

## ESTUDIO TEORICO Y CLONACION DE LA $\beta$ -GLUCOSIDASA DE *Bacillus siamensis* JJC33M

Wendy Panamá Raymundo<sup>1</sup>, Sarahi del Carmen Hernández Heredia, Emmanuel Delfin Cruz, Blanca Estela Barrera Figueroa<sup>1</sup>, Cirilo Nolasco Hipólito<sup>1</sup>, Sandra Trinidad del Moral Ventura<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. Circuito Central 200. Col. Parque Industrial. Tuxtepec, Oaxaca, México CP 68300

<sup>2</sup>Investigador de México-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Instituto Tecnológico de Veracruz/Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Miguel Ángel de Quevedo 2779. Veracruz, Veracruz, México CP 91897 (sandit.dmv@gmail.com, sandra.dv@veracruz.tecnm.mx).

*Palabras clave: Bacillus siamensis, celulasas,  $\beta$ -glucosidasas*

**Introducción.** Las  $\beta$ -glucosidasas son celulasas que hidrolizan el enlace  $\beta$ -(1-4) de la celulosa para formar compuestos de menor peso molecular como celobiosa y glucosa. Son empleadas en la industria alimentaria para potenciar el sabor de jugos, vinos y tes; en la industria farmacéutica y en la producción de biocombustibles para la generación de glucosa a partir de oligosacáridos y celobiosa, siendo esta reacción la más importante en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica. Las  $\beta$ -glucosidasas son producidas principalmente por bacterias del género *Bacillus*. *Bacillus siamensis* JJC33M fue aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la Cuenca del Papaloapan, presenta actividad  $\beta$ -glucosidasa y la secuencia de su genoma indica el gen que la codifica, BglJ33<sup>(1)</sup>. El objetivo de este trabajo fue analizar el gen *bglJ33*, clonarlo y expresarlo recombinantemente en *Escherichia coli*.

**Metodología.** Se analizaron las características *in silico* del gen *bglJ33* en BLAST, SMART. Se aisló el ADN genómico de *B. siamensis* JJC33M que sirvió como molde para la amplificación por PCR del gen *bglJ33* que se clonó en el sistema pET101/D-TOPO. Por otro lado, se envió a sintetizar en pET22a y optimizar el uso de codones del gen *bglJ33* para su expresión en *E. coli*. Para la expresión de BglJ33 se emplearon distintas concentraciones de IPTG (0.1, 0.5 y 0.9 mM) realizando una cinética a 37°C por 7 h. La actividad celulasa se detectó en cajas Petri con CMC 1% (p/v). La expresión de proteínas se observó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 10% teñidos con Coomassie.

**Resultados.** El gen *bglJ33* tiene 1401 pb que codifica para una proteína de 466 aminoácidos, cuyo peso molecular y pl teórico es 53.2 kDa y 5.41, respectivamente. Presenta un péptido señal de 21 aminoácidos, y un dominio catalítico con plegamiento

tipo TIM Barrel ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, con lo que se clasifica dentro de las glicosil hidrolasas de la familia 1 (GH1). Las GH1 mantienen un mecanismo de retención de la configuración en la hidrólisis del sustrato. El gen *bglJ33* se clonó completo en el vector pET101/D-TOPO y se transformó en *E. coli* TOP10, las clonas se analizaron por patrón de restricción con las enzimas XhoI y NdeI, además se enviaron a secuenciar, encontrándose que el gen se clonó correctamente, además de observarse la región de unión a ribosoma y el marco de lectura abierto, así como la terminación del gen. Posteriormente las clonas se transformaron en *E. coli* BL21 para su expresión, donde no se observó actividad celulasa empleando CMC como sustrato. Con dichos resultados se optó por optimizar el uso de codones en *E. coli*. El gen *bglJ33* se sintetizó y clonó en pET22a, induciendo con 0.5 y 1mM de IPTG a 37°C, sin embargo, no se observó actividad usando como sustrato CMC. El análisis de la expresión en geles SDS-PAGE usando el sobrenadante de la lisis celular mostró una banda de 50 kDa, lo cual indica que la BglJ33 sí se expresa, sin embargo no presenta actividad.

**Conclusiones.** El gen *bglJ33* fue posible expresarlo en *E. coli*, sin embargo, la enzima codificante no mostró actividad, sugiriendo un plegamiento anómalo. Es posible que la enzima requiera elementos externos para su replegamiento correcto.

**Agradecimientos.** Al COVEICYDET por el proyecto 11111304.

### Bibliografía.

(1) Montor-Antonio JJ, Sachman-Ruiz B, Lozano L, del Moral S. 2015. Draft genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, isolated from sugarcane soils in the Papaloapan region, Mexico. Genome Announc 3(1):e01519-14. doi:10.1128/genomeA.01519-14.