

Expresión de la endoglucanasa CELB de *Cellulomonas flavigena* PR-22 en *Saccharomyces cerevisiae*

Diego Fernando García Chico, Ana C. Ramos Valdivia, Alfredo Martínez, María Teresa Ponce Noyola, Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, Ciudad de México, C.P. 07360, diegof.garcia@cinvestav.mx, tponce@cinvestav.mx.

Palabras clave: Endoglucanasa, Bioetanol, Biomasa lignocelulósica.

Introducción. El aumento en la población mundial representa una mayor demanda energética para satisfacer las necesidades de la vida diaria (1), por lo que el uso de energías con bajo impacto ecológico como los biocombustibles se ha vuelto una alternativa viable (2). La celulosa que se encuentra en la biomasa vegetal es una fuente importante de azúcares fermentables, y su degradación requiere la acción consecutiva de un complejo enzimático (3). Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura etanológica, no tiene la capacidad de degradar la celulosa por lo que los procesos independientes de sacarificación y fermentación resultan muy costosos.

La expresión de forma extracelular de la endoglucanasa CELB de *C. flavigena* PR-22 en *S. cerevisiae* le permitirá la sacarificación de residuos lignocelulósicos, esto con el objetivo de reducir los costos de producción de bioetanol de segunda generación.

Metodología. El gen *celB* optimizado, se amplificó del vector pRGP-*celB* OPT extraído por lisis alcalina de células de *E. coli* (4). Posteriormente se clonó en un vector de expresión constitutiva, para transformar *S. cerevisiae*. La inserción del gen al vector de expresión se evaluó por PCR.

Resultados. Las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pRGP-*celB* OPT se seleccionaron y se hicieron crecer en medio de selección. Se les extrajo el DNA por método de lisis alcalina, y se les realizó una amplificación utilizando los oligos D-*celB* y R-*celB*. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 1) observándose bandas únicas correspondientes al tamaño esperado del gen *celB* de aproximadamente 1737 pb.

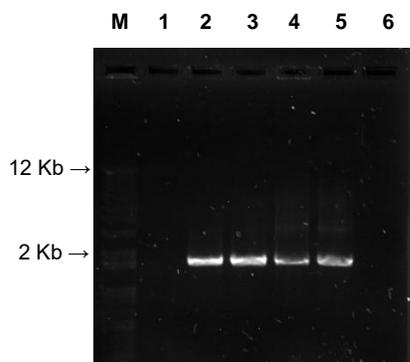


Fig. 2.- Electroforesis del producto de PCR de *celB* OPT, (1, 6) Vacío, (M) Marcador de tamaño molecular, (2,5) Producto de PCR de *celB* OPT

Se estandarizaron las amplificaciones de los marcos de lectura a utilizar (TEF1, *celB*, CYC1, pSAL4) utilizando los oligos correspondientes, de los cuales los oligos en sentido directo cuentan con homología con el marco de lectura del fragmento que les precede para permitir una recombinación homóloga.

Para la generación del vector de expresión de la proteína CELB (Figura 2) se utilizaron los productos de amplificación generados. Se realizó la amplificación del gen junto con una secuencia parcial de la subunidad alfa de la toxina asesina de *Kluyveromyces lactis* para la exportación de proteínas. La construcción de los vectores se realizó por medio del mecanismo de recombinación homóloga llevado a cabo por el método de transformación de DNA acarreador (ssDNA, dsDNA) y acetato

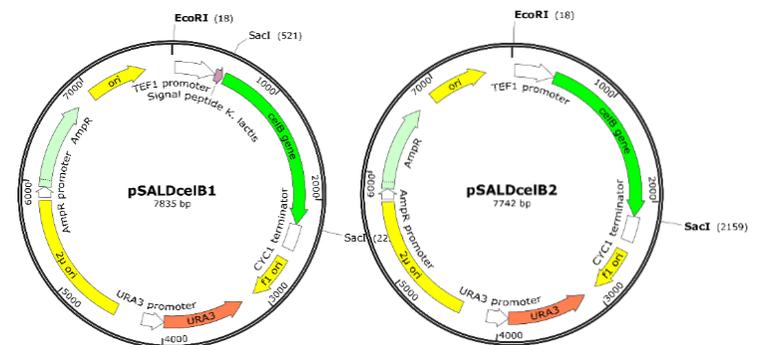


Fig. 1.- Vectores de expresión diseñados. Izq: Vector pSALD*celB*1 con secuencia de exportación de proteínas. Der: Vector pSALD*celB*1 sin la secuencia de exportación de proteínas

de litio en la cepa de *S. cerevisiae* W303-1A.

Conclusiones. Se logró la construcción de los vectores pSALD*celB*1 y pSALD*celB*2 con los cuales se transformó *S. cerevisiae* W3031A con DNA acarreador de cadena sencilla y de doble cadena. Se logró la transformación de *E. coli* electrocompetentes y se confirmó la presencia del gen en las células transformadas de *E. coli* por medio de la digestión con EcoRI y SacI.

Agradecimientos. El desarrollo de este proyecto tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de financiamiento del proyecto CB-14/236895.

Bibliografía.

Demirbas, A. (2009) *Appl Energy* 86:S108-S117. Sun, Y., Cheng, J. (2002) *Bioresour Technol* (83)1-11. Den, et al. (2006) *Metab Eng* 9(1) 87-94. Ríos-Fránquez, F. (2017) *Arch Microbiol* 199 (4), 605-611.