



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## ESTUDIO DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD ENDO-1,4- $\beta$ -XILANASA PRODUCIDAS POR *Bacillus flexus* NJY2

Alexandra Montoya Mendoza<sup>1</sup>, Mónica Sánchez-González<sup>1</sup>, Jesús Alberto Gómez Treviño<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza 66451, a.montoyamendoza@gmail.com

*Palabras clave:* *Bacillus flexus*, xilanasa, alcalófilo facultativo.

**Introducción.** Las endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (EC 3.2.1.8) son glicohidrolasas que degradan al xilano, polisacárido de las paredes celulares vegetales. Estas enzimas son producidas por bacterias, algas y hongos, y tienen ya un papel importante en diversas industrias, como la papelera, de alimentos y ganadera, entre otras. La mayoría de las xilanasas son mesofílicas y muestran actividad a pH neutro o ligeramente ácido; sin embargo, se han reportado enzimas con actividad a temperaturas de 5 a 105°C, pH de 2 a 11, y ambientes de hasta 30% de salinidad (1). El entendimiento de la estructura y función de estas enzimas se basa en la comparación de dominios conservados con secuencias de xilanasas ya estudiadas. Se han reportado seis cepas de *Bacillus flexus* aisladas de nejayote y capaces de crecer en ambientes alcalinos. Una de estas, la NJY2, demostró actividad feruloil esterasa, (2). Las feruloil esterasas trabajan de manera sinérgica con las xilanasas por lo que este microorganismo es un buen candidato para la producción de xilanasas.

El objetivo del presente trabajo es la detección de una endo-xilanasa producida por *B. flexus* NJY2.

**Metodología.** *Prueba hidrolítica en placa.* *B. flexus* NJY2 fue sembrado en un sistema de difusión en placa con xilano como única fuente de carbono, y teñida con rojo Congo. *Azúcares reductores totales.* *B. flexus* fue inoculado en un medio líquido complejo enriquecido con xilano. El contenido de azúcares reductores totales fue cuantificado por el método de DNS. Adicionalmente, fue medido el pH del medio de cultivo. *Amplificación de la secuencia de interés.* La amplificación de la secuencia de interés se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. La purificación de fragmentos de ADN se realizó con un kit comercial.

**Resultados.** *Detección de enzima con actividad xilanasa.* La tinción de la prueba hidrolítica en placa reveló un halo alrededor de la colonia de *B. flexus* NJY2 (Figura 1). Ya que el rojo Congo se une a polisacáridos lineales, el halo corresponde al área donde fue degradado el xilano a oligo- o monosacáridos. En cultivos de *B. flexus* con xilano se determinó un aumento en azúcares reductores asociados con el crecimiento, como producto de la hidrólisis del xilano. Por otra parte también se observó un aumento en el pH del medio. Se ha reportado que algunos microorganismos alcalófilos adecuan el pH del

medio de cultivo para que puedan actuar sus enzimas (3). Este puede ser el caso de la xilanasa pues se determinó posteriormente que la hidrólisis de xilano se incrementaba por arriba de pH 9.



**Figura 1.** Prueba hidrolítica en placa. *Bacillus flexus* NJY2 fue sembrada en placa con medio agar-xilano 0.2%. Posterior a la incubación, la placa fue teñida con rojo Congo 0.1% y lavada con NaCl<sub>2</sub> 1M.

**Aislamiento del gen.** Se siguieron dos estrategias para el aislamiento del gen codificante de la endo-xilanasa: amplificación a partir del genoma de *B. flexus* NJY2 (Bf), y amplificación a partir de plásmido de *E. coli* transformada con el genoma de *B. flexus* (Ec11). En ambas estrategias se emplearon iniciadores específicos para xilanasas de las familias 10 y 11 (GH10 y GH11). PCR con iniciadores de GH10 amplificaron dos fragmentos en reacciones con Bf, y un fragmento en reacciones con Ec11. En ninguno de los casos se observó amplificación para GH11.

**Conclusiones.** *Bacillus flexus* NJY2 produce una enzima con actividad endo-1,4- $\beta$ -xilanasa capaz de hidrolizar a pH alcalinos. Esta enzima tiene similitud con xilanasas de la familia 10 de glicohidrolasas.

**Agradecimiento.** Se agradece el apoyo económico de CONACYT proyecto 83263.

### Bibliografía.

- Collins T, Gerday C, Feller G. (2005). FEMS Microbiology Reviews. 23: 411-456.
- Sánchez M, Blanco A, Escalante A, Valladares AG, Olvera C, Parra R. *Letters in Applied Microbiology*. En prensa.
- Horikoshi K. (1999). Cell Structure. En: *Alkaliphiles*. Harwood Academic Publishers, Países Bajos, 40-56.