XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE DEL GEN *mnp1* DE *P. chrysosporium* EN *A. niger* PARA SU APLICACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON PAHs.

Karina Gutiérrez, Laura García, Ángel Absalón, Diana Cortés-Espinosa. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada- IPN. Tlaxcala C.P. 90700, México. dcortes@ipn.mx

Palabras clave: Manganeso peroxidasa (MnP), Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus niger.

Introducción. El hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* ha servido como modelo para la degradación de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) debido a que cuenta con un sistema enzimático eficiente formado por lignina (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), las cuales son sintetizadas durante el metabolismo secundario en respuesta a una limitación de nutrientes.[1] Para la MnP se han reportado la existencia de cinco genes: *mnp1*, *mnp2*, *mnp3*, *mnp4* y *mnp5* que codifican para tres isoenzimas (H3, H4 y H5) capaces de catalizar la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} con ayuda del H_2O_2. La más estudiada ha sido la H4 (gen *mnp1*), por presentar las mayor actividad catalítica[2]. Por otro lado, se ha demostrado que *A. niger* es capaz de expresar y secretar elevadas cantidades de diferentes proteínas heterólogas, haciéndolo candidato perfecto para llevar a cabo una expresión heteróloga de una gran diversidad de genes[3]. En el presente trabajo, se realizó la expresión heteróloga del gen *mnp*1 de *P. chrysosporium* en la cepa de *A. niger* SBC2-T3 previamente aislada de bagacillo de caña con capacidad de crecer en suelos contaminados con PAHs, con el propósito de que ésta sea aplicada en estudios posteriores de biorremediación de suelos contaminados con este tipo de compuestos.

Metodología. Se llevó a cabo la construcción del plásmido pGMG-Hyg^{AVM} por PCR cloning, el cual fue insertado en una cepa de *A. niger* por biobalística[4], se seleccionaron las clonas (MnP^+) por resistencia a higromicina en el medio Czapeck. A las clonas seleccionadas se les realizó PCR para corroborar la integración del gen *mnp*1, también se determinó cualitativamente la actividad enzimática de MnP^+ en placa, usando el colorante *o*- anisidina al 0.02% para observar la formación de halos de decoloración por la MnP. Por último, a las clonas que presentaron los halos con mayor intensidad (color vino) se les cuantificó la actividad enzimática por espectrofotometría UV-Vis y la cuantificación de proteínas por el método de Bradford en cultivo líquido.

Resultados. Se construyó un plásmido de expresión para *A. niger* que contiene el cassette de expresión del gen *mnp*1 de *P. chrysosporium*, bajo el promotor constitutivo de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, terminador glucoamilasa de *A. awamori* y el gen de resistencia a higromicina para hongos (fig. 1).

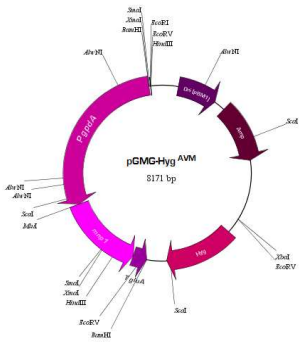

Fig. 1. Vector pGMG-Hyg^{AVM} para *A. niger* con el cassette de expresión *mnp*1 *de P. chrysosporium.*

Se seleccionaron 8 clonas, las cuales fueron analizadas por PCR para comprobar la integración del gen *mnp*1, se obtuvo como producto unas sola banda de 538 pb que corresponde al tamaño del gen *mnp*1 (Figura 2).

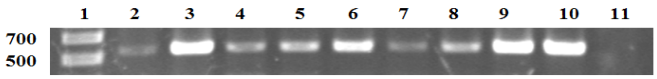

Fig. 2. Productos de PCR de las cepas transformantes de *A. niger* en un gel de agarosa al 0.8%. 1) Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 2-9) Clonas de *A. niger* seleccionadas. 10) *P. chrysosporium* como control positivo. 11) *A. niger* como control negativo.

Actualmente se está determinando la actividad enzimática en placa en forma cualitativa por la formación de halos de decoloración, las clonas de *A. niger* que presenten el halo con mayor intensidad se someterán a la cuantificación proteica y actividad enzimática en cultivo líquido.

Conclusiones. En este trabajo, se llevó a cabo exitosamente expresión heteróloga del gen *mnp*1 de *P. chrysosporium* en *A. niger*, la cual será evaluada en estudios posteriores para la biorremediación de suelos contaminados con PAHs.

Agradecimiento. Al fondo SEP-CONACyT Ciencia Básica, proyecto CB-2008-01-105643
Al IPN por el apoyo brindado al proyecto SIP 20110407.

Bibliografía.

1. Glenn J., Morgan M., Mayfield M., Kuwahara M., Gold, M. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 114:1077-1083.
2. Pease E., Tien, M. (1992). *J. Bacteriol*. 174:3532-3540.
3. Stewart P., Whitwam E., Kersten J., Cullen D., Tien M. (1996). *Microbiol. Biotechnol*. 62:860-864.
4. Barcellos G., Fungaro M., Furtlaneto C., Lejeune, B., Pizziranikleiner A., Azevedo J.1998. *J. Microbiol.* 44:1137-1141.