



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DETERMINACIÓN DE HIDROFOBINAS CLASE I Y II DE *Lecanicillium lecanii* PRODUCIDAS EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO UTILIZANDO DOS TIPOS DE SOPORTES INERTES.

Zaizy Rocha-Pino,^a Gabriel Viguera,^b Maribel Hernandez,^b José Campos-Terán,^b Sergio Revah,^b Francisco J. Fernández^a y Keiko Shirai^a

Universidad Autónoma Metropolitana. ^aDepartamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No.186. Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (55)5804 4921. ^bDepartamento de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa, Artificios 40-sexto piso, Col. Hidalgo, México, D. F., C. P. 01120. smk@xanum.uam.mx.

Palabras clave: hidrofobinas, *Lecanicillium*, cultivo en medio sólido.

Introducción. Las hidrofobinas (Hfbs) son proteínas anfipáticas de ca. 10 kDa producidas por hongos. Se ha reportado que la producción de Hfbs clase I se favorece en cultivo en medio sólido (CMS) en comparación con el cultivo sumergido (1). Las Hfbs son de gran interés por su participación en el proceso de patogénesis de hongos entomopatógenos como *L. lecanii* debido a que permiten la adhesión hongo-huésped, además de sus aplicaciones como surfactantes y para modificar superficies (2).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del soporte sobre la producción de hidrofobinas clase I y II de *L. lecanii* en CMS.

Metodología. *L. lecanii* fue incubado durante 6 días sobre espuma de poliuretano (PUF) o agrolita (A), como soportes, y quitina como fuente de carbono (1). La extracción de Hfbs se realizó a partir de la biomasa y el medio de cultivo (MC). Las Hfbs clase I fueron extraídas con ácido fórmico y solubilizadas en ácido trifluoroacético (TFA) o perfluorico (pF) (1). Las Hfbs clase II fueron extraídas con SDS 2% o ácido tricloroacético (TCA) (3). Se determinó peso molecular (M_w) con SDS-PAGE y actividad hidrofóbica mediante: a) el ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie de teflón previamente cubierta con el extracto de Hfbs (2) y b) la tensión superficial por axisimetría de la forma de una gota pendiente de extractos de Hfbs (3).

Resultados. El rendimiento de Hfbs en la biomasa fue mayor que el de las liberadas al medio de cultivo (Tabla 1), posiblemente debido a que requiere producirlas para adherirse a soporte y sustrato (2). El PUF favoreció la producción de Hfbs clase I, debido a que este presenta hasta el doble de retención de humedad y porosidad (influyendo en la difusión de oxígeno) en comparación con la agrolita, que favoreció a las Hfbs clase II (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de Hfbs clase I y II de *L. lecanii* en CMS.

Muestra	Soporte/ Paso	Proteína inicial ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Proteína total (μg)	*Rendi- miento (%)
Hfbs Clase I				
Biomasa	PUF/TFA	302.1 \pm 14.8	60.4	10.7
	A/TFA	69.07 \pm 7.3	13.81	3.15
MC	PUF/pF	61.7 \pm 6	6.2	0.3
	A/TCA	98.73 \pm 14.3	9.87	0.72
Hfbs Clase II				
Biomasa	PUF/ SDS	123.73 \pm 8	12.37	2.20
	A/ SDS	118.7 \pm 9.6	23.75	5.41
MC	PUF/TCA	66.06 \pm 5.7	6.61	0.33
	A/ TCA	180.4 \pm 4.7	18.04	1.31

MC- Medio de Cultivo.

En SDS-PAGE se observaron bandas de bajos M_w , característicos de Hfbs. El extracto de Hfbs clase I

obtenido del cultivo sobre agrolita no mostró bandas proteicas, por lo que se descarto para los siguientes análisis. Las Hfbs Clase II podrían ser las observadas entre 7 y 22 kDa (Fig. 1), de acuerdo a lo reportado (3,4).

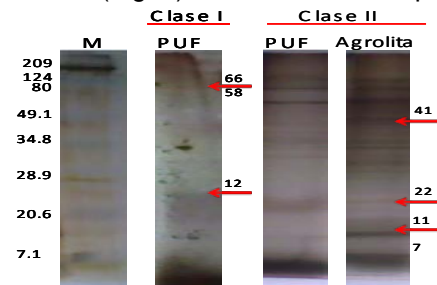


Fig. 1. Hidrofobinas extraídas de biomasa de *L. lecanii* en CMS.

Los extractos de clase I y II presentaron actividad superficial (Tabla 2). Las Hfbs clase II disminuyeron un 49% la tensión superficial del agua mientras que las Hfbs clase I sólo el 5% (Tabla 2), debido a que los extractos de Hfbs clase II presentaron mayor número de proteínas (Fig.1), las cuales posiblemente tuvieron actividad superficial. Las Hfb clase I produjeron una mayor disminución del ángulo de contacto que las de clase II (Tabla 2). Esto puede deberse a que las de clase I forman sobre las superficies películas (rodlets) en forma de fibrillas paralelas de tipo amiloide que son altamente insolubles en agua, a diferencia de las Hfbs clase II (2,3).

Tabla 2. Actividad hidrofóbica de extractos de Hfbs de biomasa de *L. lecanii* en CMS.

Muestra	Tensión superficial γ (mN m^{-1})	% Cambio respecto al agua	Ángulo de contacto	% Cambio respecto al teflón
Hfbs Clase I				
PUF	68.8 \pm 0.4 ^a	4.8 \pm 0.6	56.1 \pm 5.9 ^a	51.3 \pm 5.1
Hfbs Clase II				
PUF	37 \pm 0.1 ^b	49 \pm 0.1	119.5 \pm 2 ^b	15.6 \pm 1.3
A	37.1 \pm 0.3 ^b	48.7 \pm 0.5	108 \pm 2.8 ^c	24.3 \pm 1.9

Extractos de Hfbs de 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, γ agua= 72.3 \pm 0.2 mN/m, ángulo de contacto de agua en teflón= 131.9 \pm 0.6 Comparación múltiple de Tukey (p<0.05).

Conclusiones. Las características del soporte inerte empleado en CMS influyeron en la clase de Hfbs producidas, siendo mayores los rendimientos en biomasa que en el medio de cultivo.

Agradecimiento. Los autores de este estudio agradecen a CONACyT (No. 105628) por el apoyo otorgado.

Bibliografía.

1. Rocha-Pino Z, Viguera G, Shirai K. (2011). *Bioproc Biosyst Eng*. En prensa. DOI: 10.1007/s00449-011-0517-z
2. Wösten HAB y Willey J. (2000). *Microbiology*. 146: 767-773.
3. Askolin S, Linder M, Scholtmeijer K, Tenkanen M, Penttilä M, de Vocht ML y Wösten HAB. (2006). *Biomacromolecules*, 7, 1295-1301
4. Viguera G, Arriaga S, Shirai K, Morales M y Revah S. (2009). *Biotechnol. Lett*. 31: 1203-1209.