CARACTERIZACION DE UN GEN QUE CODIFICA PARA UNA β-GLUCOSIDASA DE *Cellulomonas flavigena.*

[a] Gerardo Reséndiz Cardiel, [a]Ana C. Ramos Valdivia, [b]Luis M. Salgado, [a]Fernando Esparza García, [a]Ma. Teresa Ponce Noyola, [a]Dpto. Biotecnología y Bioingeniería y [b]Dpto. Bioquímica. CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional #2508 Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07000. México, D.F. Tel. 5061 3800 ext. 4318
gerardo_resendiz_80@hotmail.com

Palabras clave: β-glucosidasa, Cellulomonas flavigena PN-120.

Introducción. *Cellulomonas flavigena* requiere de la acción concertada de varias enzimas para la degradación total de la celulosa. En la primera etapa, el polisacárido es degradado por la acción sinérgica de endoglucanasas y exoglucanasas. El principal producto de la acción de estas enzimas es celobiosa, la cual es posteriormente degradada a glucosa por acción de la β-glucosidasa. La producción de celulasas está sujeta a represión e inhibición por producto final (1). En este contexto, la deficiencia en la producción de β-glucosidasa disminuye la velocidad de sacarificación del material celulósico (2), por lo cual la actividad de esta última enzima es un factor limitante en el proceso de hidrólisis enzimática. La mutante PN-120 de *C. flavigena* produce una β-glucosidasa que es 10 veces más activa que su homóloga de la cepa silvestre. Los zimogramas indican que la actividad enzimática sobre 4-metilumbeliferil-β-D-glucósido (MUG) reside en una sola banda de proteína de geles nativos de PAGE. Sin embargo, en electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) la banda anterior se comporta como una proteína oligomérica con tres subunidades y con una masa molecular aparente de 220 KDa (3). El objetivo de este trabajo es clonar y caracterizar al gen que codifica para la β-glucosidasa de la cepa silvestre y compararlo con su homologo de la cepa mutante.

Metodología. Se utilizó la clona 2 obtenida por Barrera (2005) (4) a partir del tamizaje de la genoteca de *C. flavigena*. Se obtuvo el DNA de la clona y se digirió con la enzima Not I (NEB). Los fragmentos liberados por la enzima fueron purificados y clonados en el vector de clonación pBluescript. Después, ambas clonas fueron digeridas con las enzimas Not I, Sac I, Xho I y Pst I, para llevar a cabo un Southern Blot con un fragmento de 500 pb que presentó alineamiento con las glicosilhidrolasas de la familia 3 de bacterias celulolíticas, previamente obtenido (4). Los fragmentos que hibridaron con la sonda se subclonaron y secuenciaron. Con la secuencia completa del gen silvestre se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen equivalente de la cepa mutante.

Resultados y discusión.
A partir de la digestión del DNA de la clona 2 se liberaron dos fragmentos, de 8 y 10 Kb. Estos fragmentos fueron purificados y clonados en el vector pBluescript. Las clonas obtenidas se llamaron clona C2(2)Not 8 y C2(2) Not 10 respectivamente. Únicamente la clona C2(2) Not 8 mostró una señal positiva para cada digestión (Fig. 1). Sin embargo, el patrón de digestión con cada enzima para esta clona mostró bandas adicionales a los fragmentos que mostraron señal positiva. Por esta razón, además de los fragmentos que mostraron señal positiva, las bandas adicionales también fueron cortadas del gel y posteriormente purificadas. Finalmente, todas las bandas purificadas fueron subclonadas en el vector pBluescript para su posterior secuenciación y análisis con la ayuda de las herramientas de bioinformática. Teniendo la secuencia completa del gen se diseñarán oligonucleótidos para amplificar el gen de la cepa mutante y se realizará la comparación de ambas secuencias.

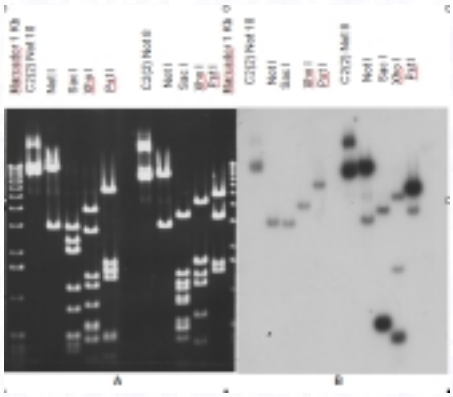

Fig. 1. A) Patrón de digestión del DNA de C2(2) Not 10 y C2(2)Not 8; B) Southern blot de las digestiones del DNA de C2(2)Not 10 y C2(2)Not 8.

Conclusiones. El análisis de la secuencia del fragmento de 500 pb del gen de la β- glucosidasa de la cepa nativa de *C. flavigena* indica que la enzima purificada y caracterizada previamente corresponde a una glicosilhidrolasa de la familia 3 de bacterias celulolíticas

Agradecimiento. Al CONACYT (45678-Z) por el apoyo recibido para la realización de este proyecto.

Bibliografía.
1. Ponce-Noyola T., de la Torre M. (1995) Isolation of a high specific-grow-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl Microbiol Biotechnol*; 42:709-712
2. Woodward J., Wiseman A. (1982) Fungal and other β-D-glucosidases, their properties and applications. *Enzyme Microb. Techno*l. 4: 73-79
3. Barrera-Islas A., A. Ramos-Valdivia, L. Salgado, T. Ponce Noyola (2007) Purification of a beta-glucosidase from mutant PN-120 of C*ellulomonas flavigena Current Microbiol (en prensa*)
4. Barrera I.G.A. (2005) Cambios en los parámetros cinéticos de la β-glucosidasa de *Cellulomonas flavigena* PN-120 y caracterización molecular de la enzima silvestre. Tesis CINVESTAV.