



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Clonación y expresión de la xilanasa CflXyn11A de *Cellulomonas flavigena* y de su dominio catalítico DCXyn11A en *Pichia pastoris*

Pavón Orozco, José Alejandro Santiago Hernández, Lizbeth Pérez Hernández y María Eugenia Hidalgo Lara.
Depto. de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN. Av. IPN No 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero. CP 07360. México D. F. E-mail ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: xilanasa, *C. flavigena*, *Pichia pastoris*

Introducción. Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que escinden la cadena principal β 1,4 D-xilosa en la xilana. Son de interés industrial en procesos que involucran la degradación de restos de celulosa y hemicelulosa, como son los procesos textiles, tratamiento de desechos agroindustriales, y uso de residuos agrícolas para la producción de bioetanol. La presencia del CBM en estas enzimas pueden conferir un efecto de proximidad al sustrato, también se les ha atribuido la conferencia de termoestabilidad al dominio catalítico. Xyn11A es una xilanasa modular de *Cellulomonas flavigena* que contiene un CBM que ha sido clasificado como CBM familia II.

Con el fin de evaluar la participación del CBM de Xyn11A (Xyn11A-CBM) en la actividad enzimática de esta xilanasa, se expresaron en *Pichia pastoris* tanto la enzima modular (Xyn11A) como su dominio catalítico (DCXyn11A).

Metodología.

El ORF *xyn11A* y la región correspondiente al dominio catalítico (DCXyn11A) de la xilanasa Xyn11A de *C. flavigena* se amplificaron por PCR, a partir de ADN plasmídico de la cepa XL-BlueMRF MB3 y oligonucleótidos diseñados específicamente a partir de la secuencia nucleotídica del gen (Amaya-Delgado 2010). Los amplicones, se clonaron en el vector pGAPZ α A (Invitrogen). Las construcciones pGAPZ_Xyn11A y pGAPZ_DCXyn11A se utilizaron para transformar *P. pastoris* X-33 por electroporación. Las clones transformantes se seleccionaron por crecimiento en medio YPD con Zeocina 100 μ g/ml. Las clones positivas se cultivaron en medio TB modificado y se analizaron por análisis de restricción y actividad extracelular de xilanasa. La actividad xilanolítica fue determinada por cuantificación de azúcares reductores de acuerdo al ensayo de actividad previamente descrito (Santiago-Hernández *et al.*, 2007).

Resultados. Las proteínas recombinantes Xyn11A y DCXyn11A se expresaron extracelularmente y en forma activa en células de *P. pastoris*. Xyn11A y DCXyn11A se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo de células *P. pastoris*/ pGAPZ_Xyn11A y *P. pastoris*/ pGAPZ_DCXyn11A, por cromatografía de intercambio iónico. El análisis electroforético de la xilanasa Xyn11A purificada reveló una banda de aprox. 36 kDa, lo cual concuerda con el PM estimado para esta proteína. Para

DCXyn11A se estimó un PM aproximado de 22 kDa, en concordancia con su peso teórico (Fig. 1). Las propiedades catalíticas de ambas enzimas se resumen en la Tabla I.

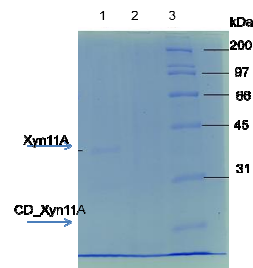


Fig. 1. Análisis electroforético en SDS-PAGE Carriles: 1) Xyn11A aprox. 36 kDa, 2) DCXyn11A aprox. 22 kDa, 3) Marcadores de PM.

Tabla 1. Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes Xyn11A y DCXyn11A.

| Enzima | Temperatura Optima | pH óptimo | Km (mM) | Vmax (μ mol/min* mg) |
|----------|--------------------|-----------|---------|---------------------------|
| Xyn11A | 50°C | 7 | 1.14 | 2.42 |
| CDXyn11A | 50°C | 7 | 1.09 | 0.06 |

Conclusiones

Las xilanasas recombinantes Xyn11A (36 kDa) y DCXyn11A (22 kDa) se expresaron extracelularmente y en forma activa en células de *P. pastoris*.

Las propiedades bioquímicas de Xyn11A y DCXyn11A fueron similares; sin embargo, la Vmax de DCXyn11A fue 40 veces menor a la Vmax de Xyn11A, probablemente debido a la ausencia del CBM de la xilanasa Xyn11A.

Agradecimiento. Se agradece a CONACYT por la beca otorgada a Patricia Pavón Orozco para sus estudios de doctorado.

Bibliografía.

Santiago-Hernández A., Vega-Estrada J., Montes-Horcasitas M.C., Hidalgo-Lara M.E., 2007. J. Ind. Microbiol. Biotechnol (2007) 34:331-338.
Amaya-Delgado L., Calixto Romo M.A., Santiago-Hernández J.A., Xoconostle-Cázares B.G., Ruíz-Medrano R., Hidalgo-Lara M.E. 2010. Bioresour. Technol.(2010). 101:5539-5545.