

## ENZ-9

### PURIFICACIÓN PARCIAL DE QUITINASAS Y PROTEASAS PRODUCIDAS POR *Verticillium lecanii* ATCC 26854 USANDO QUITINA DE DESECHOS DE CAMARÓN (PARTIAL PURIFICATION OF CHITINASES AND PROTEASES PRODUCED BY *Verticillium lecanii* ATCC 26854 IN SUBMERGED FERMENTATION USING CHITIN FROM SHRIMP WASTE SILAGE AS ELICITOR)

Yoyi Matsumoto, Azucena Lucio 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. 58044711/Fax 5804 47 12

E-mail: smk@xanum.uam.mx

**Abstract.** Production of chitinolytic and proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungi *V. lecanii* was investigated in submerged fermentation supplemented with chitin from shrimp waste silage, as sole carbon source. Enzymatic extract was obtained after five days of culture at 25°C and pH 6. Chitinolytic and proteolytic enzymes were partially purified by ultrafiltration, followed by salting out with ammonium sulfate (70 %) and isoelectric focusing and SDS/PAGE electrophoresis. After partial purification three chitinases were detected with isoelectrical pIs of 2.5, 3.5 and 5.5, and four proteases with 4, 6, 7, and 8. Molecular weight of the enzymes were determined 31 and 66 kDa.

**Introducción.** El peso molecular de las quitinasas microbianas se encuentra entre 20 a 120 kDa, este va a depender del sustrato y microorganismo utilizado para la producción. El peso molecular de las quitinasas de hongos se encuentra por arriba de 30 kDa<sup>1,2</sup>. Por ejemplo, *Pycnoporus cinnabarinus* produce una quitinasa de 38 kDa, *Trichoderma harzianum* presenta unas exoquitinasas de 81 y 39 kDa, y *T. reesei* una de 58 kDa, *Metarhizium anisopliae* presenta una N-acetilglucosaminidasa de 110 kDa<sup>2</sup>. Por otro lado, reportes en donde la ultrafiltración es aplicada para la purificación son escasos. En este trabajo se hizo ultrafiltración como método de purificación, seguida de una precipitación con sulfato de amonio (70%), por ultimo electroenfoque y electroforesis para conocer el punto isoelectrico y el peso molecular de quitinasas y proteasas producidas por *Verticillium lecanii*.

**Metodología.** Para la obtención del extracto crudo enzimático, *V. lecanii* ATCC 26584 se cultivó en matraces erlenmeyer con medio de cultivo Czapeck con 10 g/l de quitina cruda, como inductor de quitinasas. Los pasos de purificación fueron ultrafiltración (membranas de 10 y 50 kDa), precipitación con sulfato de amonio (70 %), electroenfoque (separación por punto isoelectrico) y se verificó homogeneidad mediante electroforesis (geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes). La actividad quitinolítica se determinó por la liberación de *p*-nitrofenol en cada paso de purificación<sup>4</sup>, y la actividad proteolítica se midió con caseína al 2% (p/v). La determinación de proteína se llevo a cabo mediante el método de Bio Rad, que se basa en la técnica de microensayo de Bradford.

**Resultados y discusión.** Se hicieron tres diferentes estrategias de ultrafiltración utilizándose membranas de 10 kDa y 30 kDa, en donde no se observo actividad quitinolítica en el permeado, concentrándose en el retenido con el aumento esperado de actividad específica. En este paso de purificación se eliminaron moléculas de bajo peso molecular que interfieren e etapas posteriores de purificación. Posteriormente, el retenido se precipito con sulfato de amonio, y se dializó sin que hubiera pérdida de actividad enzimática como se puede observar en la tabla 1.

En el electroenfoque se detectaron tres picos con actividad quitinolítica, los puntos isoelectricos fueron 2.5, 3.5 y 5.5 (figura 1), mientras que para proteasas se encontraron 4 picos, los puntos isoelectricos son de 4, 6, 7, y 8. Finalmente haciendo electroforesis se detectaron tres bandas, con

pesos moleculares entre 31 y 66 kDa. El extracto enzimático se purifico 20 veces con respecto a las actividades iniciales (tabla 1).

Tabla 1. Actividad total y específica de quitinasas de los diferentes pasos de purificación, con membrana de 10 kDa y 30 kDa.

Tipo de membrana de ultrafiltración	Paso de purificación	Actividad Total (U)	Actividad Especifica (U/mg de proteína)	Purificación	Rendimiento (%)
	Inicial	152.7538726	8.91532253	1	100
10 kDa	Retenido	468.3017785	87.27400588	9.789214646	306.57277
	Permeado	0	0	0	0
30 kDa	Retenido	590.3614458	168.3842722	18.88706456	386.478873
	Permeado	0	0	0	0
	Precipitado	501.1474469	137.1990524	15.38912944	328.075117
	Sobrenadante	0	0	0	0
	Dializado	380.1491681	153.6632501	17.23585991	248.86385

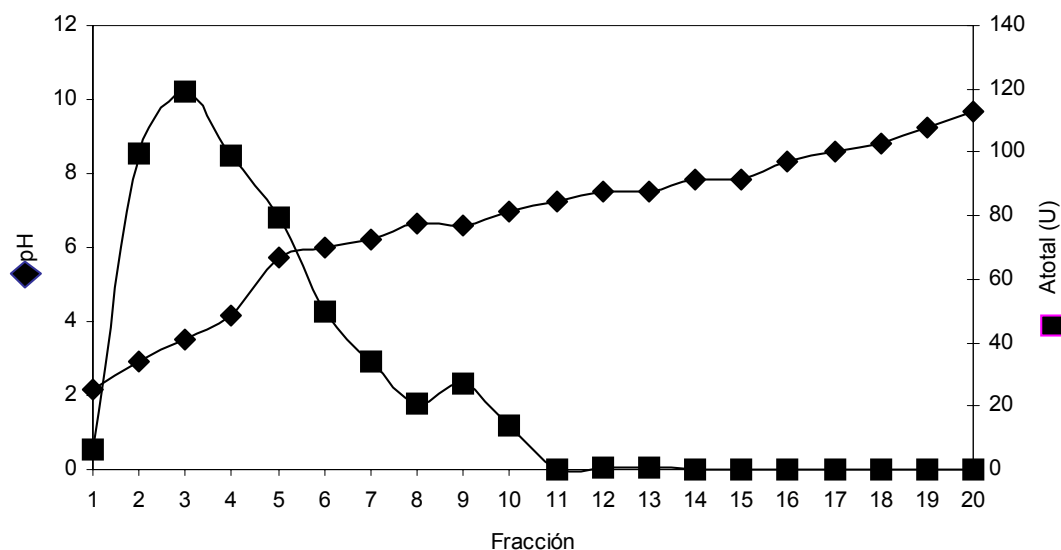


Figura 1. Gradiente de pH y actividad total de quitinasas de las fracciones con membrana de 10 kDa en UF, y amfolitos de 3 – 10.

#### Agradecimientos.

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

#### Referencias.

1. San-Lang W. y Isu-Chang W. 1997. Purification and Characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. Pag. 380-386.
2. Tronsmo, A. y Harman, G.E.1993. Detection and quantification of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry* 208:74-79.
3. Coudron T. A.; Kroha M. J. y Ignoffo. C.M; Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. 1984. *Comp. Biochemistry. Physiology*. Vol. 79B. No.3. pp 339-348.
4. De la Cruz, J.; Hidalgo-Gallego, A.; Lora, J.M.; Benitez, T.; Pintor-Toro, J.A. y Llobel A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal Biochemistry* 206:859-867.