

OBTENCION DE GENES QUE CODIFICAN PARA PIRUVATO DESCARBOXILASAS A PARTIR DEL METAGENOMA DEL PULQUE.

Ma. Elena Rodríguez, Enrique Merino, Alfredo Martínez y Agustín López-Munguía.
Depto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM
Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210. México. Fax (777)3114903.
maelena@ibt.unam.mx.

Palabras clave: *piruvato descaboxilasa, metagenoma, etanol*

Introducción. El diseño de bacterias recombinantes etanologénicas capaces de fermentar eficientemente una amplia variedad de azúcares, se basa en las propiedades catalíticas de las dos enzimas que dirigen el flujo de carbono de piruvato a etanol (2): la piruvato descarboxilasa (PDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH). Es muy probable que en los consorcios microbianos presentes en bebidas fermentadas alcohólicas tradicionales existan microorganismos, hasta la fecha desconocidos, con PDCs y ADHs diferentes a las conocidas. Por otro lado, se sabe que existen pocas PDCs bacterianas y que esta es la enzima clave para dirigir eficientemente el flujo de piruvato a etanol (1). El objetivo de este trabajo fue obtener genes, a partir del metagenoma del pulque, que codifiquen para PDC's nuevas con propiedades catalíticas aplicables en la producción de etanol.

Metodología. El ADN multigenómico de la fracción bacteriana del pulque se purificó por un método adaptado para bebidas fermentadas (3). Utilizando como templado este ADN y oligonucleótidos específicos, diseñados a partir del gen *pdc* de *Z. mobilis*, se amplificaron por PCR fragmentos que potencialmente codifican para PDC. Para clonar los fragmentos obtenidos, se diseñó y construyó un cassette que permite seleccionar PDC funcionales. Los insertos con PDC putativas se seleccionaron por el tamaño de colonia en medio sólido con glucosa (2) y la producción de etanol se evaluó en medio rico-glucosa con transformantes de *E. coli* DH5?.

Resultados y discusión. Con los oligonucleótidos diseñados, se amplificaron por PCR fragmentos de 1019 pb que corresponden a la parte central del gen de *pdc* de *Z. mobilis*. El vector diseñado para clonar los productos de PCR contiene los extremos amino y carboxilo terminales del gen de *pdc* de *Z. mobilis*, de manera que es posible completar el gen y obtener enzimas activas. En el extremo carboxilo terminal del gen PDC se fusionó el gen que codifica para la alcohol deshidrogenasa II (ADHII) de *Z. mobilis*. (fig 1). Así, al clonarse los productos de PCR, aquellos que son funcionales le permiten a la célula producir etanol. Empleando esta estrategia se han obtenido al menos 40 clonas, cuyos patrones de restricción coinciden con el esperado.

Se determinó la capacidad de producción de etanol a 15 clonas. El rendimiento de conversión de glucosa en etanol respecto al teórico máximo, en las clonas fue de 70 a 82% en 6, de 45 a 65% en 3 y de 7-16% en 6. Evaluados bajo las mismas condiciones, el rendimiento del control positivo (cassete con el fragmento de 1019 pb de *pdc* de *Z. mobilis*)

fue de 74% y del control negativo (cassete sin inserto) fue 7%. Estos resultados indican que los fragmentos seleccionados completan *pdc* putativas. Los rendimientos obtenidos sugieren que las propiedades catalíticas de algunas de las enzimas bacterianas obtenidas son diferentes a las de *Z. mobilis*. A futuro se evaluará la actividad enzimática, para posteriormente secuenciar los genes, seleccionar las PDC diferentes, purificarlas y caracterizarlas cinéticamente.

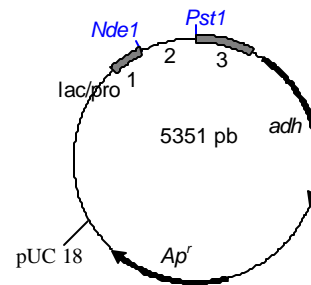


Fig. 1. Cassete para clonar fragmentos de *pdc* y seleccionar PDC's funcionales. 1) Extremo amino terminal de *pdc*. 2) Fragmento intercambiable. 3) Extremo carboxilo terminal de *pdc*.

Conclusiones. La estrategia propuesta para obtener genes quiméricos de consorcios microbianos presentes en productos autóctonos, como el pulque, es factible. Se obtuvieron *pdc* putativas a partir del metagenoma bacteriano del pulque

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por CONACyT proyecto Z-003. Agradecemos a la Dra. Clarita Olvera sus acertadas sugerencias y a la TLC Aurelia Ocampo su apoyo técnico.

Bibliografía.

- 1 Conway, T., Osman, J.I., Konnan, J.I., Hoffmann, E.M. y Ingram, L.O. (1987). Promoter and Nucleotide Sequences of the *Zymomonas mobilis* Pyruvate Decarboxylase. *J. Bacteriol.* 169 (3): 949-9542..
2. Ingram, L. O., Conway, T., Clark, D.P., Sewel, G.W. y Preston J.F. (1987). Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (10): 2420-2425.
3. Escalante, A. (2001). Determinación de la diversidad de bacterias lácticas del pozol por análisis de secuencias de ARNr 16s. Tesis de Doctorado. Facultad de Química – UNAM.