



## PRODUCCIÓN DE LISOZIMA DE HUEVO DE GALLINA POR *Aspergillus niger*

Maricela Trejo-Macotela, Carlos Regalado-González, Sergio de J Romero-Gómez. Universidad Autónoma de Querétaro, CU. Cerro de las campanas s/n Querétaro, Qro. CP 76010, fax: (442) 1921304, ser69rom@gmail.com

*Palabras clave: Aspergillus niger, proteína recombinante, poliuretano*

**Introducción.** *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso usado para producir metabolitos de interés comercial, que es capaz de secretar proteínas heterólogas con modificaciones postraduccionales bien ejecutadas, lo que ha generado la idea de usarlo como fabrica metabólica. A pesar de que se han realizado múltiples avances para mejorar la producción de estas proteínas por *A. niger*, hasta la fecha no ha sido posible obtener niveles de producción comercial de una manera sistemática, esto se debe a que no existe suficiente conocimiento básico del proceso de secreción proteica por este microorganismo<sup>(1)</sup>. Estudios recientes han demostrado que el crecimiento en forma de micelio disperso produce mejores títulos de producción, con una mayor proporción de proteínas secretadas en comparación con el crecimiento en forma de pellet obtenido por fermentación sumergida<sup>(2)</sup>. El estudio de la secreción en este tipo de crecimiento ha estado limitado por el uso de soportes biodegradables que modifican la composición del medio de cultivo impidiendo su comparación directa con el sistema de fermentación sumergida y además imposibilitan el análisis completo de los resultados de la fermentación. La espuma de poliuretano (PUF) es un soporte ideal para este fin, por que es inerte, no biodegradable, tiene la geometría adecuada para permitir el crecimiento en forma de micelio y no interfiere con el análisis de la producción y secreción de proteínas<sup>(3)</sup>.

El objetivo del presente trabajo es el adquirir información básica acerca de la secreción de proteínas recombinantes por micelio disperso de *Aspergillus niger* por medio del análisis de la producción de lisozima de huevo de gallina (HEWL) usando PUF como soporte inerte y compararlo con la producción de la misma proteína en fermentación sumergida. Este es el primer paso para establecer una línea de investigación de la secreción de proteínas recombinantes por este hongo filamentoso usando técnicas moleculares.

### Metodología.

La cepa de *Aspergillus niger* B1 productora de HEWL fue cultivada en medio mínimo de Cove con la sustitución de NaNO<sub>3</sub> por NH<sub>4</sub>Cl y medio completo ACM/N/P con maltosa como fuente de carbono<sup>(4)</sup> usando PUF como soporte inerte y por fermentación sumergida. Se determinaron: biomasa por gravimetría, proteínas totales producidas por el métodos de Bradford y la actividad de lisozima por medio del ensayo de lisis de *Micrococcus luteus*<sup>(4)</sup>. Los resultados obtenidos para ambos sistemas de cultivo fueron comparados directamente. Se esta explorando cuales son las condiciones de cultivo que permitan obtener los mayores títulos enzimáticos con la mayor estabilidad en la lisozima producida.

**Resultados y discusión.** La biomasa producida en medio mínimo fue de 11 y 12 g/l, mientras que la lisozima producida fue 21 y 33 mg/l para fermentación sumergida y la de PUF, respectivamente. El medio completo permitió obtener una biomasa superior 14 y 22 g/l, con una producción de lisozima de 45 y 120 mg/l en fermentación sumergida y con PUF, respectivamente. En todos los casos el pico de actividad se alcanzó a las 72 h. El pH bajó mas en fermentación sumergida (4.0) que con el uso de soporte (5.0). El uso de medio completo permitió aumentar la producción de biomasa y de lisozima para ambos sistemas de cultivo, pero los cultivos con PUF como soporte inerte tuvieron un mayor crecimiento y mayores títulos de lisozima. Este resultado ya ha sido reportado para la producción de proteínas propias<sup>(3)</sup> y se ha atribuido a que la morfología de crecimiento en forma de micelio es la normal para hongos filamentosos<sup>(2)</sup>; otra posibilidad es que el PUF como soporte inerte resulta en una aireación mas adecuada, lo que permite aprovechar mas los nutrientes disponibles, esto explicaría el mayor crecimiento en medio completo con el uso de PUF<sup>(3)</sup>.

**Conclusiones** El PUF es una excelente opción para el estudio molecular de la secreción de proteínas por micelio puesto que no solo permite analizar por completo la fermentación, sino además aumentar la producción de proteínas recombinantes. Estos experimentos son el primer paso para el estudio de la secreción de proteínas recombinantes por hongos filamentosos que permita adquirir conocimientos básicos a fin de obtener mejores resultados de secreción de forma racional.

**Agradecimiento.** Agradecemos al Profesor David Archer por la donación de la cepa B1 y por su asesoría.

### Bibliografía.

- (1) Conesa A, Punt PJ, van Lwijk N, van den Hondel CAMJJ. (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. *Fung Genet Biol*; **33**: 157-171.
- (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) 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) Archer DB, Jeenes DJ, MacKenzie DA, Brighthwell G, Lambert N, Lowe G, Radford SE, Dobson CM. (1990) Hen egg white lysizyme expressed in and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. *Biotechnol.*; **8**:741-745.