



CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PEROXIDASA VERSÁTIL DE *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 Y SU EXPRESIÓN EN *Yarrowia Lipolytica*

Edgar Balcázar, Edgar Dantán, Brenda Valderrama, Rafael Vázquez-Duhalt, y Jorge L. Folch. Centro de Investigación en Biotecnología Universidad Autónoma de Estado de Morelos Av. Universidad 1001, col. Chamilpa Cuernavaca 62210, Morelos, México. Tel. (777) 3 29 70 57. Ext. 3524 Fax: (777) 3 29 70 30
jordi@buzon.uaem.mx

Palabras clave: peroxidasa versátil, biorremediación, expresión heteróloga

Introducción. La rápida expansión y la sofisticación creciente de la industria, en especial la industria del petróleo, se ha traducido en un incremento en la cantidad y la complejidad de los residuos tóxicos (1). La generación de estos residuos, que conllevan al deterioro de la calidad del medio ambiente, ha venido desarrollar medidas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico, siendo la biorremediación una alternativa para estos problemas.

Entre los organismos utilizados en la biorremediación se encuentran los hongos de podredumbre blanca. Su sistema extracelular enzimático está involucrado en la degradación de la lignina, y consiste principalmente de enzimas oxidativas: lacasas, lignino peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP) (2) y versátil peroxidasas (VP). La versátil peroxidasa de *Bjerkandera adusta* tiene una estructura híbrida entre la LiP y MnP. Este híbrido combina las propiedades catalíticas de las peroxidasas antes mencionadas, siendo capaz de oxidar sustratos típicos de la LiP y MnP (3) lo cual la hace muy interesante para su utilización en la biorremediación.

La importancia que estas enzimas tienen en la biorremediación ha llevado a su producción heteróloga en diversos organismos. Una alternativa aún poco explorada pero atractiva es *Yarrowia lipolytica*, ya que esta levadura es eficiente en la secreción y plegamiento correcto de proteínas heterólogas (4).

Metodología: se creció la cepa de *Bjerkandera adusta* UAMH 2858 en bran flakes para inducir la maquinaria ligninolítica del hongo. Se incubó 8 días y colectó micelio para extraer RNA total con el método de extracción por Trizol; se determinó la presencia del transcrito por northern blot. Se sintetizó cDNA y se realizó una librería con el kit BD Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit. Se amplificó el gen de la librería con los oligos aatggcctcaagcaactc y gtcccgccttgtaa ctaggattcg. Se clonó el gen de la VP en el vector integrativo y multicopia pINA1291 para darnos la construcción pEB001. Se transformó con pEB001 a la cepa de *Yarrowia lipolytica* Polh.

Resultados. Después de comprobar la presencia del transcrito de la VP por la técnica de Northern blot, se

construyó la librería de cDNA obteniendo un título de 6000 colonias independientes. Se hizo una extracción de plásmidos de la librería y se amplificó el gen de la VP por PCR obteniendo un producto de 1113 pb (Fig.1). Se obtuvo la construcción pEB001 con la clonación del cDNA de la peroxidasa versátil en el vector pINA1291. Se obtuvieron colonias de *Yarrowia lipolytica* transformadas con la construcción pEB001.

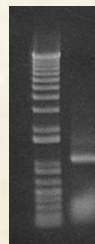


Fig. 1 producto de PCR de la VP 1113pb

Se presentarán datos de actividad y degradación de hidrocarburos

Bibliografía.

1. Martín, C, González, A, Blanco, M.J. (2004). Tratamiento biológico de suelos contaminados: contaminación con hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en el tratamiento de biorrecuperación. *Rev. Iberoam Micol.* (21): 103-120.
2. Ten, R, and Teunissen, P. J. (2001). Oxidative mechanism involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* (101): 3397-3413.
3. Pogni, R, Baratto, C, Giansanti, S, Teutloff, C, Verdin, J, Valderrama, B, Lenzian, F, Lubitz, W, Vazquez-Duhalt, R, and Basosi, R. (2005). Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry.* (44): 4267-4274.
4. Madzak, C. (2003). New tools for heterologous protein production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Research Singpost.* 37/661(2).