

CONSTRUCCIÓN DE BANCOS METAGENÓMICOS Y SU ANÁLISIS ENFOCADO A LA BÚSQUEDA DE GENES DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.

Karina Peña¹, Noemí Sirena¹, Aldo Barrientos¹, Guillermo Gosset¹, Francisco Bolívar¹ y Adelfo Escalante^{1*}.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos. 62210.

*adelfo@ibt.unam.mx

Palabras clave: bancos metagenómicos, suelo, pulque.

Introducción. La metagenómica es una disciplina que ha permitido acceder al potencial genómico de muestras ambientales sin la necesidad de cultivar a los microorganismos presentes. Los resultados del análisis de metagenomas de diversos ambientes han permitido identificar la presencia de una gran cantidad de nuevos linajes bacterianos y de genes que codifican para nuevas actividades enzimáticas de interés biotecnológico (1). La complementación de cepas bacterianas con inactivaciones en genes específicos del metabolismo central de carbono (MCC), y la vía de síntesis de metabolitos aromáticos utilizando bancos metagenómicos de suelos o ambientes naturalmente enriquecidos, han permitido la posibilidad de identificar genes que pudieran incrementar las capacidades metabólicas de cepas productoras de metabolitos de interés biotecnológico.

En este trabajo se describe la creación de dos bancos metagenómicos y su uso para complementar inactivaciones de genes del sistema de transporte de carbohidratos PTS:glucosa y de la enzima DAHP sintasa, responsable de la síntesis del primer precursor de la vía común de metabolitos aromáticos en cepas de *Escherichia coli*.

Metodología. Se realizó la extracción del DNA metagenómico de una muestra de suelo forestal de una zona de la reserva ecológica del Chichinautzin, Cuernavaca, Mor. México y de una muestra de pulque (Huitzilac, Mor.), por técnicas de extracción directas. El DNA se fragmentó parcialmente con la enzima *Sma*I y se ligó al plásmido pJET1.2. La ligación se utilizó para transformar a la cepa de *E. coli* TOP10, a partir de la cual se obtuvo una preparación stock del banco metagenómico que se utilizó para transformar a la cepas de *E. coli* PB11 PTS⁻glc⁻ y AB3248 DAHPS⁻.

Resultados y discusión. Se construyeron dos bancos metagenómicos con un tamaño de inserto promedio de 5 Kb partir de una muestra de suelo y de pulque. El banco del suelo esta conformado por 87 552 UFC totales con un tamaño de 0.43 Gb. El banco de pulque, esta conformado a su vez por 23 424 UFC totales con un tamaño de 0.11 Gb. El banco metagenómico del suelo fue utilizado para complementar la función de la DAHPS y restaurar la vía de síntesis común de compuestos

aromáticos (Figura 1), en la cepa de *E. coli* AB3248, detectándose 3 clones capaces de crecer en el medio de selección mineral M9. Por otro lado, la transformación de la cepa *E. coli* PTS⁻glc⁻ PB11 con el banco metagenómico del pulque, permitió identificar clones que restauraron el crecimiento rápido de esta cepa en glucosa. La secuenciación del inserto metagenómico de esta última clona indicó que se trata de un gen que codifica para una proteína hipotética conservada teniendo como microorganismos de referencia a una Beta-Proteobacteria no-cultivable o *Megnetospirillum gryphi*.

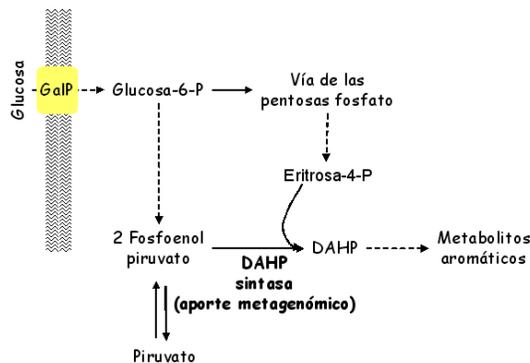


Fig. 1. Complementación de la enzima DAHP sintasa con el banco metagenómico del suelo permitiendo la restauración del flujo de carbono del MCC a la vía de síntesis de compuestos aromáticos.

Conclusiones. El uso de bancos metagenómicos ambientales permitió la detección de genes involucrados en el transporte de glucosa y síntesis de DAHP por complementación funcional del metabolismo central de carbono y vía de síntesis de aromáticos en cepas de *E. coli*.

Agradecimientos. Se contó con financiamiento de los proyectos CONACYT P46052-2 y PAPIIT-UNAM IN224709.

Bibliografía.

1. Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Rev.* 68:669-685.