



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ESTUDIOS MOLECULARES DEL GEN β -MAN QUE CODIFICA PARA LA β -MANOSIDASA DE *Cellulomonas uda*

Christian Mariana Ortega-Licona, Jesús Alarcón-Bonilla, Patricia Pavón-Orozco, Alejandro Santiago-Hernández María Eugenia Hidalgo-Lara. Depto. De Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. México, D.F. C.P. 07360. Tel. 5747-3800 ext. 4360. e-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: *Cellulomonas uda*, β -manosidasa, genome walking.

INTRODUCCIÓN: Las mananas, uno de los componentes principales de la hemicelulosa, son polímeros de manosa con ramificaciones de manosa y glucosa β -1,4 ó monómeros de galactosa unidos a residuos de manosa por enlaces α -1,6. La completa hidrólisis de las mananas a galactosa, glucosa y manosa requiere de la actividad de tres enzimas: endomananasas (EC: 2.2.1.78), β -manosidasas (EC: 3.2.1.25) y α -galactosidasa (EC: 3.2.1.22) (1). La β -manosidasa es ampliamente utilizada para la producción de biocombustibles y en procesos de bioblanqueos. *Cellulomonas uda* se caracteriza por ser productor potencial de celulasas y hemicelulasas; sin embargo no hay estudios sobre β -manosidasa en este microorganismo. El objetivo de este trabajo es completar la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la β -manosidasa de *C. uda*. Actualmente se cuenta con un 85% de la secuencia de nucleótidos del gen codificante para la β -manosidasa de *C. uda*.

Metodología. Mediante PCR se obtuvo un fragmento de ADN de 1.5 kb conteniendo la secuencia parcial del gen de la β -manosidasa de *C. uda*. Se diseñaron oligonucleótidos de regiones conservadas para determinar la secuencia nucleotídica de los extremos restantes 5' y 3' del gen β -man. Se construyó una librería genómica, para lo cual el ADN genómico de *C. uda* fue digerido con Pvu II y se realizó la técnica de Genome Walking (Clontech).

Resultados: Se obtuvieron 2 fragmentos de 750 pb y 1800 pb de los extremos 5' y 3' del gen de la β -manosidasa, respectivamente. Estos fragmentos fueron purificados y clonados en pDrive para su posterior secuenciación. De la secuencia obtenida a partir del extremo 5' fue completada la secuencia nucleotídica del gen de la β -manosidasa, esta secuencia tiene los siguientes porcentajes de identidad con: *Cellulomonas fimi* 80 %, *Beutenbergia cavernae* 78%, *Sanguibacter keddiei* 76%, *Streptomyces sp.* 76%. También fue obtenida la secuencia parcial de una proteína de transporte de azúcares del tipo ABC río arriba del gen de nuestro interés.

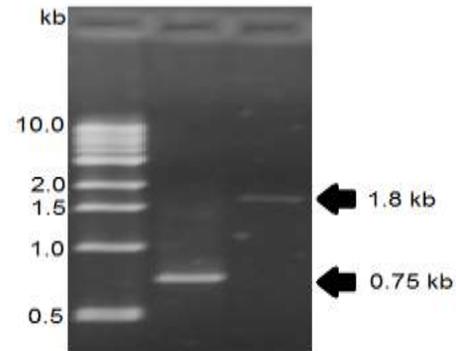


Fig. 1. Productos obtenidos por "Genome Walking". Carril 1: marcador de tamaño molecular, carril 2: fragmento de 750 pb del extremo 5' del gen β man, carril 3: fragmento de 1.8 kb del extremo 3' del gen β man.

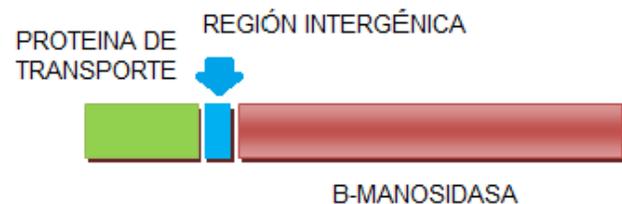


Fig. 2 Región verde: secuencia parcial de un gen que codifica a una proteína de transporte, Región azul: región intergenica, Región roja: secuencia parcial del gen de la β -manosidasa.

Conclusiones: De acuerdo a la secuencia obtenida hasta el momento se tiene un 94% del gen de la β -manosidasa comparado con su homólogo en *C. fimi*. Con respecto al gen que codifica para una proteína de transporte se obtuvo aproximadamente un 38 % de la secuencia comparada con su homólogo en *Paenibacillus polymyxa*.

Agradecimiento. Al CINVESTAV por el financiamiento de esta investigación y a la beca otorgada a CMOL por el CONACYT para estudios de maestría.

Bibliografía:

1. Stoll D., Stalbrand H., Warren A., (1999), Appl. Environ. Microbiol. 65 (6) 2598-2605