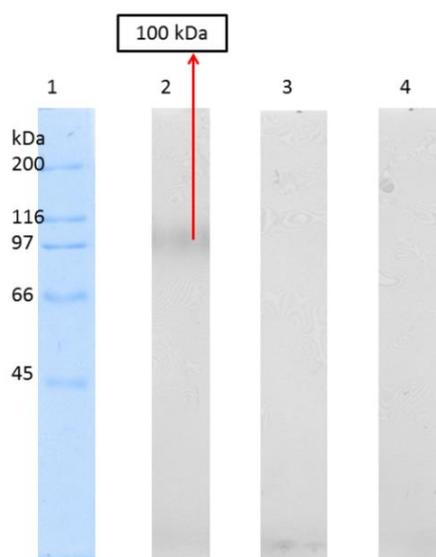
La incubación en carbonato de sodio, para favorecer la desprotonación del 4-nitrofenol y la subsecuente formación del 4-nitrofenolato (producto amarillo), no presento efecto significativo en el incremento de la intensidad de la banda lítica a diferencia de lo que se ha reportado para las técnicas espectrofotométricas (Shibata y Yagi, 1996), por lo que se decidió no llevar a cabo esta etapa, ya que no aumentaba la respuesta del ensayo.

## 7.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ZIMOGRÁFICO PARA DETECCIÓN DE N-ACETILGLUCOSAMINIDASAS USANDO 4-NP-NAG.

### Selectividad

Los resultados de esta etapa indican que la técnica es altamente selectiva a la presencia de N-acetilglucosaminidasas, ya que se observa la presencia de una sola banda de actividad lítica a 100 kDa, que es el peso molecular de la N-

acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* (Li y Li, 1970); la lisozima (muramidasa de 14.4 kDa) y la lisostafina (endopeptidasa de 27 kDa) no son capaces de hidrolizar el 4-NP-NAG aún en condiciones nativas (Figura 6). El amortiguador de disolución no presentó actividad por lo que no resulta un interferente para ésta técnica.

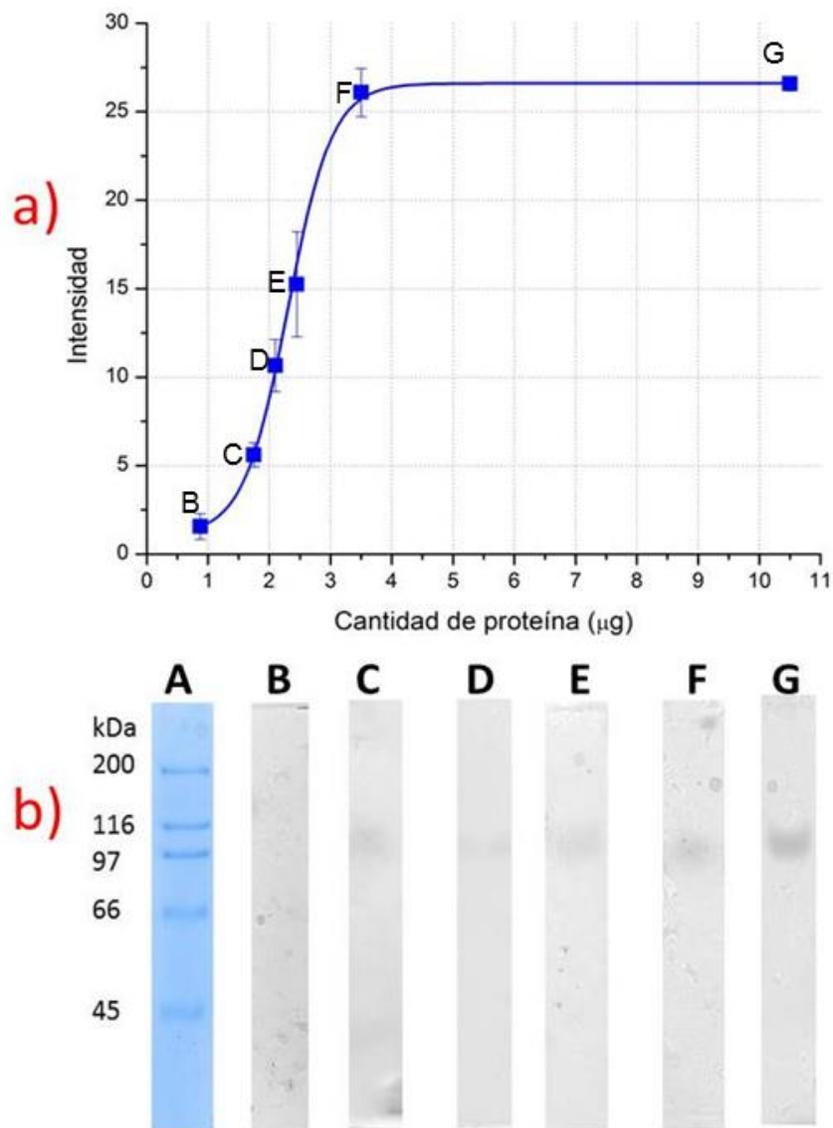


**Figura 6.** Evaluación de la selectividad del método zimográfico. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, muestra estándar (3.5 µg de lisozima, 3.5 µg de lisostafina y 3.5 µg de N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis*); carril 3, blanco reactivo (3.5 µg de lisozima y 3.5 µg de lisostafina); carril 4, testigo reactivo (Tris-HCl, pH 8.0 100 mM).

### Linealidad y sensibilidad

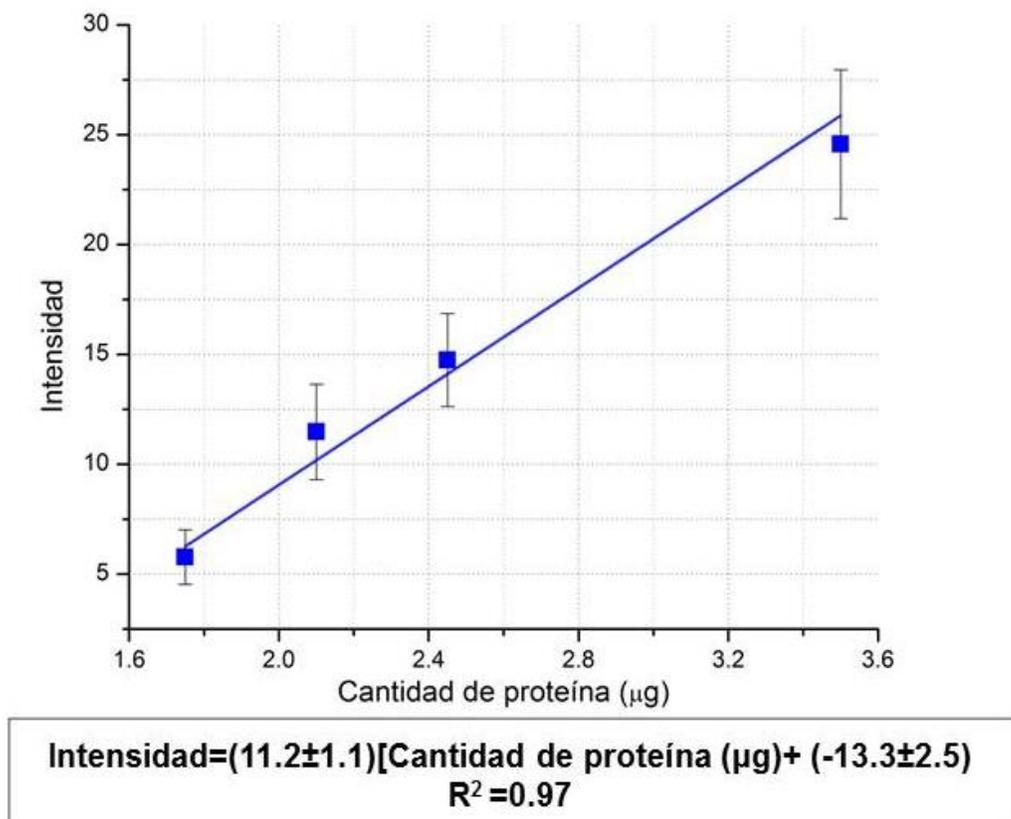
Con la finalidad de determinar el intervalo en el cual la cantidad de proteína aplicada en cada carril es proporcional a la respuesta dada por el método, se evaluó por triplicado la intensidad de las bandas producidas por 5 soluciones con diferente cantidad de N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* (0.875, 1.75, 2.1, 2.45, 3.5 y 10.5 µg) con el software TotalLab Quant (1D or Western Blot Analysis Free Trial Version) (Figura 7.0); en aquellas soluciones donde se observó linealidad se evaluó la intensidad siete veces más con el fin de determinar la ecuación que describía el comportamiento de dicho intervalo, a continuación se presentan los resultados.

La intensidad, también conocida densidad relativa de la banda, en cada uno de los ensayos corresponde a la altura del pico de la banda detectada menos el ruido de fondo eliminado mediante la función Rolling Ball (Vorácková *et al.*, 2011).



**Figura 7.a)** Determinación del intervalo de linealidad de la intensidad de la respuesta respecto a la cantidad de enzima aplicada en cada carril (Las barras representan la desviación estándar de 3 ensayo independientes). **b)** Zimograma de cada una de las concentraciones evaluadas durante la determinación del intervalo de linealidad. Carril A, marcador de peso molecular; carril B, 0.875 µg; carril C, 1.75 µg; carril D, 2.1 µg; carril E, 2.45 µg; carril F, 3.5 µg; y carril G, 10.5 µg.

El intervalo de linealidad de la técnica resultó ser de 1.75  $\mu\text{g}$  a 3.5 $\mu\text{g}$  de proteína, por lo que se utilizaron las soluciones con 1.75, 2.1, 2.45 y 3.5  $\mu\text{g}$  para elaborar la curva de calibración.



**Figura 8.** Curva de calibración del método zimográfico\*. Las barras representan la desviación estándar de 10 ensayos. La sensibilidad del método es igual a la pendiente de la curva de calibración es decir 11.2 unidades de intensidad/ $\mu\text{g}$  de enzima de referencia.

Para determinar si el coeficiente de regresión lineal cumplía con los criterios de aceptación estipulados para ensayos biológicos se recurrió a los parámetros establecidos en otras naciones para este tipo de técnicas ya que en la legislación mexicana no existe un precedente; el gobierno canadiense a través del documento Drugs Directorate Guidelines- Acceptable Methods by Health Protection (1994),

establece que para métodos biológicos una  $R^2 \geq 0.95$  es aceptable por lo que el método validado en esta investigación cumple con el parámetro de linealidad.

En la literatura no existen reportes de técnicas validadas para la detección de N-acetilglucosaminidasas por métodos zimográficos, sin embargo Hardt y colaboradores (2003), validaron la técnica para determinación de PGHs usando pared celular de *M. lysodeikticus* descrita en 1989 por Leclerc y Asselin. El intervalo de linealidad fue establecido midiendo el área de lisis producida por soluciones con diferente cantidad de lisozima; la metodología establecida en esta investigación y la propuesta por Hardt tienen intervalos de linealidad muy similares, de 1.75 a 3.5  $\mu\text{g}$  de N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis* para la primera y de 0.35 a 7  $\mu\text{g}$  de lisozima en el caso de la segunda, sin embargo, la técnica de Hardt presenta algunas desventajas con respecto a la zimografía para detección de N-acetilglucosaminidasas con 4-NP-NAG, como: a) la baja especificidad, pues no es posible estimar con sólo este método cuál de las cuatro tipos de PGHs tenemos en una muestra, b) el tiempo de revelado es más prolongado, pues se requieren 10 h de incubación para evaluar los resultados y c) la cantidad de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* usada para cada gel es tres veces mayor que el 4-NP-NAG en cada zimograma.

La sensibilidad de ambos métodos no es comparable debido a que en uno de ellos se determina el área y en el otro la intensidad (altura del pico) de la banda, sin embargo, si se considera que el intervalo de linealidad en ambos casos tiene el mismo orden de magnitud y que en los zimogramas de 4-NP-NAG se usa una menor cantidad de sustrato, se puede concluir que la técnica propuesta en esta tesis resulta una buena opción para la detección de N-acetilglucosaminidasas.

### Límite de detección

La intensidad de la cantidad de proteína mínima detectable de acuerdo a lo señalado por la ICH (1995 y 1996) y por la ONU (2011), para un blanco con una con una intensidad de 1.22 y una desviación estándar de 0.17

$$Y_{LD} = 1.22 + 3(0.17) = 1.73$$

A partir de la ecuación de la recta (Figura 8), se tiene que dicha intensidad corresponde a la dada por 1.34 µg de proteína, por lo que este valor corresponde al límite de detección.

El límite de detección indica que una cantidad menor a 1.34 µg no puede ser distinguida del ruido, lo que concuerda con lo observado experimentalmente (Figura 7), pues para los carriles donde se colocaron 0.875 µg de enzima, la intensidad de la respuesta tienen un valor de dos, que es casi igual al del blanco y ya no presenta un comportamiento lineal.

### Límite de cuantificación

El límite de cuantificación, para un blanco con una intensidad de 1.22 y una desviación estándar de 0.17

$$Y_{LC} = 1.22 + 10(0.17) = 2.92$$

La cantidad de proteína que corresponde a la señal de intensidad mínima cuantificable es 1.45 microgramos de proteína,

El límite de cuantificación determinado confirma que en el intervalo de linealidad propuesto es posible realizar mediciones cuantitativas de forma precisa y confiable.

## Exactitud (Sesgo)

Ejemplo del cálculo:

Para la banda generada por la solución con 1.75 µg de enzima de referencia, el sesgo del peso molecular es:

$$\text{Sesgo} = \overline{\text{Peso molec}}_{exp} - \text{Peso molec de referencia} = (100 - 97)kDa = 3 kDa$$

Una vez calculado el sesgo se determinó mediante la prueba t de Student, si existía diferencia significativa entre las mediciones; el valor de  $t_{experimental}$  se determina con la siguiente ecuación.

$$t = \frac{|\overline{\text{Peso molec}}_{exp} - \text{Peso molec de referencia}|}{s \sqrt{n}}$$

Donde

S= desviación estándar

n= número de repeticiones

Sustituyendo en la ecuación el sesgo ya calculado:

$$t = \frac{|3|}{1 \sqrt{3}} = 1.73$$

La determinación del peso molecular con esta técnica es exacta, ya que la  $t_{experimental}$  en todos los casos es menor a la  $t_{teórica}$  aun cuando electroforesis se llevó a cabo en condiciones nativas y que por éste hecho las proteínas pudieran migrar influenciadas por su peso y carga. Como también se observa en la tabla 15 la cantidad de proteína no afectó la respuesta dada para el peso molecular, aún en concentraciones que no están dentro del intervalo de linealidad (Tabla 15).

**Tabla 15.** Determinación de la exactitud de la técnica.

	Cantidad de proteína (µg)	1.75	2.1	2.45	3.5	10.5
Peso molecular	Promedio (kDa)	97.0	96.9	97.3	96.6	98.1
	Sesgo (kDa)	3	3.1	2.7	3.4	1.9
	Desviación estándar (s)	1.0	2.74	2.22	0.81	2.83
	Repeticiones	3	3	3	3	3
	$t_{exp}$	1.73	0.65	0.7	2.42	0.39
	$t_{teórica}$ ( $\alpha=0.05$ a dos colas)	3.18	3.18	3.18	3.18	3.18
	¿Hay diferencia significativa?	NO	NO	NO	NO	NO

## Repetibilidad y reproducibilidad

Aunque no existen datos en la literatura que indiquen los criterios de aceptación para la repetibilidad y la reproducibilidad de un método biológico, la SSA (2011) estableció que el coeficiente de varianza para pruebas espectrofotométricas es de 3%, si se usa este valor como referente se puede concluir a partir de los datos reportados en la tabla 16 y 17, que la técnica es repetible y reproducible únicamente para la evaluación del peso molecular, mientras que al evaluar la intensidad no es repetible para ninguna de las concentraciones analizadas y sólo es reproducible con 2.45 µg de enzima.

**Tabla 16.** Intensidad y peso molecular en condiciones de repetibilidad usando distintas concentraciones de enzima de referencia.

	Cantidad de proteína (µg)		
	2.1	2.45	3.5
Intensidad	10.1	16.9	26.0
Desviación estándar de intensidad	2.9	0.9	1.8
Coeficiente de varianza (%)	28.7	5.3	6.9
Peso molecular (kDa)	101.1	99.9	100.0
Desviación estándar del peso molecular	0.9	0.9	0.4
Coeficiente de varianza (%)	0.9	0.9	0.4

**Tabla 17.** Intensidad y peso molecular en condiciones de repetibilidad usando distintas concentraciones de enzima de referencia.

	Cantidad de proteína (µg)		
	2.1	2.45	3.5
Intensidad	11.27	18.24	22.21
Desviación estándar de intensidad	1.83	0.20	1.88
Coeficiente de varianza (%)	16	1.0	8.4
Peso molecular (kDa)	96.9	97.3	96.6
Desviación estándar del peso molecular	2.74	2.22	0.81
Coeficiente de varianza (%)	2.8	2.2	0.83

## Robustez

A partir de los resultados puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúsculas) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúsculas) (CODEX ALIMENTARIUS, 2006) (Tabla 18). Así, por ejemplo, para evaluar el efecto de la primera variable (Temperatura de incubación) se tiene que **A** y **a** para el parámetro de intensidad son:

$$A = \frac{s + t + u + v}{4} = \frac{20.1 + 28.82 + 19.92 + 23.5}{4} = 23.1$$

$$a = \frac{w + x + y + z}{4} = \frac{18.7 + 14.4 + 8.76 + 15.7}{4} = 14.39$$

**Tabla 18.** Resultados obtenidos en cada una de las condiciones evaluadas para determinar la Robustez de la técnica.

Condición variable			Condiciones							
Tipo	Valor superior	Valor inferior	1	2	3	4	5	6	7	8
T <sub>incubac</sub> (°C)	50 ( <b>A</b> )	37 ( <b>a</b> )	50	50	50	50	37	37	37	37
t <sub>incubac</sub> (min)	60 ( <b>B</b> )	30 ( <b>b</b> )	60	60	30	30	60	60	30	30
pH <sub>incubac</sub>	7 ( <b>C</b> )	6 ( <b>c</b> )	7	6	7	6	7	6	7	6
Amortiguador <sub>incubac</sub>	MOPS (Mo) ( <b>D</b> )	MES (Me) ( <b>d</b> )	Mo	Mo	Me	Me	Me	Me	Mo	Mo
Agitación	SI ( <b>E</b> )	NO ( <b>e</b> )	SI	NO	SI	NO	NO	SI	NO	SI
[Amortiguador] (mM)	40 ( <b>F</b> )	20 ( <b>f</b> )	40	20	20	40	40	20	20	40
Vol de amortiguador(mL)	100 ( <b>G</b> )	30 ( <b>g</b> )	100	30	30	100	30	100	100	30
Intensidad			20.1	28.2	19.2	23.5	18.7	14.4	8.76	15.7
Peso molecular (kDa)			97.6	101.6	103.0	105.9	98.3	88.0	99.7	107.3
			s	t	u	v	w	x	y	z

 Condiciones de ensayo óptimo

Una vez determinado el efecto que tendrá cada una de las variables se resta el resultado del valor superior al inferior y se compara su valor absoluto con el de  $\sqrt{2}DS$ ; los resultados de dicho análisis están reportados en la tabla 19.

**Tabla 19.** Sensibilidad de la técnica a cada una de las condiciones analizadas.

Parámetro	Condición		Condición		Diferencia $ \Delta(X-x) $	Comparación $\Delta(X-x) < \sqrt{2}DS$
Intensidad DS=5.9	<b>A</b>	22.75	<b>a</b>	14.39	8.4	<b>Sensible a la variable</b>
	<b>B</b>	20.35	<b>b</b>	16.79	3.6	No sensible a la variable
	<b>C</b>	16.69	<b>c</b>	20.45	3.8	No sensible a la variable
	<b>D</b>	18.19	<b>d</b>	18.95	0.8	No sensible a la variable
	<b>E</b>	17.35	<b>e</b>	19.79	2.4	No sensible a la variable
	<b>F</b>	19.5	<b>f</b>	17.64	1.9	No sensible a la variable
	<b>G</b>	16.69	<b>g</b>	20.45	3.8	No sensible a la variable
Peso molecular DS=6.0	<b>A</b>	102.0	<b>a</b>	98.3	3.7	No sensible a la variable
	<b>B</b>	96.4	<b>b</b>	104.0	7.6	<b>Sensible a la variable</b>
	<b>C</b>	99.7	<b>c</b>	100.7	1.1	No sensible a la variable
	<b>D</b>	101.6	<b>d</b>	98.8	2.8	No sensible a la variable
	<b>E</b>	99.0	<b>e</b>	101.4	2.4	No sensible a la variable
	<b>F</b>	102.3	<b>f</b>	98.1	4.2	No sensible a la variable
	<b>G</b>	97.8	<b>g</b>	102.6	4.8	No sensible a la variable

La intensidad de la respuesta resultó ser sensible a la temperatura de incubación, lo que puede explicarse si se considera que la velocidad de las reacciones químicas, se incrementa al aumentar la temperatura, por lo que a 37°C la hidrólisis del sustrato ocurrirá más lentamente y por lo tanto se producirá una menor cantidad de 4-nitrofenol que a 50°C.

El peso molecular es sensible a un mayor tiempo de incubación; efecto que puede atribuirse a la facilidad con la que el 4-NP-NAG difunde en medios acuosos (Lincoln *et al.*, 1994), por lo que un proceso prolongado de revelado ocasiona bandas más gruesas, que dificultan la detección precisa del peso molecular.

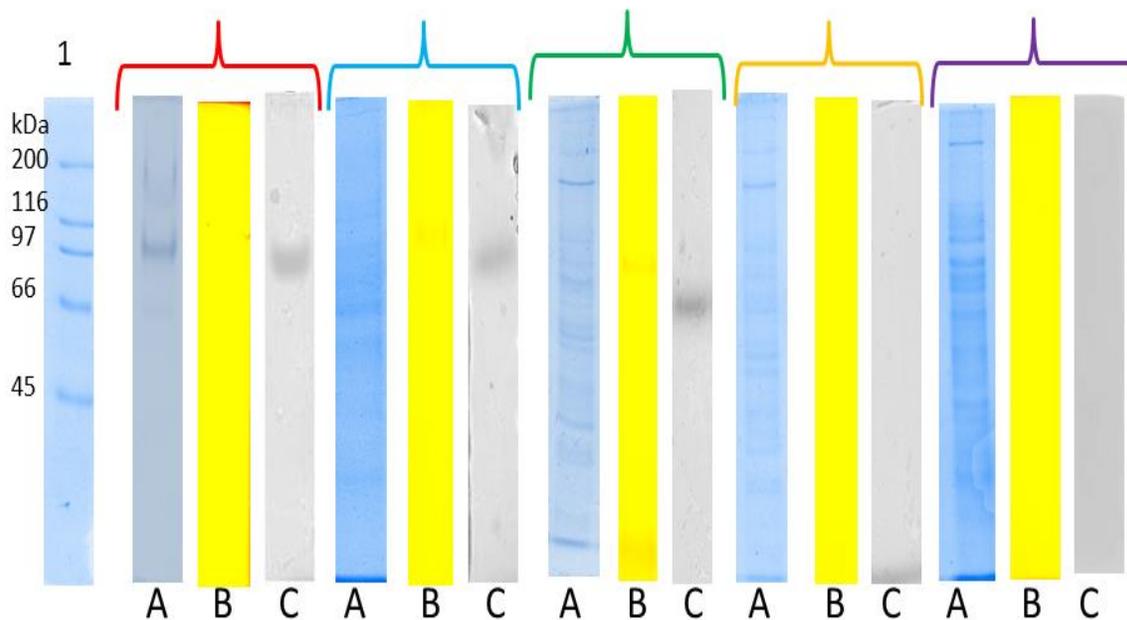
El resto de las variables (amortiguador usado, concentración, volumen y pH del mismo, y agitación ) no tuvieron efecto en la evaluación de la intensidad y del peso molecular, es decir, la técnica es robusta a su modificación y por lo tanto no alteran los resultados si son cambiados durante la aplicación del experimento.

### 7.3 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA N-ACETILGLUCOSAMINIDASA DE 99-KDA DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 NATIVA Y RECOMBINANTE

Una vez que el método analítico para la detección de N-acetilglucosaminidasas por zimograma utilizando 4-NP-NAG como sustrato fue diseñado y validado, se sometió a una prueba de reto que consistía en detectar la enzima de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8049 nativa y recombinante, por lo que se realizó la extracción de dichas enzimas como se describe en la sección 5.3.3 y 5.3.4.

Con el fin de evaluar la especificidad de la técnica y corroborar que la cepa *E. coli* BL 21 y el vector pET 19, presentan actividad “*per se*”, se realizaron cultivos de *E. coli* BL21 y *E. coli* BL 21 con el vector sin el gen que codifica para la producción de la enzima recombinante de 99-kDa.

Todas las muestras fueron sometidas a electroforesis en un zimograma con 4-NP-NAG y con *M.lysodeikticus* como sustrato, además se evaluó el perfil proteico por SDS-PAGE (Figura 9) y se determinó su actividad específica de acuerdo a lo indicado en el apartado 5.3.8.



**Figura 9.** (A) Perfil proteico, (B) Actividad lítica contra *M. lysodeikticus* (C) Actividad lítica contra 4-NP-NAG. Carril 1, marcador de peso molecular.

— N-acetilglucosaminidasa de *C. ensiformis*.

— Extracto de la enzima nativa de 99-kDa *P. acidilactici* ATCC 8042.

— Extracto de la enzima recombinante de 99-kDa.

— Extracto de *E. coli* BL21.

— Extracto de *E. coli* BL 21 + pET 19.

En cada carril se cargaron 35  $\mu$ L, salvo en aquellos que se probó la enzima de referencia, en los que se usaron 3  $\mu$ L.

Durante esta etapa se probó la eficacia de la técnica establecida y validada para la detección de la N-acetilglucosaminidasa de *P. acidilactici* ATCC 8042 nativa y recombinante con resultados satisfactorios. El peso molecular obtenido para la enzima nativa en zimograma con *M. lysodeikticus* y con 4-NP-NAG es muy similar, por lo que no se descarta la posibilidad de que se trate de la misma enzima; en el caso de la enzima recombinante se observa que el peso molecular es menor al de la nativa, efecto que ya sido observado en investigaciones anteriores en los que se han usado diferentes vectores de clonación para la expresión de este mismo gen (Campos-Gómez, 2013). Al comparar los resultados de las dos técnicas zimográficas para dicha enzima se presentó una diferencia de 17 kDa, por lo que

se recomienda secuenciar ambas bandas con el fin de corroborar que se trata de la misma proteína. En la cepa *E. coli* BL 21 y *E.coli* BL21 con el vector pET 19 vacío no se observó actividad lítica contra 4-NP-NAG o *M. lysodeikticus*, resultado que era el esperado pues carecían del gen que permite la expresión de la proteína de 99-kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

A pesar de que *E. coli* BL 21 posee una  $\beta$ -hexosaminidasa de 37.6 kDa reportada en su genoma (Jeong *et al.*, 2009), ésta no fue perceptible por zimografía o espectrofotometría, probablemente porque se encuentra a una concentración menor a la detectable por dichas técnicas.

**Tabla 20.** Resultados zimográficos y actividad específica determinada por espectrofotometría para cada una de las muestras.

Variable	Enzima nativa	Enzima recombinante	Extracto <i>E. coli</i> BL21	Extracto <i>E. coli</i> BL 21 pET 19
Actividad lítica en zimograma contra <i>M. lysodeikticus</i>	SI (105 kDa)	SI (83 kDa)	NO	NO
Actividad lítica en zimograma contra 4-NP-NAG	SI (97 kDa)	SI (66 kDa)	NO	NO
Actividad volumétrica $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$	500	1870	104	105
Concentración mg proteína/mL	1.76	1.66	3.07	6.86
Actividad específica $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$	284.09	1126.5	33.9	15.3

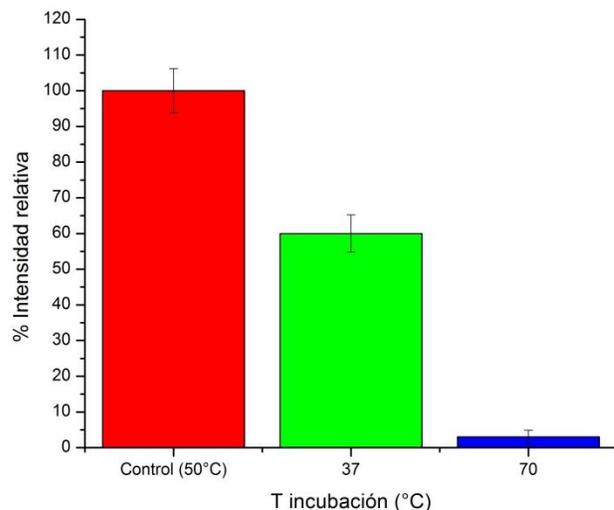
#### 7.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA N-ACETILGLUCOSAMINIDASA DE 99-kDa DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042 RECOMBINANTE.

Con el fin de evaluar si mediante la zimografía era posible caracterizar bioquímicamente una enzima y si los resultados obtenidos por esta técnica eran comparables con los determinados por espectrofotometría se decidió llevar a cabo la caracterización bioquímica de la enzima recombinante de 99-kDa expresada en *E. coli* BL 21 usando las técnicas anteriormente señaladas.

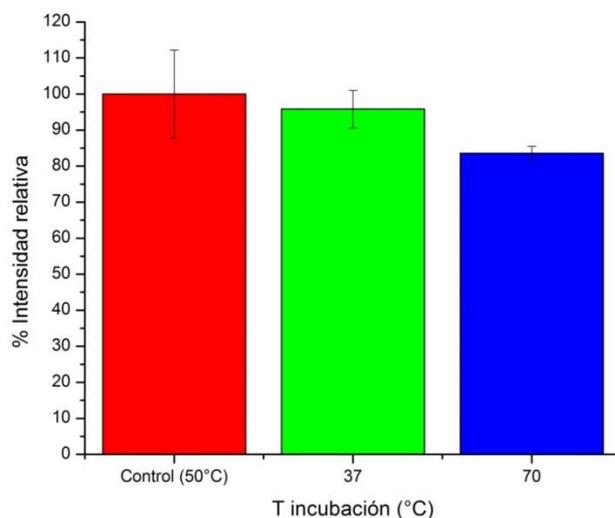
## Efecto de la temperatura

### *Temperatura óptima de actividad*

La temperatura óptima de actividad se evaluó incubando el zimograma o la microplaca donde se llevó a cabo la medición de la actividad espectrofotométrica en tres distintas temperaturas (Figura 10 y 11) y manteniendo el resto de las condiciones experimentales constantes



**Figura 10.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa a diferentes temperaturas de incubación en zimograma



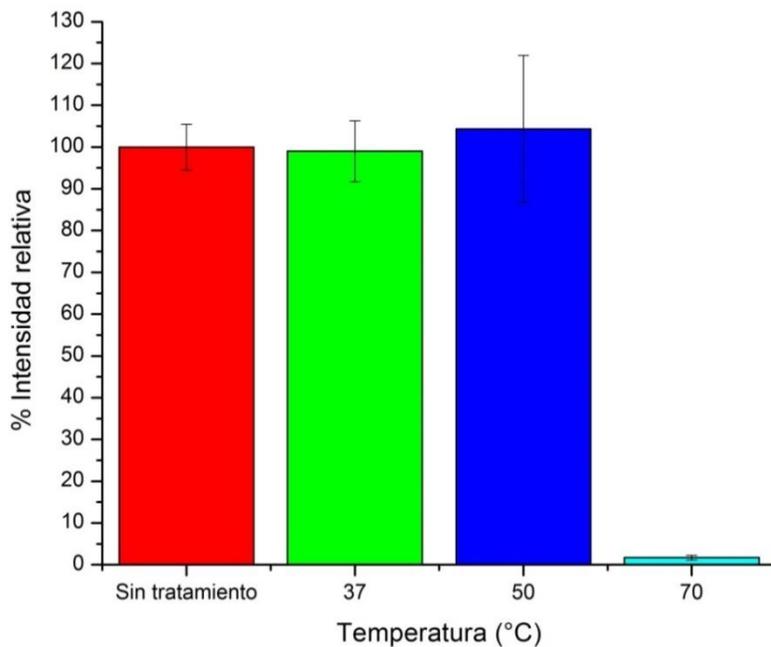
**Figura 11.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa a diferentes temperaturas de incubación detectada por espectrofotometría.

En las figuras 10 y 11 se observa que los resultados para la determinación de la temperatura óptima de actividad difieren entre las dos técnicas usadas. La probable explicación para este fenómeno es el incremento de la difusión en matrices de poliacrilamida al aumentar la temperatura, que ya ha sido reportado con anterioridad en la literatura para glicerol, glucosa y maltosa (Brown y Johnsen, 1980; Yankov, 2004). A 37°C la difusión del MOPS hacia el gel es lenta y por lo tanto el pH de la enzima no es el óptimo para que ocurra la reacción; a 70°C la difusión del nitrofenol hacia el medio es acelerado lo que puede ocasionar que la banda de actividad se desvanezca rápidamente o también es posible que 4-NP-NAG sea expulsado del gel antes que logre ser hidrolizado por la enzima.

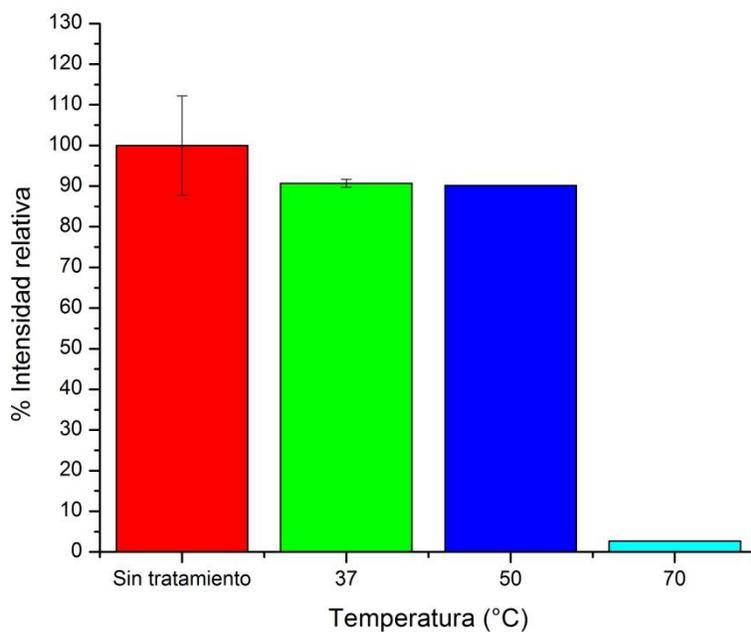
Los resultados de esta etapa confirman lo descrito en la sección 6.2.6, que corresponde a los resultados referentes a la evaluación de la robustez de la técnica, la temperatura de incubación es un parámetro que no debe de ser modificado si se desean obtener resultados confiables.

#### *Estabilidad térmica*

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica de la enzima recombinante de 99-kDa, el extracto crudo fue sometido a distintos tratamientos térmicos (Figura 12 y 13) por 30 min, una vez concluida esta operación, la zimografía y la determinación espectrofotométrica de actividad fueron llevadas a cabo de acuerdo a las condiciones óptimas anteriormente descritas. Los resultados se presentan a continuación:



**Figura 12.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa de la muestra después de someter a diferentes tratamientos el extracto de la enzima recombinante en zimograma.

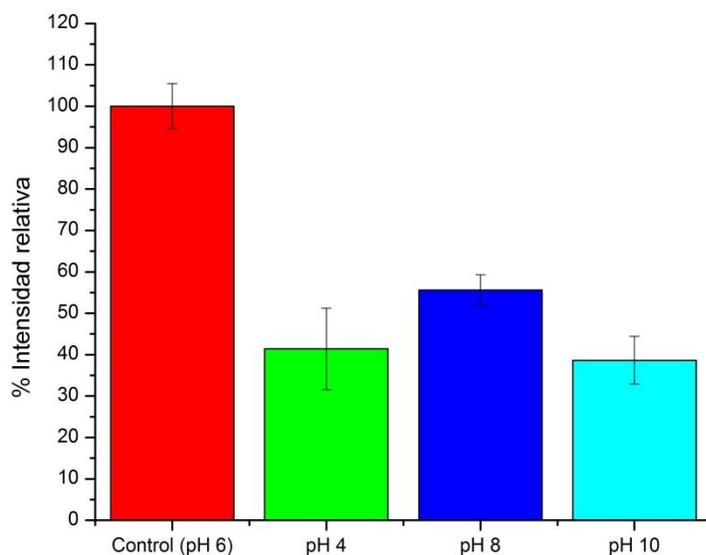


**Figura 13.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa de la muestra después de someter a diferentes tratamientos el extracto de la enzima recombinante detectada por espectrofotometría.

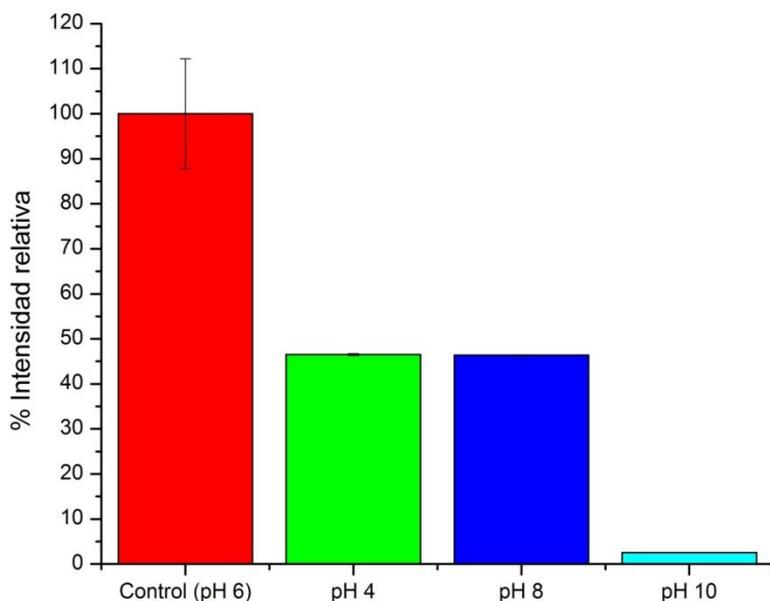
En las dos técnicas usadas para la caracterización bioquímica se observa un comportamiento muy similar de la enzima cuando es sometida a diferentes tratamientos térmicos. En ambos casos la actividad a 70°C decreció más de un 90%, lo que probablemente se deba a la desnaturalización térmica de la enzima a dicha temperatura. La actividad se vio afectada mínimamente en el resto de los ensayos probados lo que indica que un calentamiento a una temperatura de hasta 50°C por 30 min no altera la actividad de la enzima.

### Efecto del pH

Para evaluar el efecto del pH, se realizaron ensayos zimográficos y espectrofotométricos en las condiciones óptimas variando únicamente el pH del amortiguador de incubación (Figura 14 y 15).



**Figura 14.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa en zimograma de la enzima recombinante a diferentes pH.



**Figura 15.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa detectada por espectrofotometría de la enzima recombinante a diferentes pH.

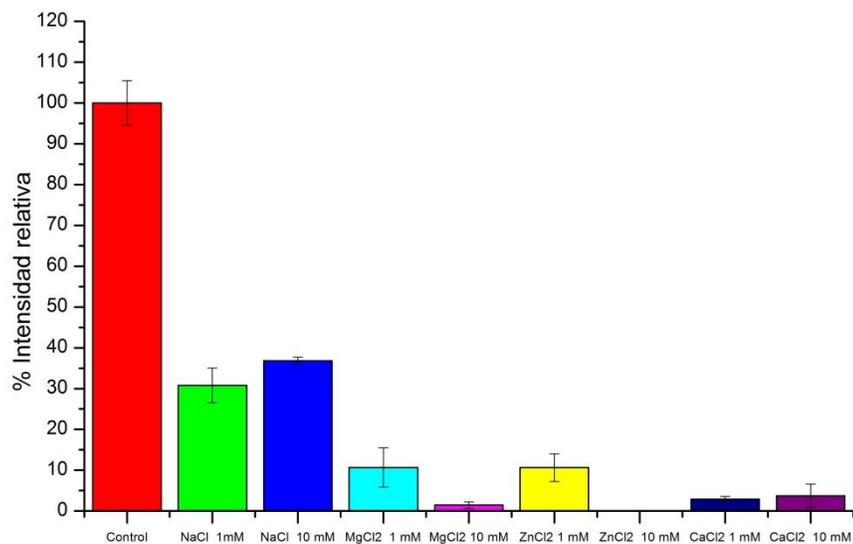
El comportamiento de la enzima respecto al pH es similar en ambos métodos y confirma lo anteriormente descritos para esta enzima por García Cano (2013) y lo indicado en las bases de datos para este grupo de enzimas (BRENDA Database), pues hasta el momento sólo existen reportes de N-acetilglucosaminidasas con actividad a pH 10 en el género bacteriano *Thermotaga*

Con los resultados mostrados anteriormente (Figuras 14 y 15) se puede establecer que la N-acetilglucosaminidasa de *P. acidilactici* ATCC 8042 es activa en el intervalo de pH comprendido entre 4 a 8, posee un pH óptimo de 6 y presenta un abatimiento de su actividad cuando es sometida a un pH de 10.

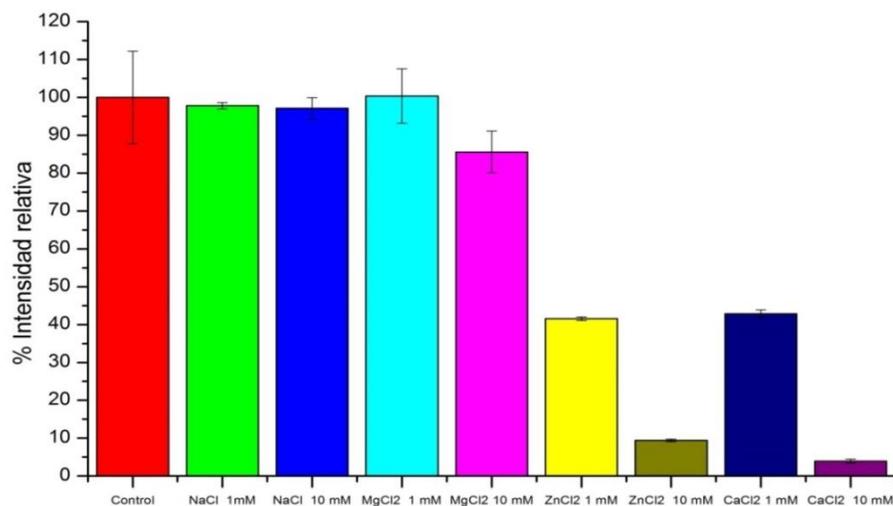
#### *Iones metálicos.*

El efecto de los iones metálicos en la enzima recombinante de 99-kDa fue evaluado adicionando NaCl, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> en diferentes concentraciones

(Figura 16 y 17) al buffer de incubación usado en las dos técnicas evaluadas y procediendo a realizarlas en las condiciones óptimas establecidas.



**Figura 16.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa en zimograma de la enzima recombinante en presencia de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en concentraciones 1 y 10 mM.



**Figura 17.** Actividad tipo N-acetilglucosaminidasa detectada por espectrofotometría de la enzima recombinante en presencia de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en concentraciones 1 y 10 mM.

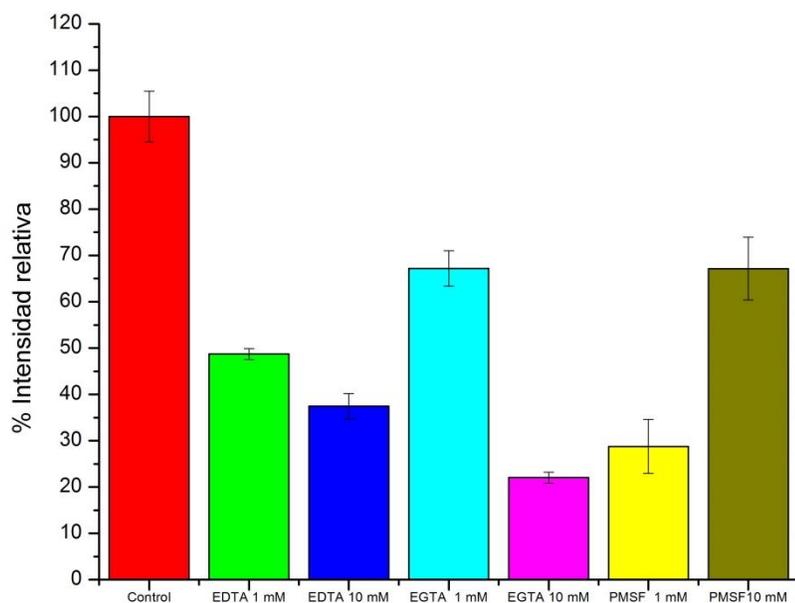
Los resultados obtenidos para la presencia de distintos cationes en el medio de incubación difieren considerablemente entre los métodos utilizados; ya que como se observa en la figura 16 todos los iones abaten en mayor o menor medida la actividad de la enzima en zimograma, mientras que por espectrofotometría la actividad no es alterada en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  al igual que durante la evaluación de la temperatura óptima de actividad de la enzima. La matriz de poliacrilamida juega un rol importante en la eficacia de la caracterización bioquímica. La unión de tres de los cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) evaluados a la matriz de poliacrilamida es termodinámicamente favorable (Hippel *et al.*, 1973) y en el caso del  $\text{Ca}^{2+}$  existen reportes que describen el efecto negativo de dicho catión en este polímero en el cual actúa como desestabilizante (Hippel y Scheleich, 1969) que explicaría la diferencia entre ambas técnicas, pues en vez de que los iones interactúen con las proteínas embebidas en el gel, estarían inmersos en la matriz de poliacrilamida y unidos a la misma. En el caso de  $\text{Zn}^{2+}$ , no existen reportes acerca de la interacción de este catión con la poliacrilamida.

Considerando los inconvenientes que conlleva la interacción poliacrilamida-catión no se recomienda el uso de zimogramas con 4-NP-NAG para caracterizar bioquímicamente enzimas.

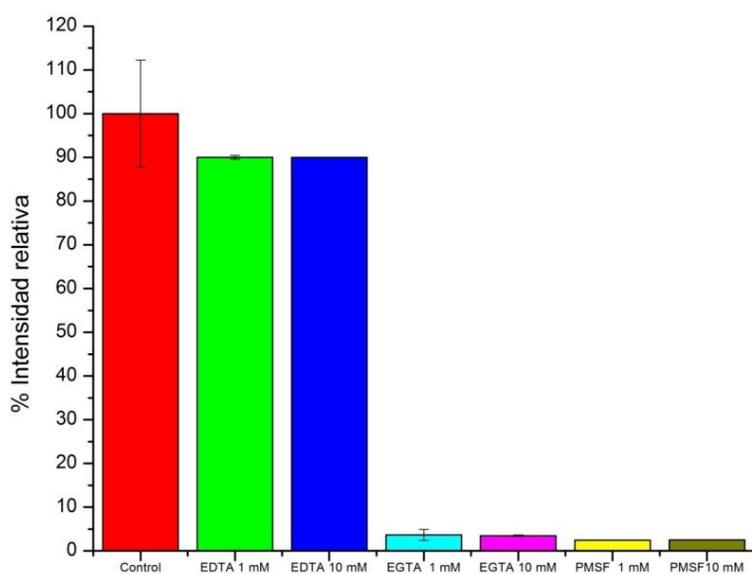
#### *Agente quelantes e inhibidores.*

El efecto de dos agentes quelantes (EDTA y EGTA) y un reconocido inhibidor de serin-proteasas (PMSF) contra la enzima recombinante de 99-kDa fue evaluado adicionando dos diferentes concentraciones (Figura 18 y 19) al amortiguador de incubación usado en las dos técnicas evaluadas y procediendo a realizarlas en las condiciones óptimas establecidas.

### Agentes quelantes e inhibidores.



**Figura 18.** Actividad de N-acetilglucosaminidasa en zimograma de la enzima recombinante en presencia de EDTA, EGTA y PMSF en concentraciones 1 y 10 mM.



**Figura 19.** Actividad tipo N-acetilglucosaminidasa detectada por espectrofotometría de la enzima recombinante en presencia EDTA, EGTA y PMSF en concentraciones 1 y 10 mM.

Los resultados entre ambas técnicas no son similares para la determinación de la actividad por zimografía o espectrofotometría para ninguna de las sustancias evaluadas, lo que probablemente se deba igual que en caso de los iones metálicos a la interacción del EDTA, EGTA y el PMSF con la matriz de poliacrilamida, aunque hasta el momento no existen investigaciones sobre este fenómeno.

Los resultados para el EDTA no son concluyentes pues existen reportes en la literatura (BRENDA Database) de N-acetilglucosaminidasas donde este quelante actúa como inhibidor (enzima de *Bos taurus* y *Turbatrix aceti*) y en otras como activador (enzima de *Bombyx mori*, *Bacillus sp.* y *Capsicum annuum*), mientras que para el EGTA no existen datos de caracterización bioquímica.

En el caso del PMSF, esta sustancia debe ser solubilizada en etanol por lo que es posible que este disolvente también afecte la actividad de la enzima. El PMSF es reportado como inhibidor de enzimas que contienen serina en su sitio catalítico, sin embargo, en el grupo de las N-acetilglucosaminidasas la serina no se encuentra en dicha región y en su lugar podemos encontrar histidina, ácido aspártico y glutámico (CAZy Database), además hasta el momento sólo se ha visto efecto activador del PMSF sobre N-acetilglucosaminidasas como la de *Sotalia fluviatilis* y *Palythoa caribeorum* (BRENDA Database).

## 8. CONCLUSIONES

- ✓ El ensayo que generó los mejores resultados para la detección de N-acetilglucosaminidasas fue aquel donde se elaboraron geles con 0.35 mg de 4-NP-NAG/mL y que después de la electroforesis fueron incubados en buffer con MOPS 20 mM pH 6.0 a 50°C por 30 minutos
- ✓ El método fue validado con resultados aceptables, y es recomendable mejorar la repetibilidad y reproducibilidad del mismo con el fin de obtener resultados más confiables.
- ✓ La PGH tipo N-acetilglucosaminidasa de *P. acidilactici* ATCC 8042 nativa y recombinante pudo ser detectada con esta técnica por lo que se propone su uso para evaluar la especificidad de otras PGHs.
- ✓ No son comparables los resultados obtenidos por técnicas zimográficas y espectrofotométricas.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Balcewich, M. D., Stubbs, K. A., He, Y., James, T. W., Davies, G. J., Vocadlo, D. J., y Mark, B. L. (2009). Insight into a strategy for attenuating AmpC-mediated  $\beta$ -lactam resistance: Structural basis for selective inhibition of the glycoside hydrolase NagZ. *Protein Science*, 18(7), 1541–1551.
- Bantwal, R., Bannam, T. L., Porter, C. J., Quinsey, N. S., Lyras, D., Adams, V., y Rood, J. I. (2012). The peptidoglycan hydrolase TcpG is required for efficient conjugative transfer of pCW3 in *Clostridium perfringens*. *Plasmid*, 67(2), 139–147.
- Barber, M.S., y Ride, J.P. (1989). Purification and properties of a wheat leaf N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase. *Plant Science*, 60, 163-172.
- Bedi, G.S., Shah, R.S., y Bahl, O.P. (1984). Studies on *Turbatrix aceti*  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. 1. Purification and Physicochemical Characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 233(1), 233-250.
- Borzym-Kluczyk, M., Radziejewska, I., Zaniewska, A., Borzym-Lewszuk, A., Szajda, S. D., Knaś, M., Zwierz, K., y Darewicz, B. (2009). Effect of smoking on activity of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase in serum and urine of renal cancer patients. *Clinical Biochemistry*, 42(15), 1565-1567.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F., Chapot-Chartier, M.P., Pons, J.L., y Pestel-Caron, M. (2009). Characterization of AtIL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 105–113.
- 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, 248–254.

- Briers, Y., Volckaert, G., Cornelissen, A., Lagaert, S., Michiels, C. W., Hertveldt, K., y Lavigne, R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1334–1344.
- Brown, W., y Rohnsen R.M. (1980). Diffusion in polyacrylamide gels. *Polymer*, 22, 187-189.
- Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C.W., y Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 164-171.
- Campos Gómez, M. A. (2013). *Clonación y expresión de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa producida por Pediococcus acidilactici ATCC 8042*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química UNAM
- Cao, L., Zhao, C., Su, S., Luo, S., y Han, M. (2014). The role of  $\beta$ -hexosaminidase in peach (*Prunus persica*) fruit softening. *Scientia Horticulture*, 169, 226-233.
- Cattaneo, F., Pasini, M. E., Intra, J., Matsumoto, M., Briani, F., Hoshi, M., y Perotti, M. E. (2006). Identification and expression analysis of *Drosophila melanogaster* genes encoding beta-hexosaminidases of the sperm plasma membrane. *Glycobiology*, 16(9), 786–800.
- Chai, C., Lee, K.S., y Oh, S.W. (2015). Synergistic inhibition of *Clostridium difficile* with nisin-lysozyme combination treatment. *Anaerobe*, 34, 24–26.
- Chapot-Chartier, M.P., y Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(Supp 1): S9.
- Chen, K.S., Lee, K.K. y Chen, H.S. (1994). A rapid method for detection of N-acetylglucosaminidase-type chitinase in crossed immunoelectrophoresis and sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis gel using 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosaminide as substrate. *Electrophoresis*, 15, 662-665.

- Chen, L.C., Chun, Y.C., Chang, Y.M. y Chang, C.T. (2011). Characterisation of a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from a commercial papaya latex preparation. *Food Chemistry*, 124,1404-1410.
- Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Okuda, D., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okomura, K., y Ogawa, H. (2005). Synergistic effect of antibacterial agents human  $\beta$ -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Dermatological Science*, 40(2), 123–132.
- Cibik, R., Tailliez, P., Langella, P., y Chapot-Chartier, M. P. (2001). Identification of Mur, an atypical peptidoglycan hydrolase derived from *Leuconostoc citreum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 858–864.
- CODEX ALIMENTARIUS. (2006).CX/MAS 06/27/3-Add. 2. *Proyecto de directrices para la evaluación de los métodos de análisis aceptables*
- Costanzi, E., Urbanelli, L., Bellezza, I., Magini, A., Emiliani, C., y Minelli, A. (2014). Hypermethylation contributes to down-regulation of lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase  $\alpha$  subunit in prostate cancer cells. *Biochimie*, 101, 75–82.
- Davies, G., y Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *The Cell Press*,3(9), 853-859.
- De Vuyst, L., y E. J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 91–142. En L. de Vuyst and E. J. Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom
- Dhalluin, A., Bourgeois, I., Pestel-Caron, M., Camiade, E., Raux, G., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.P., y Pons, J. L. (2005). Acd, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with N-acetylglucosaminidase activity. *Microbiology*, 151(7), 2343–2351.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., y Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la*

*incertidumbre de medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos".* Santiago: Instituto de Salud Pública de Chile

- Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M., y Mesnage, S. (2006). Functional analysis of AtIA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8513–8519.
- Facon, M. J., y Skura, B. J. (1996). Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *International Dairy Journal*, 6(3), 303–313.
- FDA. (2013). *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Revisión 1.*
- Ferrara, M.C., Cobucci-Ponzano, B., Carpentieri, A., Henrissat, B., Rossi, M., Amoresano, A. y Moracci, M. (2014). The identification and molecular characterization of the first archaeal bifunctional exo- $\beta$ -glucosidase/N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase demonstrate that family GH116 is made of three functionally distinct subfamilies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 367-377.
- Filho, B. P. D., Lemos, F. J. a., Secundino, N. F. C., Páscoa, V., Pereira, S. T., y Pimenta, P. F. P. (2002). Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(12), 1723–1729.
- Frirdich, E., y Gaynor, E.C. (2013). Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 16,767-779.
- Frohwein, Y.Z., y Gatt S. (1966). Separation of  $\beta$ -N-acetylglucosamine and  $\beta$ -N-acetylgalactosamine from calf brain cytoplasm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 128(1), 216-218
- Fuller, M., Duplock, S., Hein, L.K., Rigat, B.A., y Mahuran, D.J. (2014). Liquid chromatography/ electrospray ionisation-tandem mass spectrometry quantification of G<sub>M2</sub> gangliosides in human peripheral cells and plasma. *Analytical Biochemistry*, 458, 20-26.

- García Cano, I. (2013). *Peptidoglucano hidrolasa de Pediococcus acidilactici ATCC 8042; detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano*. (Tesis de Doctorado).Facultad de Química UNAM
- García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C.E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., Rodríguez-Sanoja, R., Sanchez, S., Farrés, A. (2015).Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied Microbiology Biotechnology(en prensa)*. DOI: 10.1007/s00253-015-6593-2.
- García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, G., Llorente-Bousquets, A., y Farrés, A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 607-615.
- Geisler, C., Aumiller, J. J., y Jarvis, D. L. (2008). A fused lobes gene encodes the processing  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in Sf9 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11330–11339.
- Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G., y Laine, R.A. (2003). Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Analytical Biochemistry*, 12(1), 73-76.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280 ( Pt 2), 309–316.
- Hippel, P. H., y Schleich, T. (1969). Ion Effects on the Solution Structure of Biological Macromolecules. *Biological Macromolecules*, (2), 257-265.
- Hippel, P.H., Peticolas, V., Schack, L., y Karlson, L. (1973). Model Studies on the Effects of Neutral Salt son the Conformational Stability of Biological Macromolecules I. Ion Binding to Polyacrylamide and Polyesterene Columns. *Biochemistry*, 12 (7), 1256-1263.

- Hogenkamp, D.G., Arakane, Y., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. y Beeman, R.W. (2008). Characterization and expression of the  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase gene family of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38, 478-489.
- Holland. R., Crow, V., y Curry B. (2011). *Pediococcus* spp. En Fuquay, J.W. (Ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 149-152).London: Academic Press.
- Horak, E., Hopfer, S. M., y Sunderman, F. W. (1981). Spectrophotometric Assay for Urinary N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Activity. *Clinical Chemistry*, 27(7), 1180–1185.
- Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., y Foster, S. J. (2004). Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactococcus lactis*: Identification of a Third N- Acetylglucosaminidase , *AcmC*, 70(6), 3493–3499.
- Humann, J. y Lenz, L. (2009). Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *Journal of Innate Immunity*, 1, 88-97.
- ICH. (1995). *ICH Topic Q2 R1. Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.
- ICH. (1996). *Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures. Methodology*.
- Isaksson, A., Hultberg, B., Masson, P., Landels, E.,y Fensom, A. (1993). Enzyme Immunoassay of  $\beta$ -Hexosaminidase A and B in Serum: Carrier Detection of GM<sub>2</sub>-Gangliosides, and Equivalence of Enzyme Activity and Enzyme Protein Reactivity. *Clinical Chemistry*, 39(7), 1412-1415.
- Iucci, L., Patrignani, F., Vallicelli, M., Guerzoni, M. E., y Lanciotti, R. (2007). Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 558–565.

- Jagadeesh, B.H., Prabha, T.N., y Srinivasan, K. (2004). Activities of glycosidases during fruit development and ripening of tomato (*Lycopersicon esculantum* L.): implication in fruit ripening. *Plant Science*, 166, 1451-1459.
- Jagadeesh, B.H., y Prabha, T.N. (2002).  $\beta$ -Hexosaminidase, an enzyme from ripening bell capsicum (*Capsicum annuum* var. *variata*). *Phytochemistry*, 65, 295-300.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C.H., Vallenet, D., Yu, D.S., Choi, S.H., Couloux, A., Lee, S.W., Yoon, S.H., Cattolico, L., Hur, C.G., Park, H.S., Ségurens, B., Kim, S.H., Oh, T.K., Lenski, R.E., Studier, F.W., Daegelen, P., y Kim, J.F. (2009). Genome Sequences of *Escherichia coli* strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394, 644-652.
- Jin, Y.L., Jo, Y.Y., Kim, K.Y., Shim, J.H., Kim, Y.W., y Park, R.D. (2002). Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidase from rice seeds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(3), 313–319.
- Karnes, H.T., Shiu, G., y Shah V.P. (1991). Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutuical Research*, 8(4), 421-426.
- Keyhani, N. O., y Roseman, S. (1996). The Chitin Catabolic Cascade in the Marine Bacterium *Vibrio furnissii*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33425–33432.
- Kim, Y. K., Kim, K. R., Kang, D. G., Jang, S. Y., Kim, Y. H., y Cha, H. J. (2009). Suppression of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in the N-glycosylation pathway for complex glycoprotein formation in *Drosophila* S2 cells. *Glycobiology*, 19(3), 301–308.
- Kimura, Y., Matsuo, S., Tsurusaki, S., Kimura, M., Hara-Nishimura, I., y Nishimura, M. (2002). Subcellular localization of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and high-mannose type free N-glycans in plant cell. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1570(1), 38–46.

- Koga, D., Yoshioka, T., y Arakane, Y. (1998). HPLC analysis of Anomeric Formation and Cleavage Pattern by Chitinolytic Enzyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(8), 1643-1646.
- Koo, I.C., Oho, I. Y.M., Wu, P., Morisaki, J.H., Cox, J.S., y Brown, E.J. (2008). Role for lysosomal enzyme  $\beta$ -hexosaminidase in the control of mycobacteria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 710-715.
- Kötzer, M.P., Hancock, S.M., y Withers, S.G. (2014). Glycosidases: Functions, Families and Folds. *ELS. John Wiley and Sons Ltd.* DOI.10.1002/9780470015902.a0020548.pub2
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Leclerc, D., y Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 749-753.
- Lemieux, M.J., Mark, B.L., Cherney, M.M., Withers, S.G., Mahuran, D.J., y James, M.N.G. (2006). Crystallographic Structure of Human  $\beta$ -Hexosaminidase A: Interpretation of Tay-Sachs Mutations and Loss of G<sub>M2</sub> Ganglioside Hydrolysis. *Journal of Molecular Biology*, 359(4),913-929.
- Léonard, R., Rendić, D., Rabouille, C., Wilson, I.B.H., Pr at, T., y Altmann F. (2006) The *Drosophila* fused lobes gene encodes an N-acetylglucosaminidase involved in N-glycan processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 281,4867–4875.
- Li, S.C., y Li, Y.T. (1970). Studies on the Glycosides of Jack Bean Meal: III. Crystallization and Properties of  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245 (19), 5153-5160.
- Liao, C.Y., y Lin, C.S. (2008). A Modified Coomassie Brilliant Blue G 250 Staining Method for the Detection of Chitinase Activity and Molecular Weight after

Polyacrilamide Gel Electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 16(1), 111-113.

- Lincoln, S.P., Fermor, T.R., y Wood, D.A. (1994). A novel method for detecting acetylglucosaminidase activity on polyacrylamide gels. *Journal of Microbiological Methods*, 20, 79-85.
- Llorente Bousquets, A. (1998). *Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo*. (Tesis de Maestría). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark D.P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid. Addison-Wesley.
- Mahuran, D.J. (1999). Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1455, 105–38.
- Mark, B.L., Mahuran, D.J., Cherney, M.M., Zhao, D., Knapp, S. y James, M.N.G. (2003). Crystal Structure of Human  $\beta$ -Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay-Sachs Disease. *Journal of Molecular Biology*, 327(5), 1093-1109.
- Mega, T., Ikenaka, T., y Matsushima, Y. (1970). Studies on N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase of *Aspergillus oryzae*: I. Purification and characterization of N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase obtained from Takadiastase. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 68, 109–17.
- Minister of National Health and Welfare, Health Protection Branch, Health Canada. (1994). *Acceptable Methods: Drugs Directorate Guidelines*
- Mora, D., Fortina, M.G., Parini, C., Daffonchio, D., y Manachini, P.L. (2000). Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH-PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology*, 146, 2027-2038.

- Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G., Senini, L., y Manachini, P.L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 561-570.
- Muramatsu, T.(1968). N-Acetylhexosaminidases from a gastropod *Turbo cornutus*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 64, 521–531.
- Naknukool, S., Hayakawa, S., Uno, T., y Ogawa, M. (2009). Antimicrobial Activity of Duck Egg Lysozyme Against *Salmonella enteritidis*. *Global Issues in Food Science and Technology* (First Edition). Elsevier Inc.
- Nelson, D.C., Schmelchemr M., Rodríguez-Rubio, L., Klump, J., Pritchard, D.G., Dong, M., y Donovan, D.M. (2012). Endolysins as antimicrobials. *Advances in Virus Research*, 83,299-365.
- Oikawa, A., Itoh, E., Ishihara, A., e Iwamura, H. (2003). Purification and characterization of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from maize seedlings. *Journal of Plants Physiology*, 160, 991-999.
- Olszewska, E., Borzym-Kluczyk, M., Rzewnicki, I., Rutkowska, J., Knas, M., Rogowski, M., Waniewska, E. y Wielgosz, R. (2009). Hexosaminidase as a new potential marker for larynx cancer. *Clinical Biochemistry*, 42(10-11), 1187–1189.
- ONU. (2011). *Directrices para la validación de los métodos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*
- Perez Martinez, S. L., Menendez Helman, R. J., Zitta, K. S., Brandelli, a., y Miranda, P. V. (2008). Characterization of human sperm N-acetylglucosaminidase. *International Journal of Andrology*, 31(3), 315–324.
- Proctor, V. A., Cunningham, F. E., y Fung, D.C.E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26(4), 359–395.
- Raccach, M. (2014). *Pediococcus*. En C.A. Batt y M.L. Tortorello (Eds), *Encyclopedia of Food Microbiology* (3) pp. 1-6. London: Academic Press.

- Rast, D. M., Horsch, M., Furter, R., y Gooday, G. W. (1991). A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *Journal of General Microbiology*, 137(12), 2797–2810.
- Rivera Quiroz, J. (2004). *Evaluación del efecto de bioconservación al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 como cultivo iniciador*. (Tesis de Maestría). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM
- Saha, B. C., Jordan, D. B., y Bothast, R. J. (2009). Enzymes, Industrial (overview). *Encyclopedia of Microbiology*, 281–294.
- Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M., y Moriguchi, M. (1994). Purification and characterization of thermostable beta-N-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2911–2915.
- Shibata, H., y Yagi, T. (1996). Rate assay of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase with 4-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide as an artificial substrate. *Clinica Chimica Acta*, 251, 53-64.
- Slámová, K., Bojarová, P., Petrásková, L., y Křen, V. (2010).  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase: What's in a name? *Biotechnology Advances*, 28, 682-693.
- Smith, T. J., Blackman, S. A., Y Foster, S. J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: Multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*, 146(2), 249–262.
- SSA. (2014). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos* (CCAYAC-P-058)
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M., y Charnley, A. K. (1991). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(3), 415–426.
- Stiles, M. E., y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29.

- Stubbs, K. A., Balcewich, M., Mark, B. L., y Vocadlo, D. J. (2007). Small molecule inhibitors of a glycoside hydrolase attenuate inducible AmpC-mediated  $\beta$ -lactam resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21382–21391.
- Szweda, P., Kotłowski, R., ŁąCka, I., y Synowiecki, J. (2007). Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against growth of *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *Journal of Food Safety*, 27(3), 265–274.
- Teuber, M. (1993). Lactic Acid Bacteria. En Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., y Stadler, P. *Biotechnology* (pp. 325-367). Weinheim: VCH
- Tsujibo, H., Kondo, N., Tanaka, K., Miyamoto, K., Baba, N., y Inamori, Y. (1999) Molecular analysis of the gene encoding a novel transglycosylative enzyme from *Alteromonas sp.* strain O-7 and its physiological role in the chitinolytic system. *Journal of Bacteriology*, 181, 5461–5466.
- Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Evans Aumick, G., y Maley, F. (1982). [56] Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces plicatus*. *Methods in Enzymology*, 83, 603-610.
- Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, E., y Opdenakker, G. (2013). Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, 10(3), 211-220.
- Velasco Pérez, L.Y. (2010). *Caracterización y espectro antibacteriano de la Peptidoglucano Hidrolasa de Pediococcus acidilactici ATCC*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química UNAM.
- Voet, D., Voet, J.G., y Pratt, C. (2009). *Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular*. Madrid: Editorial Médica Panamericana
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., y Foster, S., (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 259-286.

- Voráčková, I., Suchanová, S., Ulbrich, P., Diehl, W.E., y Ruhml, T. ( 2011). Purification of proteins containing zinc finger using Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Protein Expression and Purification*, 79(1), 88-95.
- Vuong, T. V., y Wilson, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: Catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 195–205.
- Yang, Q., Liu, T., Liu, F., Qu, M., y Qian, X. (2008). A novel  $\beta$ -N-acetyl-D-hexosaminidase from the insect *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *FEBS Journal*, 275(22), 5690–5702.
- Yokoi, K. J., Sugahara, K., Iguchi, A., Nishitani, G., Ikeda, M., Shimada, T., Inagaki, N., Yamakawa, A., Taketo, A., y Kodaira, K. I. (2008). Molecular properties of the putative autolysin AtIWM encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*, 416(1-2), 66–76.
- Yankov, D. (2004). Diffusion of glucose and maltose in polyacrylamide gel. *Enzyme and Microbiology Technology*, 34, 603-610.
- Youden, W. J.; Steiner, E. H. (1975). *Statistical manual of AOAC – Association of Official Analytical Chemistry*. Washington: AOAC.
- Zitta, K., Wertheimer, E. V., y Miranda, P. V. (2006). Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. *Molecular Human Reproduction*, 12(9), 557–563.

### **Bases de datos consultadas**

- Technische Universität Braunschweig BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase). [en línea]. *Information on EC 3.2.1.52 - beta-N-acetylhexosaminidase*, [ fecha de consulta: 14 de julio de 2015 a las 19:00]. Disponible en: <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.52>
- French National Centre for Scientific Research. CAZy. Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes). [ en línea]. Glycoside Hydrolase Family 3. [fecha de

consulta: 14 de julio a las 19:30]. Disponible en:  
<http://www.cazy.org/GH3.html>

- French National Centre for Scientific Research. CAZy. Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes). [ en línea]. Glycoside Hydrolase Family 20. [fecha de consulta: 14 de julio a las 19:40]. Disponible en:  
<http://www.cazy.org/GH20.html>
- French National Centre for Scientific Research. CAZy. Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes). [ en línea]. Glycoside Hydrolase Family 20. [fecha de consulta: 14 de julio a las 19:40]. Disponible en:  
<http://www.cazy.org/GH20.html>
- French National Centre for Scientific Research. CAZy. Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes). [ en línea]. Glycoside Hydrolase Family 84. [fecha de consulta: 14 de julio a las 19:50]. Disponible en:  
<http://www.cazy.org/GH84.html>
- French National Centre for Scientific Research. CAZy. Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes). [ en línea]. Glycoside Hydrolase Family 116. [fecha de consulta: 14 de julio a las 19:50]. Disponible en:  
<http://www.cazy.org/GH116.html>

