XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019
Resumen de Trabajos Libres

Clonación de gen codificante para la xilanasa hipertermofílica XynA del hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1

Luis G. Olmos-Bustos, Alejandro Santiago Hernández, and María Eugenia Hidalgo Lara.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. C.P. 07360.
Tel. 5747-3800 ext. 4360. e-mail ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: Xilanasa, Thielavia terrestris, clonación.

Introducción. El xilano es uno de los componentes principales de la pared celular en las plantas, está presente principalmente en la hemicelulosa. El xilano es un heteroglicano de residuos de xilopiranosa en su cadena principal. Las enzimas que realizan la degradación de este polímero se denominan xilanasas, dentro de este grupo de enzimas hay endoxilanasas y β-xilosidasas, principalmente. Las xilanasas son muy importantes debido a su aplicación en las industrias papelera, ambiental, agrícola, alimenticia y textil (Collins, Gerday, and Feller 2005).

El hongo termófilo ascomiceto *Thielavia terrestris* es de gran interés, ya que descompone la biomasa lignocelulósica y como fuente de enzimas termoestables (Gilbert et al. 1992). La cepa Co3bag1 de *Thielavia terrestris* se aisló del bagazo de caña y puede crecer a 45 °C. Recientemente reportamos la purificación y caracterización bioquímica de la xilanasa hipertermofílica y termoestable TtXynA nativa de *T. terrestris* Co3bag1 (García-Huante et al. 2017). TtXynA es una proteína glicosilada con un peso molecular estimado de 82 kDa.

El objetivo de este trabajo fue clonar el gen codificante para la xilanasa TtXynA (ttxyna) de *T. terrestris* Co3bag1 para su posterior expresión heteróloga, en sistemas de expresión como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris o Aspergillus niger*.

Metodología. La secuencia nucleotídica completa del gen codificante para la xilanasa TtXynA (ttxyna) de *T. terrestris* Co3bag1 (gen ttxyna) se obtuvo a partir de la secuencia parcial de aminoácidos, previamente generada por Espectrometría de Masas de la banda de 82 kDa (García-Huante 2018), y análisis bioinformático de la secuencia genómica de *T. terrestris* Co3bag1.
El ORF del gen ttxyna (ORF ttxyna) se amplificó por PCR utilizando ADN genómico de *T. terrestris* Co3Bag1 como molde, DNA polimerasa Taq de alta fidelidad. El ORF ttxyna se clonó en el vector pDrive (Qiagen) ®, que tiene genes de resistencia a kanamicina y ampicilina y un sitio de clonación múltiple LacZ. La construcción obtenida se transfirió a células de *E. coli* Dh5α. Las clonas transformantes se seleccionaron mediante α complementación en medio LB que contenía kanamicina 30 µg / ml.

Resultados. El gen ttxyna, que codifica para la xilanasa TtXynA (ttxyna) de *T. terrestris* Co3bag1 tiene una longitud de 1.8 kb, presenta dos intrones y una región codificante de aproximadamente 1.3 kb. El gen ttxyna codifica para un polipéptido de 414 aminoácidos, con un PM teórico de 44.3 kDa.

El análisis bioinformático sugiere que la xilanasa TtXynA se puede clasificar en la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10). El producto predicho del gen ttxyna, que contiene un péptido señal de secreción, un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidratos (**figura 1**).
Con la finalidad de expresar el gen ttxyna en forma heteróloga, el ORF ttxyna se amplificó por PCR y el fragmento obtenido se clonó en el vector pDrive. El gen ttxyna se transferirá a *A. niger* para estudios adicionales de expresión heteróloga. Simultáneamente, se extrajo RNA total para obtener cDNA del gen ttxyna, el cual será utilizado para la expresión del gen en *E. coli* y en *Pichia pastoris* X33.

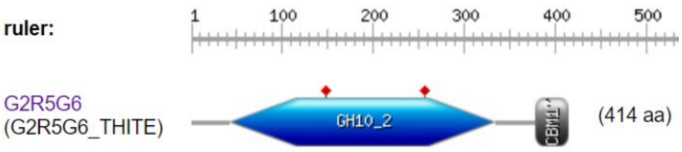

Figura 1: Dominios de la xilanasa XynA, con un dominio catalítico de la familia GH10 y un dominio de unión a carbohidratos de tipo 1, lo anterior fue identificado usando la herramienta ProSite del sitio ExPASy®

Conclusiones. Se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del gen (ttxyna) de *T. terrestris* Co3bag1. El producto predicho del gen ttxyna presenta alto porcentaje de identidad con xilanasas fúngicas de la Familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10).

El ORF del gen ttxyna se clonó exitosamente en el vector pDrive, y esta construcción será utilizada para la expresión de esta enzima en *Aspergillus niger*.

Agradecimientos. A CONACYT por la beca prestada para los estudios de maestría.

Bibliografía.

Collins, T. et al. 2005. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3–23.

García-Huante, Y. et al. 2017*Extremophiles* 21 (1): 175–86.

Gilbert, Michel, Colette Breuil, Makoto Yaguchi, and J. N. Saddler. 1992. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34–35 (1): 247–59.