

**PRODUCCIÓN DE QUITINASAS DE *Verticillium lecanii* EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO UTILIZANDO POLIURETANO COMO SOPORTE.
(CHITINASES, N-ACETYLHEXOSAMINIDASES AND PROTEASES OF *Verticillium lecanii* IN SOLID STATE FERMENTATION USING POLYURETHANE FOAM AS INERT CARRIER).**

Ma. del Carmen Marín Cervantes, Elizabeth Valgañón Cruz, Yoyi Matsumoto, Gustavo Viniegra González y Keiko Shirai*

Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Lab. de Biopolímeros. Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina Iztapalapa. D.F.

Tel. 58044921/Fax 5804 47 12. e-mail: smk@xanum.uam.mx

ABSTRACT. Effect of moisture content on enzyme production was studied in a solid state fermentation system (SSF), Koji style. Polyurethane foam (PF) was used as inert carrier, where the media with added colloidal chitin was impregnated, 75, 85 and 90 % of moisture content was varied, with an initial pH of 6. Spores of *Verticillium lecanii* ATCC 2685 were inoculated and incubated at 25°C. For some experiments glucose was added to colloidal chitin media. Despite of biomass production was higher for media with supplemented glucose than chitin media the chitinolytic activity was significantly lower. The highest N-acetylhexosaminidase activities were achieved at 85% (370 U/g of nutrient). Endochitinases were produced earlier since 24 hours, N-acetylhexosaminidases and proteases reached the maximal values after 48 hours of fermentation. The advantages of SSF for enzyme production using PF are that biomass can be measured directly, ease of biomass and carrier separation into enzymatic extract which is highly concentrated with less impurities that makes easy further purification.

INTRODUCCIÓN. La fermentación en medio sólido (FMS) se define como un proceso que se desarrolla prácticamente en ausencia de agua libre, y que se lleva a cabo en sustrato sólido o semi sólido¹. Los sustratos utilizados en FMS, deben cumplir ciertas propiedades físicas y biológicas como son: nula toxicidad, máxima absorción, alta resistencia mecánica, porosidad macroscópica. En FMS a diferencia del cultivo sumergido es posible utilizar una mayor concentración de sustratos, sin causar inhibición, obtener extractos enzimáticos más concentrados, facilitando la purificación². La FMS utiliza dos tipos de soportes: i) sustrato y soporte es el mismo, y ii) soporte inerte y el sustrato se adiciona como medio de cultivo. En este último tipo de soporte se encuentra la espuma de poliuretano (PUF), la cual permite cultivar el microorganismo de interés en un medio definido, facilitando la separación del producto¹. Recientemente el PUF ha sido usado como un soporte inerte para la producción de enzimas en FMS, permitiendo una medición directa de la producción de biomasa, junto con el consumo de sustrato empleado². El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del contenido de humedad en FMS sobre el crecimiento de *V. lecanii* y producción de quitinasas y proteasas.

METODOLOGIA. El medio de cultivo utilizado tenía una relación de C/N de 5.5, cuya composición fue la siguiente (g/l): quitina como fuente de carbono y nitrógeno 35.97, NaNO₃ 3.73, K₂HPO₄ 3.0, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.096, KCl 0.5, y PUF 40 g. El medio fue ajustado a un pH inicial de 6. El PUF fue molido, procurándose un tamaño aproximadamente entre 0.3 mm a 0.5 mm, lavado y secado a una temperatura de 70 °C. Se evaluaron tres proporciones agua: nutrientes: soporte. La fermentación se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 250 mL con un peso total final de 14 g, inoculando con suspensión de esporas de *V. lecanii* ATCC 26584 e incubando a 25°C.

La actividad quitinolítica fue determinada mediante la liberación de p-nitrofenol (N-acetilhexosaminidasas) y reducción de turbidez en soluciones de quitina coloidal (endoquitinasas)³.

La actividad proteolítica se determinó mediante reacción del extracto enzimático con caseína midiendo cambios de absorbancia a 280 nm⁴. La biomasa se determinó por peso seco.

RESULTADOS Y DISCUSIONES. En la figura 1 se muestra la producción de N-acetil hexosaminidasa (NHasa). El contenido de humedad en el medio afectó significativamente la producción de NHasa. En medios con una humedad de 75 y 85%, la actividad enzimática se detectó desde las primeras horas (24 h), correspondiente a la fase de adaptación. En los medios con 91% de humedad, la actividad comienza a las 48 h, que es el inicio de la fase estacionaria de crecimiento, en esta condición tenemos bajos rendimientos de enzimas. La mejor condición fue 85% de humedad con rendimiento de NHasa de 370 U/g de nutriente (figura 1).

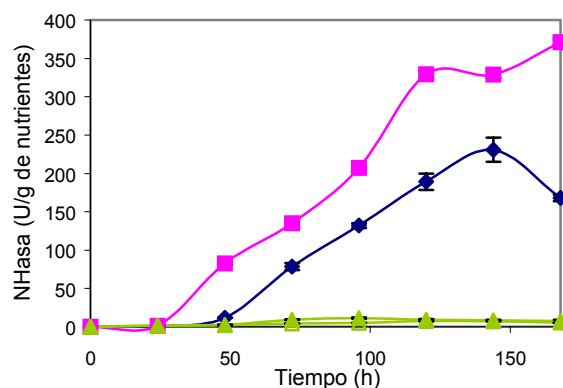


Figura 1. Producción de N-acetilhexosaminidasa con diferentes contenidos de humedad:
 ◆75%,■85%▲91%.

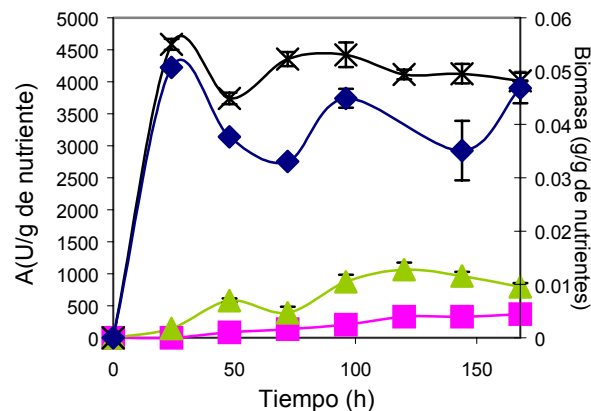


Figura 2. Actividades enzimáticas y biomasa a través del tiempo de cultivo de *V. lecanii* con 85% de humedad:
 ▲Proteasas, ■N-acetilhexosaminidasa, ×Endoquitinasas, ◆Biomasa.

En la figura 2, se muestran las diferentes actividades enzimáticas, así como el crecimiento microbiano en el medio con 85% de humedad. La producción de endoquitinasas se observa desde las primeras horas de fermentación, mientras que las proteasas se producen al final de la fermentación.

Agradecimientos.

Los autores agradecen a CONACyT por el apoyo a través del proyecto No. 400200-5-J33566-E.

REFERENCIAS.

1. Zhu, Y., Smits J.P., Knol, W., y Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology letters*, 16(6):643-648.
2. Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., y Viniegra-González, G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26: 271-275.
3. Tronsmo, A. y Harman, G.E. 1993. Detection and quantification of N-acetyl-b-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry* 208:74-79.
4. Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of General Physiology*. 30: 291-310.