



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



PRODUCCIÓN DE β -N-ACETILHEXOSAMINIDASA POR *Lecanicillium lecanii* INMOVILIZADO.

Ulises Carrasco¹, Alma Guadalupe Villa¹, Jonathan Cruz¹, Humberto González², Raquel Alatorre³, Keiko Shirai¹.

¹Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros.

²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atilxco No.186. Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (55)5804 4921. smk@xanum.uam.mx.

³Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo.

Palabras clave: β -N-acetilhexosaminidasa, *Lecanicillium lecanii*, Cultivo sumergido.

Introducción. La β -N-acetilhexosaminidasa (EC. 3. 2. 1. 52) cataliza la hidrólisis del enlace glicosídico de la diacetilquitobiosa y otros quitooligosacáridos, estas presentan aplicaciones biotecnológicas (1). El objetivo del presente trabajo fue la producción de β -N-acetilhexosaminidasa (Nhasa) por *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en espuma de poliuretano (PUF) bajo condiciones previamente determinadas (2).

Metodología. La biomasa inmovilizada en PUF (2) fue inoculada en un bioreactor de 3 L. La producción de Nhasa (3) fue realizada bajo las condiciones optimizadas de pH y agitación de 6 y 102 rpm, respectivamente (2). La predicción de Nhasa fue estimada por un modelo cuadrático ($R^2 = 0.9613$), cuyo máximo fue de 47.28 U/L. El control fue realizado con inóculo de esporas. La biomasa fue separada mediante filtración. El extracto enzimático crudo fue precipitado con 40 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipitado fue fraccionado en cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se realizó gel de electroforesis (SDS-PAGE) (4) y zimograma (4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamina como sustrato) (5) de las fracciones con actividad Nhasa.

Resultados. La Figura 1 muestra la cinética de actividad Nhasa con las condiciones optimizadas, tanto con el hongo inmovilizado como con el control, obteniéndose la mayor actividad con el hongo inmovilizado. En la Figura 2 se observa la elución de proteínas en SEC, las proteínas en los distintos pasos de purificación (Fig. 3A) y el zimograma (Fig. 3B). En la Tabla 1 se presentan los resultados de la purificación parcial de Nhasa.

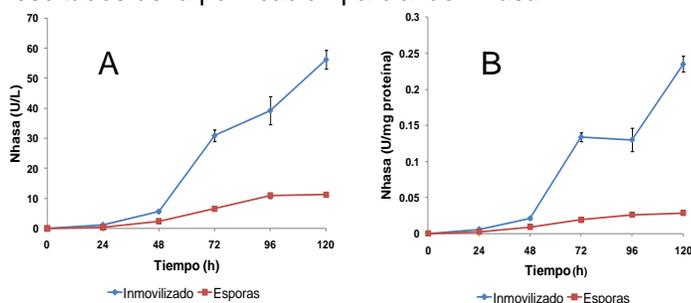


Figura 1. Actividad Nhasa de *Lecanicillium lecanii* inmovilizado en PUF y con esporas en un bioreactor de 3L a condiciones optimizadas. A) Actividad volumétrica, B) actividad específica.

Se comprobó el valor estimado de la producción de Nhasa por el modelo reportado por Carrasco (2), obteniéndose 56.17 ± 3.1 U/L. SDS-PAGE de las

fracciones con mayor actividad Nhasa (4-19) eluidas en SEC (Fig. 3), mostraron bandas entre los 38.7 y 100.2 kDa. Rocha-Pino y col. (5) reportaron quitinasas con pesos moleculares similares.

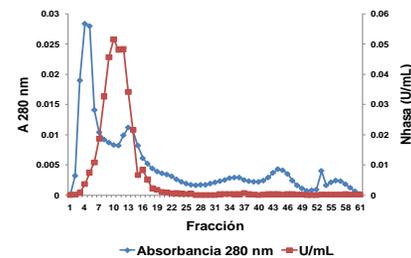


Figura 2. Cromatograma del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de EC en Sephacryl S-100 High Resolution.

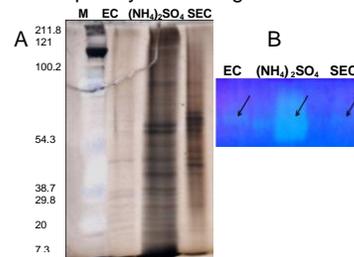


Figura 3. A) SDS-PAGE de los distintos pasos de purificación de Nhasa. B) zimograma. (M=marcador, EC= extracto crudo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ =precipitación, SEC= exclusión molecular)

Tabla 1. Purificación parcial de Nhasa

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1300	23.48	73.02	3.11	1	100
Precipitación (40%)	40	8.87	37.18	4.19	1.35	50.91
SEC	80	0.37	2.92	7.92	2.55	7.86

Conclusiones. El cultivo con *Lecanicillium lecanii* inmovilizado favorece la producción de Nhasa en comparación con células libres (esporas).

Agradecimientos. Los autores de este estudio agradecen a CONACyT No. 105628 por el financiamiento otorgado.

Bibliografía. (1). Ramirez-Coutiño L., Espinosa-Márquez J., Peter, MG, Shirai K. 2010. Bioresource Technol 101 (23) 9236-9240. (2). Carrasco-Navarro U. 2009. México: Universidad Autónoma Metropolitana; Tesis de especialidad en Biotecnología. (3). Tronsmo, A, Harman, G. (1993). Anal. Biochem. 208: 74-79. (4). Laemmli UK (1970) Nature 227:680-685. (5). Rocha-Pino Z, Viguera G, Shirai K. (2011). Bioproc Biosyst Eng. En prensa. DOI: 10.1007/s00449-011-0517-z