

# Transformación y expresión heteróloga de lacasa en *Aspergillus niger* utilizando la técnica REMI

Alejandro Téllez-Jurado, Ainhoa Arana-Cuenca, Eduardo Márquez-Ortega, Octavio Loera y Gustavo Viniegra-González

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, CP 09360, México D.F., Fax: (0055)5804 6407, e-mail: [atj@xanum.uam.mx](mailto:atj@xanum.uam.mx).

Palabras clave: lacasa, *Aspergillus niger*, expresión heteróloga

**Introducción.** Existen sistemas de expresión heteróloga de lacasa en procariotas, en levaduras, en hongos filamentosos y en células animales. Los sistemas de expresión de lacasa basados en levaduras presentan problemas de secreción de la proteína heteróloga (1) ya que posiblemente las levaduras carecen de un sistema enzimático adecuado que lleve a cabo las correctas modificaciones post-traduccionales para la secreción y actividad de la lacasa. Los hongos filamentosos tienen varias ventajas respecto a otros sistemas de expresión como son la de realizar las modificaciones post-traduccionales apropiadas, la de ser considerados (algunos) como microorganismos GRAS y finalmente la de tener recombinantes estables que facilitan el control de la producción de la enzima recombinante.

En base a lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo el desarrollar un sistema de expresión heteróloga de lacasa en *Aspergillus niger*, para ello, se cuenta con un plásmido que lleva el gen lacasa de *Trametes versicolor* que permitirá la puesta a punto del sistema de expresión en medio líquido y sólido.

**Metodología.** El microorganismo utilizado en el presente trabajo fue la cepa C28B25 de *Aspergillus niger*. El protocolo para realizar la electroporación fue el descrito por Sánchez y Aguirre (2). Se utilizó el plásmido pPLF26 que fue digerido previamente con 4 enzimas de restricción (*ClaI*, *EcoRV*, *HindIII* y *SacI*) para linealizarlo. En cada ensayo de electroporación se utilizó 1 µg de ADN plasmídico y 5U de actividad enzimática para cada enzima de restricción. Los clones positivos se seleccionaron en medio mínimo-agar con 120 µg de fleomicina/ml (medio de selección). Se determinó actividad lacasa, proteína y peso seco a diferentes tiempos de incubación tanto en medio sólido (FES) como en medio líquido (FL) (3).

**Resultados y Discusión.** Se ensayaron diferentes tiempos de conidiación para optimizar el proceso de electroporación, obteniendo que el mejor fue a las 2 horas de incubación. Los resultados indicaron que la mayor tasa de transformación se obtuvo cuando se utilizó la enzima *EcoRV* con 15 clones positivos (Cuadro 1). Se realizó una selección previa en fermentación en FES utilizando como soporte espuma de poliuretano (3) y como base medio mínimo para determinar el clon con mayor producción lacasa y este fue el clon C28e3 con un aumento de 500 veces de actividad lacasa/ml con respecto a la cepa silvestre, por lo que los estudios de optimización se realizaron con este clon. Por lo tanto, se prepararon los diferentes medios de producción utilizando como base medio mínimo y 3 diferentes concentraciones de glucosa (10, 50 y 100 g/l).

Cuadro 1. Clones positivos obtenidos con las diferentes enzimas de restricción

Enzima	Cantidad	Clones/µg de ADN plasmídico
<i>EcoRV</i>	5U	15
<i>ClaI</i>	5U	5
<i>SacI</i>	5U	5
<i>HindIII</i>	5U	0

La mayor actividad se detectó en FES con 50 g/l de glucosa, la actividad fue de 210 mU/ml a las 52 h de incubación (1300 veces respecto al silvestre), en los demás medios (con 10 y 100 g/l de glucosa) se detectó actividad pero en menor proporción. Para el caso de la FL, en ninguno de los casos se detectó actividad lacasa. Resultados similares ya se han observado con otra enzima propia del hongo (3). Todos los ensayos descritos se realizaron también con la cepa silvestre detectándose solo actividad lacasa basal en FES y no en la FL. Finalmente, se realizó un zimograma para verificar la secreción de la enzima heteróloga observándose una proteína de aproximadamente 60 kDa que corresponde a la enzima descrita anteriormente para *Trametes versicolor*.

## Conclusiones.

1. La mejor tasa de transformación se obtiene con un tiempo de conidiación de 2 horas.
2. Bajo las condiciones ensayadas, se obtiene una mayor frecuencia de transformación con la enzima de restricción *EcoRV*.
3. La mayor actividad lacasa se detectó en FES a las 52 horas de incubación (210 mU/ml de actividad lacasa) utilizando como medio el medio mínimo suplementado con 50 g/l de glucosa obteniendo un aumento de 1300 veces respecto al microorganismo silvestre.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue posible gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México.

## Bibliografía.

1. Arana, A., (2002), Aplicaciones de la biología molecular: Identificación del basidiomiceto *Trametes* sp I62 y expresión heteróloga del gen *cglc1* en *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
2. Sánchez, O., Aguirre, J., (1996), Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia, Fungal Genet. Newslett., 43:448:51.
3. Romero-Gómez, S., Augur, C., Viniegra-González, G., 2000, Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation, Biotechnol. Lett., 22:1255-1258.