



EXPRESIÓN DEL GEN *mela* DE *Rhizobium etli*, QUE CODIFICA PARA UNA TIROSINASA, EN *Bacillus subtilis*.

Luis Robledo-Arratia, Natividad Cabrera-Valladares, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar y Guillermo Gosset.
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001,
Chamilpa, Cuernavaca, Mor., CP 62210. México. Fax (777) 3172388. gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: melanina, tirosinasa, *Bacillus subtilis*.

Introducción: Las melaninas son polímeros de compuestos indólicos presentes tanto en procariontes como en eucariontes; existen tres tipos, eumelaninas, feomelaninas y alomelaninas. Estos compuestos son producto de polimerización oxidativa y generalmente están unidas a un cromóforo; cubren un amplio rango de funciones biológicas, desde el mimetismo y la protección contra la radiación y los radicales libres, hasta el mantenimiento de equilibrios iónicos ambientales y como factores de virulencia. La eumelanina se produce por las actividades de cresolasa y catecolasa de la enzima tirosinasa a partir de L-tirosina. La melanina se usa comercialmente en cremas fotoprotectoras, en la industria de la transformación por sus propiedades de intercambio catiónico y de formación de radicales superóxido (1). *Rhizobium etli* hace simbiosis con la planta del frijol para fijar nitrógeno a través de nódulos. La tirosinasa de *R. etli* es codificada por el gen *mela* contenido en el plásmido simbiótico p42d que confiere resistencia a los mecanismos de protección de la planta (2). En una cepa de *Escherichia coli* que expresa el gen *mela* se obtuvo el 100% de conversión de tirosina en EuMel siendo el máximo nivel reportado (3). A partir de esto se vio que MelA tenía un sitio de inicio de traducción alternativo al que se consideró que codificaría para una proteína más pequeña.

El objetivo de este trabajo es determinar si a partir del sitio de inicio alternativo se codifica una tirosinasa activa y si ésta puede ser expresada en *B. subtilis* para producir una cepa melanogénica.

Metodología: Se diseñaron y sintetizaron los oligos para amplificar el gen contenido en el plásmido ptrcMUTmela, el producto fue ligado al plásmido pHCMC05, que se replica tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*; se electroporó en la cepa 168 de *B. subtilis*; se colocó en medios mineral y rico tanto sólido como líquido adicionados con CuSO₄ 20µg/ml, IPTG 0.1 mM y tirosina 0.4 g/l (4).

Resultados y discusión. Se generó la construcción XL1Blue/p05corta, al hacer patrones de restricción con *Xba* I y *Sma* I salieron dos fragmentos, uno de 8321 pb y otro de 1505 pb que corresponden al plásmido pHCMC05 y a la versión corta o alternativa del gen *mela* respectivamente.

La cepa 168 transformada fue sembrada en el medio adecuado para *B. subtilis* tanto en placas con agar como en líquido y colocada a 30 °C; como se observa en la figura 1, se encontró

que la coloración típica de melanina observada en *E. coli* se presentó en el medio que contenía las células con la versión corta del gen, mientras que en la cepa control, con el plásmido vacío, no se vio.



Fig. 1. Producción de melanina en medio mineral por la cepa 168/p05corta (A); la cepa control 168/p05 no presentó coloración (B).

Conclusiones. Se clonó y expresó el gen *mela* de *R. etli* CE3 en *B. subtilis*. La cepa 168 de *B. subtilis* transformada con el plásmido p05corta produjo eumelanina a partir de tirosina. Esta cepa podrá ser utilizada para la producción biotecnológica de melanina.

Agradecimientos. Se agradece el donativo de PAPIIT/UNAM IN203002-2 y la ayuda de la Unidad de Síntesis de Oligos del IBT.

Bibliografía.

1. Plonka, P. y Grabacka M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms, biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol.* 53 (3):429-443.
2. Piñero, S., Rivera, J., Romero, D., Cevallos, M., Martínez, A., Bolívar, F. y Gosset, G. (2006). Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance. *J Mol Microbiol Biotechnol.* En prensa.
3. Lagunas-Muñoz, V., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G. y Martínez, F. (2006). Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 101 (5): 1002-1008.
4. Cabrera-Valladares, N., Martínez, A., Piñero, S., Lagunas-Muñoz, V., Tinoco, R., de Anda, R., Vázquez-Duhalt, R., Bolívar, F. y Gosset, G. (2006). Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme Microb Tech.* 38:772-779.