

SEPARACIÓN DE LACASA Y PROTEASA PROVENIENTES DE UN CULTIVO LÍQUIDO DE *Pleurotus ostreatus* UTILIZANDO SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS

Sánchez-Trasviña, Calef¹, Enriquez-Ochoa, Daniela¹, Arellano-Gurrola, Clarisa¹, Tinoco-Valencia, Raunel², Rito-Palomares, Marco³, Serrano-Carreón, Leobardo², Mayolo-Deloisa, Karla¹

¹Tecnológico de Monterrey, Centro de Biotecnología-FEMSA, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Monterrey, Nuevo León, 64489, ²Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos, 62210,

³Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, Nuevo León, 64710; kmayolo@itesm.mx

Palabras clave: Lacasa; Proteasa; *P. ostreatus*.

Introducción. Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, por ello tienen diversa aplicación industrial (1, 2). Su producción ha sido estudiada utilizando basidiomicetos; ya que son capaces de crecer en sustratos de bajo costo, la enzima es extracelular y exhibe un alto potencial de oxido-reducción (2). Sin embargo, su producción en tanques agitados a través de la fermentación de *P. ostreatus*, es afectada por la producción simultánea de proteasas extracelulares (2). Una estrategia para la separación de ambas enzimas son los sistemas de dos fases acuosas (SDFA), ya que proveen diferentes ventajas, incluyendo su bajo costo y fácil escalamiento (3).

El objetivo del presente trabajo es establecer las condiciones óptimas para la separación de lacasa y proteasa en fases opuestas utilizando SDFA de distintos tipos.

Metodología. El extracto fue producido mediante una fermentación líquida de *P. ostreatus*, posteriormente fue liofilizado y utilizado en todos los experimentos de SDFA. Se construyeron 13 SDFA: 7 PEG-sal, 3 UCON-sal y 3 PEG-dextrano, en los cuales se evaluó la partición de lacasa y proteasas. Todos los SDFA tenían un peso total de 2 g con 10% (p/p) de extracto. En cada fase se determinó la actividad enzimática de lacasa y proteasas, además de proteína total.

Resultados. En los sistemas PEG-sal, primero se evaluó el efecto del peso molecular (PM) del PEG a través del logaritmo del coeficiente de partición ($\ln k_p$). Se demostró que ambas enzimas particionan principalmente hacia la fase rica en PEG. Al aumentar el PM del PEG, la lacasa migra gradualmente hacia la fase inferior mientras que la proteasa aumentaba su partición hacia la fase superior (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del PM del PEG en la partición. Los SDFA tenían relación de volúmenes (V_R) de 0.33 y longitud de línea de corte (LCC) de 15% (p/p).

Peso molecular (g mol ⁻¹)	$\ln k_p$		
	Lacasa	Proteasas	Proteína total
400	6.97 ± 0.34	1.66 ± 0.23	2.68 ± 0.06
1000	5.62 ± 0.07	4.83 ± 0.12	1.48 ± 0.04

Posteriormente, el efecto de la relación de volúmenes (V_R) fue analizado y se demostró que la afinidad de ambas enzimas a la fase superior disminuía cuando el V_R aumentaba (Tabla 2). Por otro lado, las proteasas aumentaron su actividad en ambas fases cuando el V_R aumentaba. Por ello, se seleccionó un sistema PEG-sal de PM PEG 400 g mol⁻¹ y V_R 0.33 para analizar el efecto de la longitud de línea de corte (LCC).

Tabla 2. Efecto del V_R en la partición. Los SDFA tenían un PM de PEG de 400 g mol⁻¹ y LCC de 15% (p/p).

V_R	$\ln k_p$		
	Lacasa	Proteasas	Proteína total
0.33	6.97 ± 0.34	1.66 ± 0.23	2.68 ± 0.06
1	3.72 ± 0.43	-0.01 ± 0.06	1.13 ± 0.09

El efecto de la LCC se evaluó a 15, 25, 35 y 45% (p/p) y se observó que la afinidad de las enzimas a la fase superior disminuyó al aumentar la LCC. La mayor actividad específica de ambas enzimas se observó a una LCC de 45% (p/p). Los mejores resultados se obtuvieron con el sistema PEG 400 g mol⁻¹, V_R 0.33 y LCC 45% (p/p).

En los sistemas PEG-dextrano se analizó el efecto del PM del PEG (3350, 4600 y 6000 g mol⁻¹). Se observó que la lacasa migraba a la fase superior ($\ln k_p$ 1.49) alcanzando un porcentaje de actividad del 95% a un PM de PEG de 4600 g mol⁻¹. Este sistema fue seleccionado como el más adecuado.

Con el fin de mejorar la separación, se seleccionaron los SDFA PEG-sal y PEG-dextrano con mejor resultado para realizar dos SDFA consecutivos. En los sistemas PEG-sal, el segundo SDFA cambió la partición de la proteasa hacia la fase inferior mientras que la lacasa incrementó su partición hacia la fase superior. En los sistemas PEG-dextrano, el segundo SDFA aumentó la preferencia de ambas enzimas hacia la fase inferior. El efecto en el factor de purificación (FP) de la lacasa se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto en el FP al realizar dos SDFA consecutivos.

Sistema	Factor de purificación	
	Sistema 1	Sistema 2
PEG-sal	3.26	4.30
PEG-dextrano	4.71	5.32

Conclusiones. En los SDFA PEG-sal y PEG-dextrano se observó la separación de ambas enzimas. El uso de SDFA PEG-dextrano es más adecuado para la separación *in situ* de las enzimas por su baja concentración de polímeros y sales, lo cual permitiría el crecimiento del hongo. Mientras que dos SDFA consecutivos PEG-sal son más adecuados para la separación de las enzimas posterior al proceso de fermentación.

Agradecimientos. Calef Sánchez-Trasviña y Daniela Enriquez-Ochoa agradecen al CONACyT por el apoyo otorgado con las becas 415543 y 712327, respectivamente.

Bibliografía.

- Kunamneni A *et al.* (2008) Recent Pat Biotechnol. 2:10-24.
- Tinoco-Valencia R *et al.* (2014) J. Biotechnol. 177: 67-73.
- Mayolo-Deloisa K *et al.* (2009) Process Biochem. 44: 435-439.

