

## PURIFICACIÓN POR AFINIDAD DE UNA $\alpha$ -AMILASA PRODUCIDA POR *Cellulomonas flavigena*.

Olga G. Flores-Arroyo, Jesús Vega-Estrada, Ma. Eugenia Hidalgo-Lara, María del Carmen Montes-Horcasitas.  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV. cmontes@cinvestav.mx

*Palabras clave:* *Cellulomonas*, *Amilasas*, *Purificación*.

**Introducción.** Las amilasas son enzimas que degradan almidón. Son utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica, detergente y textil. Aunque las amilasas pueden obtenerse de diferentes fuentes: plantas, animales y microorganismos, las microbianas han incrementando su demanda y casi reemplazado por completo a los tratamientos químicos en la hidrólisis del almidón a nivel industrial. (1) Tradicionalmente, las  $\alpha$ -amilasas de origen microbiano han sido purificadas por cromatografía de intercambio iónico y/o filtración en gel con bajos porcentajes de recuperación. La unión específica enzima-sustrato (cromatografía de afinidad) se ha utilizado en algunos casos como una buena herramienta de purificación con mejores rendimientos. (2)

En este trabajo se purificó por cromatografía de afinidad una  $\alpha$ -amilasa producida por *Cellulomonas flavigena*.

**Metodología.** *C. flavigena* CDBB 531 fue crecida en un medio mineral (3) con almidón a 25 g/l. Cuando se alcanzó una densidad celular de 8 g/L, las células fueron separadas por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para la purificación de la  $\alpha$ -amilasa. Para aislar la proteína se precipitó con sulfato de amonio. El precipitado se resuspendió en regulador Tris-HCl 0.05M pH 7. La  $\alpha$ -amilasa se purificó por cromatografía de afinidad, utilizando almidón de maíz como soporte; para la elución se evaluaron soluciones de dextrina al 2%, maltosa al 2% y almidón al 1%. A las fracciones eluidas con cada solución se les determinó actividad amilolítica por el método de liberación de azúcares reductores los cuales fueron medidos por DNS y se realizó el análisis electroforético en gel desnaturante de acrilamida (SDS-PAGE) al 10% para observar el grado de purificación y determinar el peso molecular.

**Resultados.** Los pasos de la purificación se muestran en la Tabla 1. La aplicación de la cromatografía de afinidad permitió la purificación parcial de la enzima en forma selectiva, al unirse la proteína a su sustrato específico en forma reversible utilizando una solución de dextrina al 2% como eluyente. En el análisis electroforético, se observó una banda relativamente pura de aproximadamente 38 KDa Figura 1. La banda purificada mostró tener actividad amilolítica

produciendo bandas de hidrólisis en un zimograma y actividad  $\alpha$ -amilolítica específica utilizando como sustrato amilosa azure. (Datos no mostrados).

Tabla 1 Purificación por afinidad de la  $\alpha$ -amilasa

Muestra	Vol. (mL)	Proteína (mg/mL)	Act. vol. (UI/mL)	Act. Especif. (UI/mg prot.)	Eficiencia (%)	Purificación
Extrac. Crudo	260	0.22	0.264	1.2	100	1
Precipitado con sulfato	10	0.96	2.11	2.2	801	1.8
Eluido con dextrina	6	0.20	0.84	4.24	318	3.5

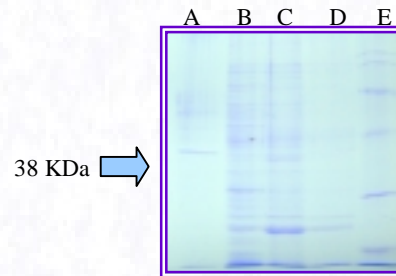


Fig 1. Gel SDS-PAGE 10% de  $\alpha$ -amilasa a diferentes estados de purificación. (A)  $\alpha$ -amilasa purificada, (B) Extracto crudo concentrado, (C) Proteínas sin afinidad a almidón, (D) Extracto crudo, (E) Marcadores de peso molecular.

**Conclusiones.** La  $\alpha$ -amilasa de 38 KDa producida por *C. flavigena* tiene afinidad a almidón y esta puede ser eluida con una solución de dextrina 2% mejor que con una solución de maltosa 2% ó de almidón 1%.

### Bibliografía.

- Sivaramakrishnan S, Gnagadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A. (2006).  $\alpha$ - amylases from microbial sources – An overview on recent developments. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2):173-184.
- Damadora M, Ratman B, Dasari VenkataRamesh, Ayyanna C. (2005). Rapid method for affinity purification of thermostable  $\alpha$ - amyase from *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiol. and Biotech.* 21:371-375.
- Amaya-Delgado L, Vega-Estrada J, Flores-Cotera LB, Dendooven L, Hidalgo-Lara ME, Montes-Horcasitas MC. (2005). Induction of xylanases by sugar cane bagasse at different cell densities of *Cellulomonas flavigena*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70(4): 477-481.