

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE INVERTASA POR *Aspergillus niger* EN CULTIVO SUMERGIDO E INMOVILIZADO

Osbaldo Trejo-Díaz, Carlos Regalado-González, 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: *invertasa*, *cultivo inmovilizado*, *Aspergillus niger*.

**Introducción.** La producción de metabolitos por hongos filamentosos se realiza principalmente por fermentación sumergida (FSm), pero trabajos recientes reportan que algunas proteínas se expresan en mayores cantidades y de manera exclusiva en sistemas de cultivo inmovilizado (CI) (1), un ejemplo es la Glucoamilasa B de *A. oryzae* que solo se expresa en CI. La expresión diferencial en ambos sistemas de cultivo se ha atribuido a los cambios que existen entre ellos: actividad de agua ( $a_w$ ), acumulación de calor, composición de los soportes e incluso su presencia como barrera física para el crecimiento del hongo (2). Analizar por separado estos cambios es difícil debido a que en la mayoría de los sistemas de CI, el soporte está formado por carbohidratos de alto peso molecular que modifican todos estos factores a la vez, y algunos soportes llegan incluso a impedir el análisis del cultivo (3). Como alternativa se propone el uso de la espuma de poliuretano (EPU) como soporte inerte ya que no modifica la composición del medio o las condiciones de cultivo y no interfiere con su análisis posterior, este sistema se usó para estudiar la expresión diferencial de la invertasa de *Aspergillus niger* en FSm y cultivo inmovilizado.

El objetivo de este trabajo fue establecer un sistema modelo de cultivo que permitiera estudiar por separado el efecto de cada una de las diferencias reportadas sobre la expresión diferencial en *A. niger* cultivado por FSm y CI.

**Metodología.** La cepa de N402 de *A. niger* se cultivó en FSm y CI sobre EPU usando el medio AMC con 100 g/l de sacarosa como fuente de carbono, para el análisis de la represión catabólica se añadieron 10 g/L de glucosa a los cultivos. Cada matraz contenía 25 ml de medio de cultivo con  $10^6$  esporas/ml, añadiendo un g de EPU cortado en cubos de 5 mm por lado. Los matraces se incubaron a 30°C y 200 RPM. Cada 24 h se extrajo un matraz, y se separó el sobrenadante, la biomasa se determinó por peso seco o por diferencia de peso seco para los CI. La actividad de invertasa se cuantificó por la técnica de DNS. Los extractos se sometieron a estudios de zimografía, la actividad de invertasa se determinó por medio de la detección de fructosa en geles de electroforesis incubados con sacarosa por medio de la técnica de rojo de tetrazolio. Los extractos fueron sometidos a separación por pl en el rotofor y las fracciones se ensayaron para detectar la actividad de invertasa en cada una de las fracciones obtenidas.

**Resultados y discusión.** La actividad máxima de invertasa en FSm fue de 1400 UI a las 72 h de cultivo, mientras que en CI fue de 3500 UI a las 36 h de cultivo. En la figura adjunta se muestra el análisis de la resistencia represión catabólica en la parte izquierda y el análisis de zimografía de la invertasa secretada en la parte derecha, como puede observarse en CI se secreta una sola especie molecular de invertasa, mientras que en



FSm se detectaron dos especies moleculares. El pl de las invertasas secretadas fue de 3.6 y 4.4 para FSm y 4.7 para CI. Se muestra que la FSm es sensible a represión catabólica, mientras que el CI continuó secretando invertasa a pesar de la adición de glucosa al medio inicial. Estos resultados han sido reportados de manera repetida para cultivos inmovilizados (3,4), y los resultados de la zimografía indican

que existe una expresión diferencial para la invertasa tal como se ha reportado para el gen de glucoamilasa B (2). Como siguiente paso, se plantea determinar el efecto del cambio del  $a_w$ , y la temperatura de incubación sobre la expresión de la invertasa en CI.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos confirman que se cuenta con un sistema modelo que reproduce el comportamiento reportado para otros sistemas de CI, lo que permitirá estudiar el efecto de cada una de las diferencias fundamentales del CI respecto a la FSm.

**Agradecimiento.** Agradecemos el apoyo PROMEP PTC-119, y la asesoría del Dr Gustavo Viniegra.

#### Bibliografía.

- (1) Oda et al. (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol.* 72(5):3448-57.
- (2) Kobayashi A, Sano M, Oda K, Hisada H, Hata Y, Ohashi S. (2007) The glucoamylase-encoding gene (*glaB*) is expressed in solid-state culture with a low water content. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(7):1797-1799.
- (3) Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gómez SJ, Díaz-Godínez G, Augur C. (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng. J.* 13:157-167.
- (4) Iwashita K. (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J Biosci Bioeng.* 94(6): 530-535.