

**LA PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*
CONFIRMA EL POTENCIAL FIBROLÍTICO DE ESTE FUTURO PROBIÓTICO
PRODUCTION OF XYLANASES BY *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* CONFIRMS
THE FIBROLYTIC POTENTIAL OF THIS PROBIOTIC FUTURE**

Ruiz, María Soledad¹; Giménez, María Cecilia ^{1,2}; Arenas, Graciela Nora^{1,3}; Sohaefer, Noelia¹;
Pereyra, Laura¹; Pereyra, Celia¹; Gaia, Augusto¹; Goncalves, Celina¹; Sechovcová, Hana⁴;
Mrázek, Jakub⁴; Grilli, Diego^{1,3}.

¹Universidad Juan Agustín Maza, Mendoza, Argentina.

²Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, CCT-CONICET Mendoza.

³Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

⁴Institute of Animal Physiology and Genetics. Academy of Sciences of the Czech Republic.
Praha, Czech Republic.

Contacto: dieogrilli@yahoo.com.ar

Palabras Clave: SDS-PAGE, Xilanograma, Probiótico.

Keywords: SDS-PAGE, Xylogram, Probiotic.

Recientemente, nuestro equipo logró aislar una bacteria de la especie *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* (cepa 2) a partir del contenido ruminal de cabras Criollas. En esta cepa, se identificaron los genes que codifican para xilanasas involucradas en la degradación de la fibra vegetal. La caracterización de las enzimas fibrolíticas producidas por *P. xylanivorans* 2, mediante enzimogramas y la determinación de su actividad enzimática, confirmarían el potencial fibrolítico de esta cepa para ser utilizada como probiótico. Para confirmar estos resultados se compararon los resultados obtenidos con la cepa de referencia (*P. xylanivorans* Mz5). Por lo tanto, ambas cepas se cultivaron anaeróticamente a 38 °C en un medio líquido sin fluido ruminal que contenía 0,5% de xilano o 0,2% de glucosa. Las bacterias se cosecharon después de un crecimiento de 5 días, mediante centrifugación a 3000 rpm y se lavaron con buffer fosfato de sodio (50 mM, pH = 6,5). El sobrenadante se filtró a 10 °C utilizando una membrana Millipore y se almacenó inmediatamente a -20°C. El pellet bacteriano (o fracción celular) se conservó en esta misma temperatura. La actividad xilanasas de ambas cepas se determinó espectrofotométricamente en las fracciones celulares (endoxilanasas) y sobrenadantes (exoxilanasas), utilizando 0,5 % de xilano en buffer fosfato de sodio a 37 °C. Las concentraciones de azúcares reductores se determinaron después de la incubación de las muestras con el sustrato, a 37 °C durante 150 minutos, de acuerdo con el método descrito por Lever. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando SDS (SDS-PAGE) y detección visual de la actividad xilanólítica, se realizó el análisis funcional de la capacidad de degradación del xilano por ambas cepas. Para ello, después de la centrifugación de los cultivos, las proteínas celulares y las proteínas sobrenadantes se separaron mediante SDS-PAGE. Las muestras se incubaron durante 10 min a 80 °C antes de ejecutar el gel. El procedimiento para realizar los xilanogramas fue el mismo utilizado para realizar SDS-PAGE convencional, adicionando un 0,5% de xilano al gel separador. Después de la electroforesis, las enzimas se renaturalizaron en buffer Tris HCl 50 mM (pH = 6,8) y mercaptoetanol 5 mM con EDTA 1 mM. Las proteínas con actividad xilanólítica se detectaron como zonas "aclaramas" después de la re-naturalización, incubación y tinción del gel con solución alcalina de rojo Congo (Sigma). Los pesos moleculares de las enzimas se determinaron con marcadores de proteínas (BioLabs, New England). Los resultados muestran en ambas cepas una endoxilanasas constitutiva de 45 kDa, cuya actividad xilanólítica específica fue 50 ug/mL/h, duplicada (100 ug/mL/h) luego de la inducción generada por la presencia de xilano. Se identificaron exoxilanasas de 45 a 58 kDa en ambas cepas que fueron inducidas por la presencia de xilano. A partir de estos resultados se puede concluir que *P. xylanivorans* 2 expresa su actividad xilanólítica máxima en presencia de xilano y confirma el potencial fibrolítico de este futuro probiótico.