



### PRODUCCIÓN DE LISOZIMA POR *Aspergillus niger* B1 EN CULTIVO INMOVILIZADO USANDO UN MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA FERMENTACIÓN SUMERGIDA.

Lady L. Rosales-Cueto, Roberto Martínez-Campos, Carlos Regalado, Sergio Romero-Gómez\*. Laboratorio de Biotecnología de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, CU, Cerro de las Campanas s/n Col. las Campanas. Querétaro 76010 Qro. [ser69rom@gmail.com](mailto:ser69rom@gmail.com)\*  
Palabras clave: *lisozima, cultivo inmovilizado, Aspergillus niger*.

**Introducción.** Los hongos filamentosos puede usarse como fabricas metabólicas, ya que pueden procesar y secretar proteínas recombinantes, aunque usualmente en bajas concentraciones comparado con las reportadas para proteínas propias (1). El sistema de cultivo mas usado es la fermentación sumergida (FSm), pero se ha reportado que los cultivos inmovilizados (CI) permiten obtener mayores niveles de producción en menor tiempo (2). Es necesario estudiar diferencias en inducción génica, tipo y cantidad de crecimiento o secreción que permiten obtener estos mayores niveles de producción. En la mayoría de los casos el soporte del CI está formado por desechos agroindustriales o mezclas de carbohidratos que modifican el medio y las condiciones de cultivo. Una alternativa es la espuma de poliuretano (EPU) como soporte en un sistema modelo para la producción de lisozima recombinante, pero los niveles de producción obtenidos hasta ahora son bajos en comparación con otros CI, por lo en una primera aproximación para aumentar el rendimiento de este tipo de cultivo se reporta la producción de lisozima usando un medio de cultivo optimizado para la producción de lisozima en FSm (3).

El objetivo de este trabajo fue incrementar la producción de lisozima por *A. niger* cultivado sobre EPU, a niveles comparables a los obtenido en otros CI, para poder usarlo como sistema modelo en el estudio de la producción y secreción de proteínas recombinantes. Por hongos filamentosos,

**Metodología.** La cepa B1 de *A. niger* se cultivó en FSm y CI sobre espuma de poliuretano usando los medios de cultivo de Archer (4) modificado y Gheshlaghi (3). Se usaron 25 ml de medio inculados con  $10^6$  esporas/ml, adsorbidos en un gramo EPU en cubos de 5 mm por lado. Los matraces se incubaron 30° C y 150 RPM por 96 h. Cada 24 h, se extrajo un matraz y se midió el pH del sobrenadante y la producción de lisozima mediante la técnica de Archer y col. (4), la biomasa se determinó por diferencia en peso seco con el poliuretano inicial.

#### Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos con ambos medio de cultivo se presentan en el Cuadro 1. La cantidad de lisozima reportada por Gheshlaghi (3), usando la misma cepa en FSm fue de 209 mg /l. Al comparar ambos medios en CI podemos observar que la producción de lisozima pasó de 11 a 43 mg/g biomasa producida.

Medio	Biomasa (X) g/L	Lisozima (Y) (mg/L)	pH final
Archer	11	120	5.0
Gheshlaghi	31	1080	5.5

Cuadro 1. Producción de lisozima recombinante en cultivo inmovilizado usando el mediodo Archer y Gheshlaghi.

El incremento en la producción con el medio de Gheshlaghi es resultado de una mayor producción de biomasa, la cual produce más lisozima. Además, el pH de los cultivos se mantuvo más cercano al inicial de 6.5, lo que podría resultar en una menor inducción de proteasas en el medio y por tanto una mayor acumulación de lisozima secretada. Resultados similares han sido reportados para otros sistemas de CI, y se han atribuido al cambio en la forma de crecimiento y a la capacidad de estos sistemas para proveer el oxígeno necesario para metabolizar mayores cantidades de fuente de carbono. Queda como perspectiva medir la cantidad de proteasas producidas, y formular un medio de cultivo optimizado, usando espuma de poliuretano.

**Conclusiones.** Los resultados demuestran que es posible obtener niveles de producción de proteínas recombinantes comparables a los de otros CI usando EPU como soporte, esto abre la posibilidad de usarlo como sistema modelo en el estudio de la secreción de proteínas recombinantes por hongos filamentosos.

**Agradecimiento.** Se agradece apoyo PROMEP PTC-119 y al Prof. David Archer por su asesoría y la cepa B1.

#### Bibliografía.

- (1) Nevalainen KM, Te'o VS, Bergquist PL. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends Biotechnol. 23 (9): 468-474.
- (2) Talabardon M and Yang ST. (2005). Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. Biotechnol Prog. 21: 1389-1400.
- (3) Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, Douglas PL. (2005) Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods. Biotechnol Bioeng. 90(6): 754-760.
- (4) Archer DB, Jeenes DJ, MacKenzie DA, Brighthwell G, Lambert N, Lowe G, Radford SE, Dobson CM. (1990) Hen egg white lysozyme expressed in and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. Biotechnol. 8: 741-745.