



## EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CUTINASA ANCUT1 PRODUCIDA EN *Pichia pastoris*

**Ilse Solís-Báez**, Carolina Peña-Montes, Eric Hernández-Domínguez y Amelia Farrés-González. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Avenida Universidad, 3000, México D.F., 04510. Correo electrónico: [carolpm@unam.mx](mailto:carolpm@unam.mx)

*Palabras clave:* cutinasa, termostable, *Pichia pastoris*

**Introducción.** Las cutinasas son enzimas que se clasifican como hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos, su sustrato principal es la cutina. En el genoma de *A. nidulans* se encuentran codificadas 4 cutinasas. Dentro de estas, la enzima ANCUT1 posee un amplio rango de aplicaciones a nivel industrial. Los resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo muestran que la obtención de ANCUT1 en *A. nidulans* es compleja, se produce en baja cantidad y su purificación es difícil (1, 2). Por lo tanto, el objetivo del este trabajo fue la expresión de la cutinasa ANCUT1 (AN5309) en *Pichia pastoris*; así como su purificación y caracterización.

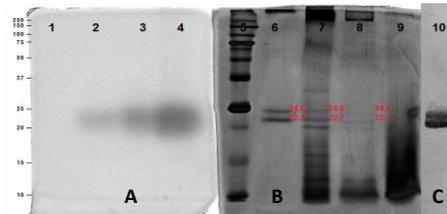
**Metodología. Producción.** ANCUT1 se clonó en *Pichia Pastoris* y se produjo de acuerdo a la metodología descrita por el proveedor (Manual Easysselect). La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford (3). Se realizaron geles de electroforesis SDS-PAGE de acuerdo al método de Laemmli (1970) y geles de actividad “*in situ*” (zimogramas) que se revelaron para actividad de esterasa (3).

**Purificación de la enzima.** Se realizó la ultrafiltración del extracto crudo en el equipo Amicón. La purificación se realizó por medio de una cromatografía de afinidad a la cola de histidinas adicionada a la proteína recombinante de acuerdo a lo descrito por el proveedor.

**Caracterización de la enzima.** Todos los ensayos de actividad específica se realizaron por triplicado con acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato (4). Se caracterizaron las propiedades bioquímicas, de especificidad y catalíticas de la cutinasa pura.

**Resultados.** Se determinó 24 h como tiempo óptimo de inducción con una actividad específica de 722.73 U/ mg. Se observó posterior a la purificación, inesperadamente, la presencia de dos bandas (22.7 kDa y 24.8 kDa), siendo 22.7 la que coincide con el peso teórico. Sin embargo, las dos corresponden a ANCUT1 de acuerdo a los resultados de “westernblot”, zimogramas y a la secuenciación de péptidos (Figura 1). Resultados similares, han sido reportados por otros grupos, donde se identifica la presencia de dos formas de una misma proteína debido a la presencia de la etiqueta del C-terminal (5).

Las propiedades bioquímicas y de especificidad de ANCUT1 se resumen en la Tabla 1. La enzima tiene una  $V_{max}$  de 15.75 mM/min,  $K_m$  de 1.06 mM,  $K_{cat}$  de 31,293.6 ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $K_{cat}/K_m$  de 29,614.6  $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$



**Figura 1.** A) Zimograma para esterasa, B) Perfil de proteínas con tinción en plata y C) “Westernblot” para cola de histidinas durante el proceso de purificación de ANCUT1. Carriles: (1,9) Extracto crudo (EC) de X33, (2,8) EC de *P. pastoris* con ANCUT1, (3,7) Ultrafiltrado de EC de *P. pastoris* con ANCUT1, (4,6) ANCUT1 pura y (5) Marcador de peso kaleidoscope, BioRad.

**Tabla 1.** Propiedades bioquímicas y de especificidad de ANCUT1.

Propiedad	Resultado
Efecto de la T	La temperatura (T) óptima del ensayo es 50 °C, la enzima es termoestable (70°C, 1 hora)
Efecto del pH	El pH óptimo del ensayo es 9, presenta actividad a pH alcalino (7-10)
pI	6.5
Especificidad de sustrato	Preferencia por sustratos de cadena corta
Iones metálicos	Ca <sup>2+</sup> disminuyó la actividad (se pierde 80% )
Surfactantes e inhibidores	SDS, Tween 80 y PMSF disminuyen la actividad
Solventes	Estabilidad en solventes orgánicos hidrofílicos
Hidrólisis de cutina	No realiza la hidrólisis
Glicosilación	La enzima no está glicosilada

**Conclusiones.** Se logró expresar exitosamente ANCUT1 en el organismo heterólogo *P. pastoris*. La enzima posee actividad de esterasa. La alta eficiencia en las características catalíticas, así como su naturaleza termoestable y alcalina le confieren un amplio potencial de aplicación en la industria.

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

### Bibliografía.

- Esqueda-Domínguez, K. (2012). Producción, identificación y caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Vega, F. (2013). Purificación y caracterización de la cutinasa ANCUT1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S, RD Schmid. (2005). *Appl Microbiol Biotechnol*. 67: 59-69.
- Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C., González-Canto, A., Alva-Gasca, A., Esquivel-Bautista, R., Navarro-Ocaña, A., & Farrés, A. (2012). *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(5): 1275-1290.
- Kwon, M. A., Kim, H. S., Yang, T. H., Song, B. K., Song, J. K. (2009). *Protein expression and purification*, 68(1): 104-109.