

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE HIDROFOBINAS EN CULTIVO SUMERGIDO DE *Lecanicillium lecanii* INMOVILIZADO EN ESPUMA DE POLIURETANO

Jennyfer Hernández,¹ Guadalupe Santander,¹ Ana Torrealba,¹ Jesús Rojas,¹ Zaizy Rocha-Pino,¹ Keiko Shirai^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Bioprocesos y subproductos Agro-industriales y Alimenticios.

Av. San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina, Ciudad de México. C.P. 09340. e-mail: zrop@xanum.uam.mx,
smk@xanum.uam.mx

Palabras clave: Hidrofobinas, inmovilización, purificación.

Introducción. Las hidrofobinas (HFB) son proteínas de bajo peso molecular (~10 kDa) constituidas principalmente por cisteína (1). Son producidas por hongos filamentosos como *Lecanicillium lecanii*. Basado en su sistema de autoensamblaje las HFB se dividen en dos clases: I y II. Las HFB poseen capacidad de autoensamblaje a una interfase hidrofílica-hidrofóbica para formar una película anfipática que transforma la superficie hidrofílica a hidrofóbica y viceversa (2). Las HFB son de gran interés por su papel en procesos antagónicos y aplicaciones biotecnológicas como la modificación de la hidropatía de superficies, así como biosurfactantes (3). El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la inmovilización de *L. lecanii* en espuma de poliuretano sobre la producción de las HFB en cultivo sumergido (SmC).

Metodología. *L. lecanii* ATCC 26854 fue inmovilizado en espuma de poliuretano (PUF) en SmC durante 5 días a pH inicial 6, 25°C y 100 rpm para obtener las biopartículas (Inm). Se inocularon con Inm (5% p/v) y el control con 10⁷ esporas/mL empleando medio de cultivo Czapeck suplementado con quitina coloidal en un bioreactor 3L. Los SmC se llevaron a cabo a pH 6, 25°C, 1 vvm y 100 rpm por 5 días (4). Una vez separada la biomasa (S), el caldo de cultivo (L) se trató por electroburbujeo para la obtención de HFBs clase I (2). Las biomásas de células libres (CL) y biopartículas (CInm) se trataron con SDS 2% (p/v) y ácido fórmico para extraer las HFB clase II y I, respectivamente. Se determinaron la proteína total como medida indirecta de biomasa e HFBs. Se calculó el rendimiento de HFBs respecto a la biomasa (Y_{HFB/x}). HFBs fueron analizadas mediante electroforesis y determinación de ángulo de contacto sobre vidrio y Teflón (2).

Resultados. El CL produjo mayor cantidad de biomasa (0.17±0.0001 mg proteína/mL) que con Inm y CInm. *L. lecanii* en CInm duplicó la producción de biomasa en comparación a la obtenida en Inm (Fig. 1A). *L. lecanii* favoreció el Y_{HFB/x} ca. 10 veces más de HFBs clase I que clase II, asimismo en aquellas asociadas en S fue significativamente mayor que en L (Fig. 1B).

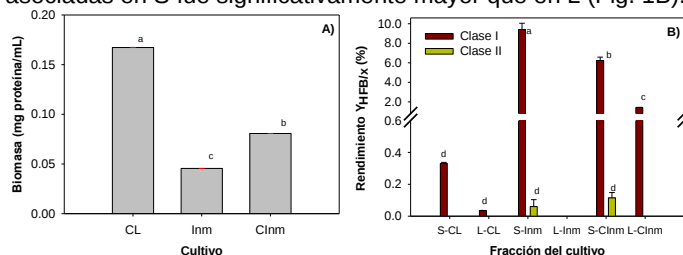


Fig. 1. Producción de biomasa (A) e HFB de *L. lecanii* (B) Y_{HFB/x} obtenido de la biomasa (S) y caldo de cultivo (L).

L. lecanii es capaz de producir HFBs clase I asociadas a micelio en SmC como respuesta a la hidrofobicidad y para facilitar su adhesión a quitina y/o el PUF. (2) Las HFBs clase I presentaron una masa molecular de 12 kDa (Fig. 2).

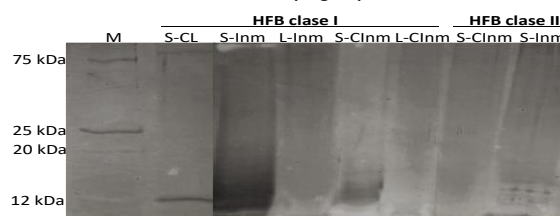


Fig. 2. SDS-PAGE de HFB de *L. lecanii* en biomasa (S) y caldo de cultivo (L) de CL, Inm-, CInm. M- estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos.

La actividad superficial mostró que las HFBs clase I fueron capaces de incrementar o reducir ca. 2 veces el ángulo de contacto del vidrio y Teflón, respectivamente, demostrando su habilidad para modificar la hidropatía de materiales (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad superficial de HFBs clase I de *L. lecanii* en CL.

Muestra	Φ (°) en Vidrio	Φ (°) en Teflón
Control	16.89 ± 0.49 ^a	131.15 ± 6.11 ^a
HFB-CL	34.05 ± 1.39 ^b	65.70 ± 3.26 ^b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba múltiple de Tukey Kramer (p<0.05).

Conclusiones. La inmovilización de *L. lecanii* en PUF incrementó el rendimiento de HFBs clase I como respuesta del hongo a adherirse a superficies sólidas hidrofóbicas.

Agradecimientos. Los autores agradecen el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto No. 237292) para la realización de este trabajo.

Bibliografía.

- Khalesi M. et al. (2013). *Industrial Crops and Products*. 43: 372-377.
- Rocha Pino Z. et al. (2015). *Process Biochem*. 50(1) 14-19.
- Przylucka A. et al. (2017). *Colloids Surf B Biointerfaces*. 159:913-923.
- Ulises Carrasco Navarro (2011). "Producción y purificación de β-N-acetilhexosaminidasa en cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano". Tesis de maestría en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana.