

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA LA ENZIMA ALCOHOL DESHIDROGENASA A PARTIR DE LA MICROBIOTA DEL PULQUE.

Georgina Estrada, Ma.Elena Rodríguez, Enrique Merino, Alfredo Martínez y Agustín López-Munguía
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001,
Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México. Fax: (777) 3172388. E- mail: ginae@ibt.unam.mx.

Palabras clave: alcohol deshidrogenasa, *Zymomonas mobilis*, etanol.

Introducción. La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) es una de las dos enzimas que permiten el flujo de carbono de PIRUVATO a ETANOL en los microorganismos etanológicos. Es muy probable que en los consorcios presentes en productos como el pulque existan microorganismos hasta la fecha no estudiados con ADHs tanto o más eficientes que las conocidas. El creciente interés en la producción de etanol a gran escala y por ende en las enzimas que lo permiten, se debe a la posibilidad de usarlo como combustible automotor alternativo a la gasolina y así aplicar una tecnología sustentable basada en la conversión de biomasa en etanol, disminuyendo el uso de combustibles fósiles.

En este trabajo, se propone aislar ADN multigenómico del pulque, para obtener genes que codifiquen para nuevas ADHs con propiedades catalíticas aplicables en la producción de etanol a gran escala a partir de hidrolizados de hemicelulosa.

Metodología. Usando como template ADN de la fracción bacteriana del pulque y con oligonucleótidos específicos del gen *adhB* de *Z. mobilis*, diseñados con base en secuencias consenso, se amplificaron por PCR fragmentos internos (549pb) del gen. Se diseñó y construyó un vector con los extremos del gen *adhB* de *Z. mobilis* para clonar los fragmentos amplificados y completar el gen obteniendo ADHs funcionales. Una vez clonados los fragmentos, se transformó *Escherichia coli*. Para identificar las colonias con actividad ADH se usó una técnica colorida para deshidrogenasas, con nitroblue tetrazolium, la cual se adaptó para ADH. La actividad se midió para oxidación de etanol cuantificando la formación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ a 340nm y 30° C de acuerdo al método reportado por Neale et al. (2). La proteína se midió por el método de Bradford. Para la purificación de las ADHs se siguió la metodología reportada por Cabisco et al. (3). Los parámetros cinéticos fueron medidos por los métodos clásicos para enzimas Michaelianas.

Resultados y discusión. Se obtuvieron un total de 15 clonas positivas en el método de screening. Se analizaron 3 de estas tanto por secuenciación del fragmento de 549pb, como por actividad enzimática (tabla 1). Por secuenciación se identificó un fragmento que difiere en 8% en cuanto a secuencia proteica con respecto a la ADH de *Z. mobilis* en la clona PQ1. Las secuencias del fragmento del resto de las

clonas (de las 14), corresponden exactamente al gen *adhB* de *Z. mobilis*.

Clona	Actividad específica (U/mg)
Control	0.83
PQ1	0.89
PQ2	0.76
PQ3	0.73

Tabla 1. Actividad de las diferentes clonas analizadas. El control es el vector con el fragmento del gen *adhB* de *Z. mobilis*.

En la construcción control, así como en PQ1 hay una pérdida de actividad de aproximadamente 1/3 parte con respecto a la actividad medida para la construcción de la cual partimos (pLOI284). Se logró la purificación tanto de la enzima de *Z. mobilis*, como de la PQ1, para comparar las propiedades cinéticas de ambas enzimas.

Conclusiones. Se desarrolló con éxito una estrategia para explorar la biodiversidad que se encuentra en microambientes como son las bebidas alcohólicas fermentadas. Se obtuvo una enzima diferente a la ADH II de *Z. mobilis* con actividad comparable, así como con propiedades cinéticas semejantes. Dicha enzima proviene de un gen híbrido con un fragmento-producto de PCR obtenido a partir del ADN multigenómico del pulque. La secuencia obtenida para el fragmento no está reportada, por lo que se trata de una enzima nueva la cual podría formar parte de una tecnología propia para la producción de etanol a gran escala.

Agradecimiento. Este proyecto fue financiado por CONACyT proyecto Z-003. DGEP.

Bibliografía.

- Conway T., Sewell G.W., Osman Y.A. and Ingram L.O. (1987). Cloning and Sequencing of the Alcohol Dehydrogenase II Gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bac.* 169(6):2591-2597.
- Neale, A.D., Scopes R.K., Kelly J.M., Wettenhall R.E.H. (1986). The Two Alcohol Dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*: Purification by Differential Dye Ligand Chromatography, Molecular Characterization and Physiological Roles. *Eur. J. Biochem.* 154:119-124.
- Cabisco E., Aguilar J., Ros J. (1993). Metal-catalyzed Oxidation of Fe^{2+} Dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 269(9):6592-6597.