



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DETECCION DE ACTIVIDADES TRANS DI-HIDRODIOL DESHIDROGENASA (DDH) EN EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS DE LA CEPA YR-1 AISLADA DE SUELO CONTAMINADO CON PETROLEO

Guillermo Ulises Cortés Frausto, Areli Durón Castellanos, Alberto Flores Martínez, Roberto Zazueta-Sandoval.
Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Biología. Guanajuato, Gto.
Cp 36050. zazueta@quijote.ugto.mx

Palabras clave: dihidrodiol deshidrogenasa, biodegradación, hidrocarburos aromáticos

Introducción. En la naturaleza existen muchos m.o. que biodegradan compuestos contaminantes (1) entre estos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos que tienen propiedades tóxicas y carcinogénicas (2), son de los más persistentes (3). Las reacciones iniciales de la degradación incluyen la actividad de las dihidrodiol deshidrogenasas las cuales catalizan el segundo paso de la ruta (4). Existen escasos reportes en la literatura acerca de estudios sistemáticos de las dihidrodiol deshidrogenasas (DDH) fúngicas y particularmente ninguno en mucorales, así como tampoco existen reportes acerca de la detección de éstas enzimas por medio de zimogramas electroforéticos.

En el presente trabajo, se describe la detección de electromorfos con actividad de di-hidrodiol-deshidrogenasa, utilizando *trans* di-hidro-dihidroxi-naftalendiol como sustrato enzimático y NADP⁺ como aceptor de electrones para el revelado de la actividad enzimática, cuando el microorganismo fue crecido en diferentes hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono y energía.

Metodología. *Microorganismo de Estudio.* Hongo filamentoso aislado de suelo contaminado con residuos de petróleo, de los alrededores de la refinería de Salamanca, Gto., denominado YR-1, clasificado molecularmente como *Mucor circinelloides*.

Medios de Cultivo. YPG: Extracto de levadura 0.3%; peptona 1%; glucosa 2%; H₂O cbp 1 lt; pH 4.5 (5). Este mismo medio adicionado de agar (1.5%) fue utilizado como medio de almacenamiento. MMSP: Medio mínimo de sales (modificación del medio mínimo de Lee: KH₂PO₄ 2.5 g; MgSO₄ 0.2 g; (NH₄)₂SO₄ 5 g; NaCl 5 g; peptona de caseína al 0.1%; H₂O cbp 1 l. El medio para crecimiento, fue complementado con diferentes fuentes de carbono: Glucosa (BIOXON), naftaleno, fenantreno antraceno y pireno (SIGMA-ALDRICH).

Zimogramas de la actividad de Dihidro-diol-deshidrogenasa. No existen reportes acerca de la detección de Dihidro-diol-deshidrogenasas en geles. Los posibles electromorfos con actividad de dihidro-diol-deshidrogenasa, se detectaron por medio de variaciones realizadas al método descrito por Nikolova y col. (6), descritas por Durón y col. (7)

Resultados. En los zimogramas (figura 1) podemos observar un patrón de bandeo en los incisos c) y d) que nos sugiere la existencia de proteínas con actividad DDH,

a pH 10 y 12, sin embargo, es necesario tener datos cuantitativos de dicha actividad, para ello, se realizó un análisis espectrofotométrico a 340nm (cinética) a diferentes condiciones como se muestra en la Tabla 1.

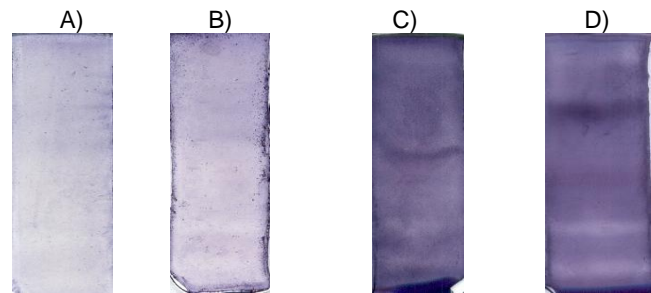


Fig. 1. Zimogramas, A) Extracto Naftaleno, buffer Citrato pH=5.0; B) Extracto Naftaleno, buffer Tris-HCl pH=7.0; C) Extracto Naftaleno, buffer Tris-HCl pH=10; D) Extracto Fenantreno, buffer Tris pH=12.2.

Tabla 1. Detección de la actividad específica en extracto de fenantreno de la *trans* di-hidro-dihidroxi-naftalendiol, en diferentes buffers y condiciones de pH.

| Buffer | Concentración de sustrato Trans-Naftalendiol | Actividad específica U = μ moles/mg proteína/min. |
|-----------------|--|---|
| Tris-HCl pH=10 | 100 μ M | 3.131×10^{-14} |
| | 20 μ M | 4.835×10^{-14} |
| Tris pH= 12.2 | 100 μ M | 4.934×10^{-14} |
| | 20 μ M | 2.338×10^{-14} |
| KCl/NaOH pH= 13 | 100 μ M | 1.084×10^{-13} |
| | 20 μ M | 7.925×10^{-14} |

Conclusiones. En la presente investigación, se logró establecer que en la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides* existen 3 bandas de proteína (1 en extracto de Naftaleno y 2 en extracto de Fenantreno) con actividad de DDH. Así como también condiciones como el tipo de buffer, pH y concentración de sustrato que afectan la detección de la actividad de la DDH.

Agradecimiento. Proyecto financiado por la Universidad de Guanajuato

Bibliografía.

1. Atlas, R.M., 1995. *Chem. Eng. News*. 12, 32-42
2. Cerniglia., C.E. 1997. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 324-333.
3. Hyatylainen, T., Oikari, A. 1999. *Chemosphere*. 38, 1135-1144.
4. Rogers, J. E. y Gibson, D. T. 1977. *J. Bacteriol.* 130 (3): 1117-1124.
5. Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J. 1962. *J. Bacteriol.* 84:841-858.
6. Nikolova P., y Ward, O.P. 1991. *Biotechnol Bioeng.* 20: 493-498.
7. Durón, C. A., Zazueta-Novoa, V., Silva, H., Alvarado, C. Y., Peña E., y Zazueta-Sandoval, R. 2005. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124: 279-288.