



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

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 (min^{-1}) y K_{cat}/K_m de 29,614.6 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$

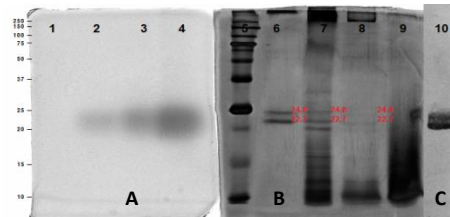


Figura 1. A) Zimograma para esterasa, B) Perfil de proteínas con tinción en plata y C) “Westernblot” para cola de histidinas durante el proceso de purificación de ANCUT1. Carriles: (1,9) Extracto crudo (EC) de X33, (2,8) EC de *P. pastoris* con ANCUT1, (3,7) Ultrafiltrado de EC de *P. pastoris* con ANCUT1, (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)
pl	6.5
Especificidad de sustrato	Preferencia por sustratos de cadena corta
Iones metálicos	Ca ²⁺ 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.