

# EXPRESIÓN A GRAN ESCALA DE LA ENDOQUITINASA

## *Trichoderma harzianum* EN *Escherichia coli*

María González; José Luis López; Ana Paulina Barba.

Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico S/N 38010, Celaya Gto. Fax:(461)17979

E-Mail: [apbarba@itc.mx](mailto:apbarba@itc.mx)

*Palabras claves: gen ech42, endoquitinasa, medio mínimo*

**Introducción.** En los últimos años ha nacido un gran interés sobre el biocontrol de plagas en agricultura. La quitina al ser un componente estructural esencial de la pared celular de hongos fitopatógenos y del caparazón de los insectos plaga, es degradada por un grupo de enzimas llamadas quitinasas, de ahí que una aplicación importante de estas enzimas sería a través de la formulación de funguicidas o insecticidas. Los campos de aplicación biotecnológica de las quitinasas, no solo se reduce a un enfoque de biocontrol, sino que cada día son más amplios por ejemplo se han propuesto a las quitinasas para la producción de quitina-oligosacáridos los cuales toman importancia por sus posibles actividades biológicas, para la producción de biomasa microbiana con aplicaciones en acuicultura, su empleo para la obtención de protoplastos, en la degradación y reutilización de desechos marinos como los del camarón, también se ha sugerido el uso de quitinasas para combatir importantes infecciones micóticas superficiales entre otros. De ahí el interés por producir las quitinasas a gran escala empleando sistemas que sean redituables.(1)

El objetivo del presente trabajo es establecer las condiciones de expresión a gran escala de la endoquitinasa de *Trichoderma harzianum* en *Escherichia coli*, para obtener altos rendimientos empleando un medio mínimo y una concentración de inductor que haga de este sistema, una forma de expresión y purificación de bajo costo, para este trabajo se tomaron como base los resultados obtenidos en el trabajo de Lozano y col.(2).

**Metodología.** Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21(D3)pLysS. transformada con el gen *ech42* por Lozano y col.(2), tomando como base las condiciones de expresión en este trabajo, se probaron diferentes concentraciones de IPTG, a una temperatura de 37°C, empleando un preinóculo de 18 horas para inocular volúmenes de 250 ml en matraces de 500 ml hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 590 nm con una agitación de 200 rpm, probándose diferentes tiempos de inducción, empleando un medio mínimo M9, en lugar de medio LB utilizado en el trabajo anterior, lo cual reduce el costo de la expresión. El medio mínimo a utilizar es una formulación sobre glucosa como fuente de carbono y una serie de sales, las concentraciones de IPTG que se probaron fueron de 0.1mM, 0.2mM,0.3mM y 0.4mM, durante tiempos de inducción de 3 horas, 5 horas y durante toda la noche. Se realizaron geles de poliacrilamida para verificar el peso molecular de la enzima que es de 42kDa. Se determinó la actividad enzimática de la proteína después de haber sido purificada en columnas de afinidad de Ni-NTA. Se realizó la cristalización de la proteína obtenida, empleando el kit Cristal Srenn.

**Resultados y discusiones.** Las condiciones bajo la cual se observa una expresión adecuada fueron a una concentración celular a 0.3 de Abs a 590nm e induciendo con una concentración de IPTG de 0.3 mM, durante un tiempo de 3 horas la producción de endoquitinasa no tenía cambios significativos comparados con las otras condiciones que implicaban mayor concentración de inductor y durante un mayor tiempo de inducción, lo cual llevaba aun costo agregado a la expresión de la proteína.. La enzima después de purificarla en columnas de afinidad Ni-NTA presenta actividad. Actualmente la endoquitinasa se encuentra en proceso de cristalización.

**Conclusiones.** Los resultados indican que la expresión de la endoquitinasa de *Trichoderma harzianum* empleando el medio mínimo M9 y una menor concentración de IPTG disminuirá considerablemente el costo de expresión y con ello hace más costeable el sistema de expresión y purificación de la endoquitinasa en *Escherichia coli*. Recientemente se ha comenzado a trabajar sobre un nuevo sistema de expresión extracelular, empleando *Pichia methanolica*, con lo cual se pretende disminuir no solo el costo de la expresión, sino también el de la purificación, haciendo de este sistema en forma global menos costoso para la producción de la enzima a escalas mayores.

### **Agradecimiento.**

Proyecto COSNET 610-99. González Cuevas, agradece a COSNET por la beca.

### **Bibliografía:**

1. Prado L.A., Huerta S., Rodríguez G., Saucedo G.,(1999).Las quitinasas bacterianas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas. En:*Avances en purificación de enzimas en biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 287-311.
2. Lozano, M.C., Navarrete,J.L., Herrera-Estrella,(1999). Expresión y purificación de la quitinasa de *Trichoderma harzianum* y su utilización en biocontrol. *Memorias de VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IVC Congreso Latinoamericano de biotecnología y bioingeniería* Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. Huatulco, Oaxaca, México. 12 al 17 de septiembre de 1999 .532.