



## EXPRESIÓN DE UNA LACASA DE *Pycnoporus sanguineus* EN *Kluyveromyces lactis*

Catalina Morales Herrera, Odón Vite-Vallejo, Edgar Bálcazar-López y Jorge Luis Folch Mallol. Centro de Investigación en Biotecnología- Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad No. 1001 colonia Chamilpa. CP 62209. Cuernavaca, Morelos, México. [jordifo@gmail.com](mailto:jordifo@gmail.com)

Palabras clave: lacasa, expresión heteróloga, *Kluyveromyces lactis*.

**Introducción.** Los hongos de podredumbre blanca son capaces de transformar y mineralizar una gran cantidad de contaminantes orgánicos y en la mayoría de los casos están implicadas las enzimas que éstos utilizan para modificar y degradar la lignina. Algunas de ellas son la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, peroxidasa versátil y la lacasa. El creciente interés por esta última, se debe a que cataliza tanto la oxidación de compuestos fenólicos como no fenólicos en presencia de algunos intermediarios (mediadores redox) como el 2-6 dimetoxifenol y el ABTS (1). Se ha utilizado *Saccharomyces cerevisiae* como sistema heterólogo buscando una producción de lacasa en mayor cantidad, sin embargo se ha obtenido muy poca actividad posiblemente debido a una hiperglicosilación de la enzima. En el presente trabajo se logró expresar la lacasa del hongo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* (2) en la levadura *Kluyveromyces lactis* utilizando como vector de expresión el plásmido pE-PHO el cual contiene un promotor pPHO5 de *Saccharomyces cerevisiae*. El objetivo fue desarrollar una cepa de *K. lactis* que exprese eficientemente la lacasa de *Pycnoporus sanguineus*.

**Metodología.** Se amplificó el gen que codifica para la lacasa con el péptido señal nativo, el gen se subclonó en el vector para *Kluyveromyces lactis* pE-PHO. Las mejores condiciones de expresión fueron: 28° C, 100 µM de CuSO<sub>4</sub> y 10 mM de fosfato de potasio como inductor. Se concentró el sobrenadante de los cultivos de *K. lactis* usando el sistema de amicon con membrana de corte de 30 kDa (MILLIPORE). Para la cuantificación de la actividad de la lacasa recombinante se utilizó ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).

**Resultados.** Se logró expresar la enzima recombinante. Después de un proceso de concentración, se detectó la actividad de la lacasa recombinante; sin embargo, la actividad fue menor en comparación con la lacasa producida por *Pycnoporus sanguineus*, al tener 7 veces menos actividad específica (Tabla 1), posiblemente debido a una mayor glicosilación en comparación a la enzima nativa como lo sugiere su migración en un gel de actividad (Fig. 1).

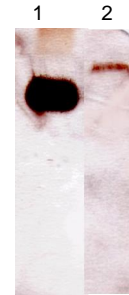


Fig. 1. Gel de acrilamida nativo al 10% teñido con 2,6 dimetoxifenol. Carril 1: Lacasa wt de el hongo *Pycnoporus sanguineus*. Carril 2: Lacasa recombinante de *Kluyveromyces lactis*.

Tabla 1. Cuantificación de actividad específica.

Sobrenadante enriquecido	Actividad Volumétrica µmol/mL*min	Proteína Total mg/mL	Actividad Especifica U/mg
<i>P. sanguineus</i>	16.9	2.279	7.41
Transformante pE-PHO sentido	3.12	2.890	1.07
Transformante pE-PHO antisentido (Control)	*ND	2.822	*ND

\*ND: No detectada

**Conclusiones.** Se encontró que la expresión de la lacasa en *Kluyveromyces lactis* tuvo menor actividad que la de *Pycnoporus sanguineus* posiblemente debido a que hubo una diferencia en el patrón de glicosilación de la misma.

**Agradecimiento.** CMH recibió una beca del proyecto FOMIX Morelos 93760.

- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. y Sannia, G. 2009. Review. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67: 369-385.
- Vite-Vallejo, O., Palomares, L. Dantán-González, E., Ayala-Castro, H. Martínez-Anaya, C., Valderrama, B. y Folch-Mallol, J. 2009. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 45:233-239.