



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EXPRESIÓN DE LA XILANASA *Cfl xyn11A* DE *Cellulomonas uda* EN LA LEVADURA *Pichia pastoris* POR INDUCCIÓN CON METANOL.

Maribel Emilia Cayetano Cruz, Patricia Pavón-Orozco, Alejandro Santiago-Hernández, María Eugenia Hidalgo Lara, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV, México D.F. México, emilia@hotmail.com; ehidalgo@cinvestav.mx
Palabras clave: *Pichia pastoris*, AOX 1, xilanasas.

Introducción. Las xilanasas son enzimas capaces de degradar la xilana. Tienen importantes aplicaciones en la industria debido a su enorme potencial para transformar la lignocelulosa, específicamente la hemicelulosa¹. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica capaz de producir grandes cantidades de proteína recombinante². En ausencia de glucosa esta levadura es capaz de utilizar metanol como única fuente de carbono³. Nuestro grupo de trabajo previamente ha reportado la clonación y expresión del gen de la xilanasas *Cfl xyn11A* en *E. coli*⁴; sin embargo, aproximadamente el 60% de la proteína se agregó dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión. Por esta razón, nos propusimos estudiar la expresión del gen que codifica la xilanasas de *C. uda* en *P. pastoris*, bajo el control del promotor AOX1.

El objetivo de este trabajo fue expresar del gen de la xilanasas *Cfl xyn11A* de *Cellulomonas uda* en *P. pastoris* por inducción con metanol.

Metodología. El gen *Cfl xyn11A* que codifica la xilanasas fue subclonado en el vector de expresión pPICZ α , generando el plásmido pPICZ α -*Cflxyn11A*. Esta construcción fue transferida a células de *P. pastoris* por electroporación y las clonas transformantes fueron seleccionadas por crecimiento en placas de agar con medio YPD conteniendo 100 mg/mL de Zeocina. Para los experimentos de expresión, las clonas candidatas se incubaron a 30°C durante 8 h en placas de medio BMMY conteniendo 0.5% de metanol y 0.2% de xilana. Las clonas positivas fueron seleccionadas por la expresión de la actividad de xilanasas por el método de tinción con Rojo Congo. La actividad de xilanasas se midió por el método de DNS.

Resultados. Se realizó la subclonación del gen *Cfl xyn11A* en el vector pPICZ α , lo cual fue comprobado por digestión con enzimas de restricción y liberación del inserto del tamaño esperado (**Fig. 1**). Posteriormente, *P. pastoris* se transformó por electroporación con la construcción pPICZ α -*Cflxyn11A*. Se obtuvieron clonas candidatas, las cuales fueron seleccionadas por su capacidad para expresar la xilanasas recombinante. El escrutinio se realizó mediante un análisis funcional creciendo las clonas en un medio conteniendo metanol como inductor y xilana para la detección de la actividad xilanolítica. Estas placas fueron teñidas con Rojo Congo al 0.75% y destañadas con una solución de NaCl 1 M. Se

escogió la clona denominada C9PIC, que presentó la mayor actividad xilanolítica (**Fig. 2**).

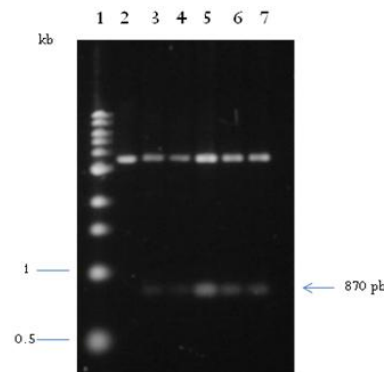


Fig. 1. Liberación de inserto de pPICZ α -*Cfl xyn11A*. 1) Marcador de tamaño molecular, 2) pPICZ α / *Xba* I y *Pst* I y 3-7) clonas positivas.

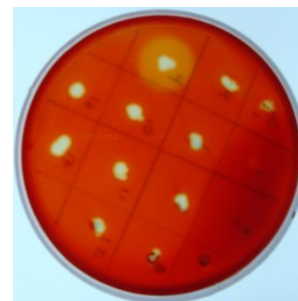


Fig. 2. Determinación de la actividad xilanolítica de las clonas candidatas.

Conclusiones. Métodos moleculares y bioquímicos nos permitieron identificar una clona positiva de *P. pastoris*/pPICZ α -*Cflxyn11A* capaz de expresar extracelularmente la xilanasas *Cflxyn11A* de *Cellulomonas uda*, después de la inducción con 0.5% de metanol.

Agradecimiento. Al CINVESTAV por el financiamiento de esta investigación y a la beca otorgada a MECC por el CONACYT para estudios de maestría.

Bibliografía.

1. Davies y Henrissat (1995). *Structure* (3), 853-859.
2. Cereghino y Cregg (2000). *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66
3. Cregg *et al.* (2000). *Mol. Biotechnol.*, 16: 23-52.
4. Amaya *et al.* (2010). *Bioresour. Technol.* 101, 5539-5545