

Diseño experimental para la obtención de un gen de β -glucosidasa de una cepa de la levadura *Issatchenkia terricola*

Stefani de Ovalle¹, Paula González-Pombo¹, Beatriz Brena¹, Andrea Villarino² y Ana Ramón²

1-Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 2- Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

stefani@fq.eduuy

El uso de β -glucosidasas en la industria del vino es potencialmente interesante por incrementar aromas mediante la liberación de volátiles a partir de precursores glicosídicos (no odorantes), presentes en mostos, jugos de frutas y vinos jóvenes [1]. En trabajos previos de nuestro grupo se estudió una enzima β -glucosidasa de una cepa nativa de *Issatchenkia terricola* (aislada de uva tannat) la cual presenta propiedades muy promisorias en cuanto a actividad y estabilidad en condiciones enológicas. Mediante tratamiento de vinos blancos y tintos jóvenes con la enzima inmovilizada, se observó incremento significativo de algunas notas aromáticas [2]. Desafortunadamente, los bajos niveles de producción de la enzima impiden la posibilidad de su aplicación enológica. Esta limitante se abordó mediante la optimización de las condiciones de cultivo y el escalado del proceso, pero no se lograron obtener cantidades significativas de enzima [3]. El objetivo de este trabajo es diseñar experimentalmente una estrategia que permita obtener un gen β -glucosidasa de *Issatchenkia terricola*, mediante el uso de oligos degenerados, optimizando la producción de la enzima de interés mediante clonado y expresión. A partir de resultados de espectrometría de masas (MALDI-TOF) de la enzima purificada, se encontraron dos péptidos coincidentes con algunas β -glucosidasas reportadas en la base de datos NCBI. Las secuencias peptídicas de dichas enzimas fueron alineadas, incluyendo la de β -glucosidasa de *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*), el organismo filogenéticamente más emparentado con *Issatchenkia terricola* disponible en la base de datos. Se construyó un árbol filogenético descartándose aquellas secuencias de β -glucosidasas cuyas distancias filogenéticas con *P. kudriavzevii* eran muy grandes. Las secuencias filogenéticamente más cercanas fueron dos β -glucosidasas de *Candida glabrata*. Se realizó un alineamiento de estas secuencias, incluida la de *P. kudriavzevii* y se diseñaron oligos degenerados a partir de las regiones conservadas. A continuación, se optimizaron las condiciones de PCR y los productos obtenidos se purificaron, clonaron y enviaron a secuenciar. Las secuencias de los productos de PCR serán analizadas mediante la herramienta BLASTx, esperando encontrar coincidencias con β -glucosidasas reportadas en la base de datos.

[1] Winterhalter, P.; Skouroumounis, G.K. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 1997, 55, 73-105; [2] González-Pombo, P.; Fariña, L.; Carrau, F. et al. *Process Biochem.* 2011, 46 (1), 385-389.; [3] de Ovalle, S.; Cavello, I.; González-Pombo, P.; Cavalitto, S. *VII Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones* 2016, Montevideo, Uruguay.