



## *Cellulomonas flavigena*: CLONACION MOLECULAR DEL GEN XIA QUE CODIFICA PARA UNA XILANASA

Norma G. Jiménez-Bueno, G. Beatriz Xoconostle-Cázares, M. Carmen Montes-Horcasitas y M. Eugenia Hidalgo-Lara\*

\*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. IPN No. 2508 San Pedro Zacatenco. CP 07360. México D. F. Fax (55)5061-3313. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, xilanasa, PCR, hemicelulosa

**Introducción.** La pared celular de las plantas está constituida por lignina, celulosa y hemicelulosa. La xilana, principal componente de la hemicelulosa, está compuesta de una cadena homopolimérica de unidades de  $\beta$ -1,4-D-xilanopiranosas sustituidas en su cadena principal por residuos acetil, arabinosil y glucuronosil. La conversión enzimática de xilana a sus componentes monoméricos requiere la acción de diferentes enzimas, incluyendo xilanasa (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidasa (EC 3.2.1.1), acetil xilan esterasa (EC 3.1.1.6) y las *p*-cumaroil y feruloil esterasas. Entre estas, las xilanasas son las más importantes ya que inician la degradación de la xilana en xilooligosacáridos (1). Estas enzimas tienen su principal aplicación en el bi blanqueo de la pulpa y el papel. Sin embargo, su uso es limitado debido a que las xilanasas disponibles en la actualidad no cumplen con las características enzimáticas requeridas para su aplicación en esta industria; por ejemplo, que sean activas a altas temperaturas y pH muy alcalinos. Considerando el potencial industrial de las xilanasas, en los últimos 10 años ha habido un creciente interés en la búsqueda de nuevas xilanasas y en el mejoramiento de las propiedades catalíticas de las xilanasas conocidas. Las xilanasas son producidas por bacterias y hongos xilanolíticos, algunos de los cuales producen múltiples xilanasas con varias actividades específicas. Se ha reportado que la bacteria *C. flavigena* produce al menos seis xilanasas en presencia de bagazo de caña como fuente de carbono (2).

El objetivo de este trabajo fue aislar y clonar el gen que codifica para una xilanasa de *C. flavigena*.

### Metodología.

*C. flavigena* se cultivó a 37°C por 24 h a 150 rpm en el medio que contenía ( $L^{-1}$ ): 5.5 g NaCl, 2.5 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.1 g  $CaCl_2$ , 0.1 g  $MgSO_4$ , 2 g extracto de levadura y 1 g glicerol. Se obtuvo una sonda molecular específica para xilanasas por PCR, utilizando: 1) DNA genómico de *C. flavigena*, 2) un par de oligonucleótidos iniciadores (X2D y X2R) diseñados a partir de secuencias conservadas en xilanasas microbianas reportadas en las bases de datos SwissProt y TrEMBL, y 3) la enzima Taq DNA polimerasa. El fragmento amplificado (1.5 kb) se clonó en el vector pDrive (Qiagen) y el producto de ligación se transfirió a células de *E. coli DH5a*. Las clonas transformantes, seleccionadas por su crecimiento en medio selectivo y por  $\alpha$ -complementación en presencia de IPTG y X-gal (tinción azul/blanco), se analizaron por digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI*. La secuencia de nucleótidos (nt) se determinó en un secuenciador Modelo 3100 Genetic analyser (Applied Biosystems). La secuencia obtenida se comparó por homología a secuencias previamente reportadas en las bases de datos (Swiss-Prot y TrEMBL), mediante el programa BLAST.

**Resultados y discusión.** El análisis electroforético de los productos de PCR mostró la amplificación de un sólo fragmento de aprox. 1.5 kb en las tres temperaturas de alineamiento probadas (Fig. 1). El fragmento de 1.5 kb se purificó y clonó en el vector pDrive, dando lugar al plásmido pDrive-XIA.

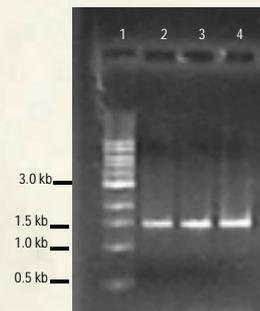


Figura 1. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de los productos de amplificación por PCR. 1) Marcador de DNA "1kb ladder", 2) 54°C, 3) 56°C, 4) 58°C.

El fragmento amplificado de 1.5 kb contiene una secuencia de 1467 nt que codifica para un polipéptido de 489 residuos de aminoácidos (aa) con una masa calculada de 51112 Da. El producto predecido de 489 aa presentó alta homología con xilanasas de *Cellulomonas fimi*; (64%), *Xylanimicrobium pachnodae* (60%), *Thermomonospora fusca* (58%) y *Streptomyces thermoviolaceus* (57%).

**Conclusiones y perspectivas.** Se logró elucidar aprox. el 85% de la secuencia de nt del gen XIA que codifica para una xilanasa de *C. flavigena*. El fragmento obtenido contiene la parte central de la región codificante del gen, incluyendo el dominio catalítico. La fracción faltante, aprox. 15%, corresponde a los extremos 5' y 3' del gen. El producto predecido de 489 aa presentó alta homología (57 a 64%) con otras xilanasas microbianas; indicando un buen grado de conservación en este grupo de enzimas. Actualmente, estamos determinando la secuencia de nt faltante a partir de una clona genómica de *C. flavigena*. La clonación del gen permitirá la expresión, caracterización y mejoramiento de la xilanasa recombinante por evolución dirigida.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue financiado por el CINVESTAV, MEXICO D. F.

### Referencias.

1. Eriksson, K.; Blanchette, R.; Ander, P. 1990. **Microbial and enzyme degradation of wood and wood components**. Springer-Verlag. Nueva York. 190-218.
2. Santiago, H. A. 1996. Aislamiento y Purificación de las D-xilanasas de *Cellulomonas flavigena*. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, México, D. F.