



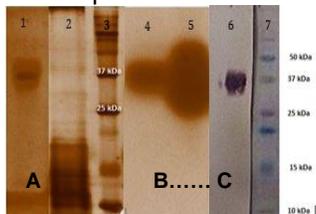
## PROPIEDADES DE LA ENZIMA ANCUT2 EXPRESADA EN *Pichia pastoris*

Sara Morales-García, Carolina Peña-Montes; Eric Hernández-Domínguez. Amelia Farrés-González, Departamento de Alimentos y Biotecnología. México, Facultad de Química UNAM D.F. 04510. [farres@unam.mx](mailto:farres@unam.mx)  
*Cutinasa, recombinante, Aspergillus nidulans.*

**Introducción.** Las cutinasas son carboxilesterasas ya que llevan a cabo la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos, cuyo sustrato es la cutina vegetal, el cual es un poliéster compuesto por ácidos grasos (1), cuya degradación es necesaria para la invasión por hongos fitopatógenos. Debido a las aplicaciones potenciales de las cutinasas, se ha buscado su sobreexpresión en hospederos heterólogos (2), lo que facilita tanto su producción como su purificación. El objetivo de este proyecto fue llevar a cabo la clonación, producción, purificación y caracterización bioquímica de la enzima ANCUT2 recombinante de *Aspergillus nidulans* expresada en el sistema heterólogo *Pichia pastoris*.

**Metodología.** La cepa recombinante de *Pichia pastoris* se cultivó e indujo con metanol en medio BMMY (Manual Easysselect™). La actividad enzimática se determinó cualitativamente con acetato de  $\alpha$ -naftilo ( $\alpha$ -NA) y se cuantificó con *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) y otros *p*-NP ésteres (3). Se siguieron técnicas bioquímicas convencionales para la preparación de geles SDS-PAGE, determinación de actividad por zimogramas (4, 5) y cuantificación de proteína por Bradford. La enzima se purificó por columna de afinidad a la cola de histidinas de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se midió actividad específica a diferentes temperaturas y pH y se determinó actividad específica a diferentes concentraciones y tiempos de incubación de solventes, metales e inhibidores. Los parámetros cinéticos se determinaron a diferentes concentraciones de *p*-NPA.

**Resultados.** Se verificó la presencia de la enzima pura en dos fracciones en geles SDS-PAGE. Observándose una sola banda tanto en el zimograma, como en "western blot" y en la tinción con plata. Sin embargo, el peso molecular (PM) obtenido (37 kDa) difiere del teórico con cola de histidinas (27 kDa), por lo que se realizó la identificación por secuenciación de péptidos de la enzima y se verificó que correspondía a la ANCUT2 (Figura 1).



**Fig. 1.** Purificación de la enzima recombinante ANCUT2 en geles SDS-PAGE. Panel A- Tinción con plata. Panel B- Zimograma. Panel C- "Western blot" para cola de histidinas. Carriles (1, 4, 6): ANCUT2 pura. Carriles (2,5): Extracto crudo de clona con ANCUT2. Carril 3: marcador de peso molecular, Low Range Biorad. Carril 7: marcador de peso molecular Kaleidoscop™.

La tabla 1 resume las propiedades bioquímicas de ANCUT2 y la tabla 2 los parámetros cinéticos.

**Tabla 1.** Propiedades bioquímicas de la enzima ANCUT2 recombinante

PM, pl	37 kDa, pl 4.6-4.8
Efecto de la temperatura	Temperatura óptima del ensayo (40°C)
Efecto del pH	pH óptimo del ensayo (7-9)
Resistencia a temperatura	60% actividad residual hasta 60°C, 1 h
Resistencia al pH	80% actividad residual de pH 7-10, 3 h
Especificidad de sustrato	<i>p</i> -NP ésteres de cadena corta
Iones	200% actividad residual sin iones, 150% con Mg <sup>2+</sup>
Inhibidores	PMSF, SDS, Tween 80
Solventes	150% actividad residual en Hexano al 50% en condiciones óptimas durante 4 horas
Hidrólisis de cutina	Sí
Sitios de glicosilación	No

**Tabla 2.** Constantes cinéticas de la enzima ANCUT2 pura recombinante

V <sub>max</sub> (mmol/min)	K <sub>m</sub> (mM)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Ciclo catalítico (s)
142.86	8.57	137.15	960.08	7.29x10 <sup>-3</sup>

**Conclusiones.** La enzima ANCUT2 se expresó exitosamente en *P. pastoris*. Se observó que se trata de una enzima termoalcalina. Se observó que la cutinasa recombinante presenta una eficiencia catalítica hasta treinta veces más grande que la ANCUT2 nativa. Las propiedades observadas son interesantes para evaluar su aplicación en biocatálisis. No se encontraron sitios de glicosilación, por lo que el cambio en el PM puede atribuirse a otras modificaciones post-traduccionales.

**Agradecimiento.** A CONACyT (153500).

### Bibliografía.

- Kolattukudy PE (1980), Cutin, suberin and waxes, In PK Stumpf (ed), The biochemistry of plants, 4: Lipids: Structure and Function, Academic Press, NY 571-6451
- Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 1997. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol. Bioeng.* 66 (1): 17-34.
- Bornscheuer, UT (2002), Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis, *FEMS Microbiol Rev* 26(1):73-81.
- Laemmli, UK, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259):680-685.
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S, RD Schmid. (2005). *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 59-69.