



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ESTUDIO DEL EFECTO DE COBRE Y LIGNINA EN LA PRODUCCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DE LACASAS POR *Pleurotus ostreatus*

Claudia Vianney Yañez Ñeco^a, Leobardo Serrano-Carreón^a, Clarita Olvera Carranza^a, Noemí Flores Mejía^a, Fernando Martínez Morales^b, Enrique Galindo^a,

^aDepartamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, México. Fax (52) (777) 313-8811. clausv@ibt.unam.mx

^bCentro de Investigación en Biotecnología Universidad Autónoma del Estado de Morelos, CP 6209, Cuernavaca, Morelos, México.

Palabras clave: lacasa, inducción, producción.

Introducción. Las lacasas (ρ -difeno: oxígeno óxido reductasas E.C: 1.10.3.2) son multicobre oxidasas que catalizan la oxidación de una gran variedad compuestos xenobióticos a través de la reducción del O_2 a H_2O . Los hongos ligninolíticos pueden producir diferentes isoenzimas de lacasa, las cuales pueden ser constitutivas o inducibles (1). La producción de estas enzimas se puede mejorar a través de la adición de compuestos fenólicos, iones metálicos, alcohol, entre otros (2). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la adición del $CuSO_4$ y/o la lignina en la producción de lacasa y en la expresión de los genes que codifican para las diferentes isoformas producidas por *P. ostreatus*.

Metodología. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de producción, incubados a 29°C y 150 rpm durante 144 h. Para estimular la síntesis de lacasa se adicionó el $CuSO_4$ (0.5 y 1 mM) y la lignina (0 y 5 g/L) a las 60h de cultivo en diferentes concentraciones. La evaluación de la influencia de estos factores se llevó a cabo mediante un diseño factorial 2^2 . Los cultivos se realizaron por triplicado y se cuantificó la biomasa (peso seco) y la actividad enzimática (oxidación de ABTS) relativa (respecto al control). Del micelio se hizo extracción de ARN total y transcripción reversa para obtener una biblioteca de ADNc. Para identificar las secuencias de lacasas que se expresan durante los cultivos se utilizaron oligonucleótidos degenerados basados en las secuencias consenso de lacasas para los sitios de unión a cobre. Se evaluaron los transcritos de los genes de lacasa a diferentes intervalos de tiempo y el gen de la β -tubulina como control interno para la cuantificación relativa mediante q-RT-PCR.

Resultados. En la figura 1 se muestra que la producción de lacasas aumenta – respecto a los cultivos control - hasta 7 veces al adicionar $CuSO_4$ (1 mM) y hasta 17 veces en cultivos suplementados con $CuSO_4$ (1 mM) y lignina (0.5 g/L). El ANOVA de los resultados a las 144 h de cultivo demostró que el $CuSO_4$, la lignina y la interacción entre ambos son significativos ($p > 0.001$) y tienen un efecto positivo sobre la actividad volumétrica relativa de lacasa. Se identificaron los genes *pox2*, *pox3*

y *pox3* de lacasa de *P. ostreatus*. El aumento de transcritos de los genes de lacasa después de la adición de los inductores, concuerda con el aumento de actividad volumétrica observado en los cultivos. El cobre tiene un fuerte efecto inductor incrementado diferencialmente el nivel de transcritos de lacasa, particularmente de *pox2*.

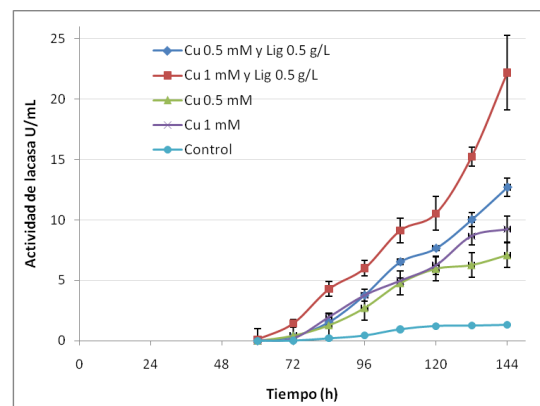


Fig. 1 Actividad volumétrica de lacasa (U/mL) en diferentes condiciones de inducción.

Conclusiones. La adición de diferentes concentraciones de cobre al medio de cultivo durante la fase de crecimiento (a las 60 h de cultivo) estimula significativamente la producción de enzima con respecto al control. La actividad volumétrica de lacasa incrementa significativamente con el uso combinado de cobre y lignina como inductores, observándose un efecto sinérgico positivo. Los resultados obtenidos indican que la regulación de la expresión de los genes de las diferentes isoformas de lacasa es a nivel transcripcional.

Agradecimiento. Este trabajo recibió financiamiento de la DGAPA-UNAM (IN217909 y IN210911) y el apoyo técnico de M.B. Raunel Tinoco Valencia.

Bibliografía

- Baldrian, P. (2006) Fungal Laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev* 30: 215–242.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., (2009) Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. *J. Biotechnol.* 144(1):37-42