XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019
Resumen de Trabajos Libres

Clonación, expresión y purificación de la xilanasa XynB del hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1 en *Escherichia coli*.

Natanael German Ramírez, Alejandro Santiago Hernández, María Eugenia Hidalgo Lara. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. C.P. 07360. Tel. 5747-3800 ext. 4360. e-mail ehidalgo@cinvestav.mx

xilanasas, hemicelulosa, sacarificación

Introducción. La hemicelulosa es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, sólo después de la celulosa, y su composición es principalmente de monómeros de xilosa. Se han realizado muchos esfuerzos para lograr una completa degradación de este polímero utilizando enzimas de origen microbiano como xilanasas, xilosidasas y glucuronidasas. Las xilanasas son las de mayor relevancia industrial debido a sus variadas aplicaciones en sectores como el alimenticio, textil, nutrición animal, energético (biocombustibles) y en la industria papelera, en dichos sectores su aplicación tiene beneficios medioambientales adicionales (1). *Thielavia terrestris* es un hongo termófilo filamentoso del filo ascomyceta, del cual se han obtenido enzimas termoestables como lacasas, celulosas y xilanasas. *E. coli* es el organismo más popular para la expresión de enzimas recombinantes de diversas fuentes, debido a su bajo costo de producción y alto rendimiento, entre las proteínas expresadas en este organismo se han reportado xilanasas (2, 3).

Metodología. El gen ttxynb se amplificó utilizando PCR de punto final y como DNA molde se usó DNA genómico extraído de *T. terrestris* Co3Bag1. La amplificación se realizó con la HiFidelity DNA Taq Polymerase de Qiagen®. El ORF de ttxynb se clonó de forma direccional en los sitios EcoRI y HindIII del vector de expresión pET38b(+). La construcción obtenida se transfectó a células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. La expresión de la enzima recombinante TtXynB se realizó con el medio de autoinducción, previamente descrito (4). El cultivo se centrifugó, y se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se realizó un perfil proteico del sobrenadante obtenido por medio de SDS-PAGE al 10% y teñido con azul brillante de Coomasie para verificar la expresión de la proteína recombinante. Se sometió a pruebas para verificar la presencia de actividad xilanolítica con el método del ácido 3,5-dinitrosalicilico (DNS), descrito previamente (5). La purificación de la enzima se realizó con una columna de agarosa Ni-NTA de Qiagen®.

Resultados. La expresión y purificación de la xilanasa recombinante TtXynB se logró correctamente en *E. coli* (DE3) pLysS. El análisis de SDS-PAGE mostró una banda purificada de aproximadamente 50 kDa. La enzima recombinante mostró una temperatura de 60 °C y un tiempo de incubación óptimo de 3 minutos con un pico en su actividad de 0.385 U/mL.

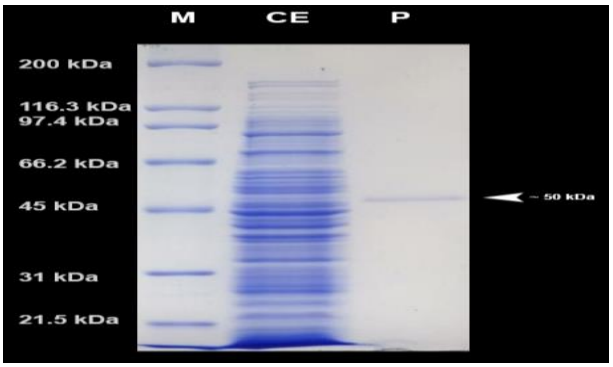

Fig. 1. SDS-PAGE al 10 % de la enzima TtXynB purificada por cromatografía de afinidad a Ni. M: Marcador molecular, CE: Extracto crudo del sobrenadante de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas con pET-38b(+)-TtXynB, P: TtXynB recombinante purificada.

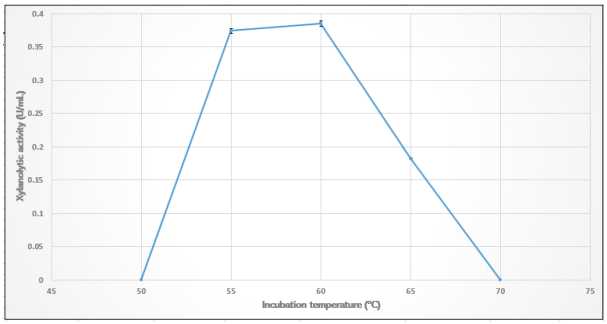

Fig. 1. Actividad enzimática determinada a diferentes temperaturas por el método del ácido 3,5-dinitrosalicilico (Miller, 1959).

Conclusiones. Se logró la expresión, purificación y caracterización bioquímica parcial de una nueva xilanasa termofílica de *Thielavia terrestris* Co3Bag1, demostrando además la utilidad de *E. coli* para la expresión de estas enzimas de origen eucariótico, y fúngico.

Agradecimientos. Esta investigación se realizó con recursos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Bibliografía.

1) BLUMER-SCHUETTE, *et al.,* 2008, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19, 210-217.
2) GARCÍA-HUANTE *et al.*, 2017, *Extremophiles*, 21, 175-186.
3) NEETA KULKARNI, JYOTI C., MALA R., *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 972-976
4) MILLER, G. L., 1959, *Anal. Chem*., 31, 426-428.
5) STUDIER, F. W., 2005, *Protein Expr. Purif.,* 41**,** 207-234