



AISLAMIENTO DE PROTEASAS MEDIANTE UNA BÚSQUEDA METAGENÓMICA FUNCIONAL EN UN PUNTO DEL ACUÍFERO DE YUCATÁN

Max Mizraím Apolinar-Hernández¹, Yuri Jorge J. Peña-Ramírez², César de los Santos-Briones¹,
Aileen O'Connor-Sánchez¹.

¹Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 133, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. ²El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) Unidad Campeche. Avenida Rancho Polígono 2A. Ciudad Industrial Lerma. Campeche, Campeche. México. Correo electrónico: aileen@cicy.mx

Palabras clave: Pirosecuenciación, microorganismos, enzimas..

Introducción. Las proteasas están involucradas en la hidrólisis de enlaces peptídicos. Tienen una amplia gama de usos en la industria alimenticia, farmacéutica, del cuero y textiles, detergentes, diagnóstico y en el tratamiento de aguas residuales. En relación con otras enzimas, las proteasas representan el 40% de las ventas en la industria mundial (1). Aunque se les puede obtener de plantas y animales, las proteasas microbianas constituyen dos terceras partes de las proteasas comercializadas. Varias proteasas microbianas han sido caracterizadas de microorganismos cultivables, sin embargo, muy pocas se han obtenido por aprovechamiento metagenómico. La metagenómica consiste en el estudio del ADN de comunidades de microorganismos de muestras tomadas directamente del ambiente sin una fase de cultivo (2), utilizando esta herramienta se han identificado genes novedosos que codifican biomoléculas que han tenido utilidad en la industria. Existe evidencia de que en el acuífero de la península de Yucatán existen ecosistemas únicos relativamente prístinos, además la composición y conformación del suelo, aunado a la rica diversidad biológica de la región en general hacen de este ambiente atractivo para el análisis metagenómico y la búsqueda de nuevas proteasas (3).

El objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar genes que codifiquen enzimas con actividad de proteasa a partir de una biblioteca metagenómica proveniente del acuífero de Yucatán.

Metodología. Partiendo de una muestra de agua del acuífero de Yucatán, por medio de filtración serial, se colectó la biomasa procarionta a la cual se le extrajo el ADN metagenómico. Con este se construyó una biblioteca metagenómica, la cual fue funcionalmente analizada en medio LB suplementado con cloranfenicol como agente de selección y 1% (p/v) leche descremada para determinar la actividad proteasa. Las clonas que presentaron actividad proteasa se enviaron a secuenciar. Las secuencias fueron analizadas con herramientas bioinformáticas y se buscaron genes relacionados con proteasas. Las secuencias encontradas se clonaron en el vector de expresión pLATE52 (Thermo Scientific) y se realizará la medición del pH y temperatura óptima de la enzima.

Resultados. Se construyó y analizó una biblioteca metagenómica de 21, 000 clones, con insertos de ~35 Kb, la cual después de ser analizada se obtuvieron 23 clones

como productores de proteasas, este número es muy similar al reportado por Neveu *et al.*, 2011 quien construyó una biblioteca de fósmidos, a partir de arena del desierto, y de 17, 000 clones obtuvo 16 clonas productoras de proteasas. Hasta ahora se ha realizado el análisis bioinformático de una de las 23 clonas, nombrada MAJ-10, la cual tiene un inserto de 41.6 Kb en el cual se lograron predecir 50 genes de los cuales dos corresponden a proteasas, nombrados PR-5 y PR-8, una tiene un ORF de 1905 y 1956 pb respectivamente. Dichas secuencias fueron subclonadas fusionando a colas de His y los genes fueron expresados en E coli mostrando actividad de proteasa en ensayos funcionales. Actualmente estamos purificando la enzima presente en el sobrenadante

Conclusión. La biblioteca metagenómica construida es de buena calidad. El método para la identificación de proteasas sobre el cual se realizó el escrutinio para la detección de proteasas es el adecuado. Con lo obtenido podemos concluir parcialmente que el acuífero de Yucatán es una buena fuente para la búsqueda de nuevas biomoléculas.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca otorgada. Al proyecto FOMIX 165026.

Bibliografía

1. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:597-635
2. Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol.* 68(4): 669-685.
3. Rojas-Herrera R, Zamudio-Maya M, Arena-Ortiz L, RC Pless3, O'Connor-Sánchez A (2011). Microbial diversity, metagenomics and the Yucatán aquifer. *FYTON*. 80: 231-240.