

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA XILANASA DE 57 kDa DE *Cellulomonas flavigena* CON AFINIDAD A CELULOSA

Elizabeth Lazo-Moreno, Alejandro Santiago-Hernández, M. Teresa Mejía-Castillo, M. del Carmen Montes-Horcasitas y M. Eugenia Hidalgo-Lara. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. México, D. F. CP 07360 Fax: 57473313
e-mail: ehidalgo@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, xilanasas, purificación

Introducción. La xilana es uno de los componentes principales de la pared celular de las plantas y el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. La hidrólisis enzimática de este polisacárido es catalizado por enzimas denominadas xilanasas, las cuales son producidas por hongos, levaduras, algas marinas y algunas bacterias, y generalmente son de tipo extracelular. Las xilanasas son enzimas modulares bifuncionales que presentan un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidrato (CBM). Ambos dominios son independientes en plegamiento, estructura y función. El estudio de las xilanasas se ha incrementado durante los últimos diez años debido a su aplicación que en las industrias del papel y de alimentos. *Cellulomonas flavigena* es una bacteria aerobia de suelo Gram(+) capaz de utilizar celulosa y xilana como fuente de carbono y una fuente potencial para producir estas enzimas y a la fecha se han purificado y caracterizado tres xilanasas extracelulares de *C. flavigena* con pesos moleculares aproximados de 63, 35 y 17 kDa (Montes y col., 1997). En este trabajo nos propusimos purificar y caracterizar una xilanasas extracelular de 57 kDa de *C. flavigena*, con afinidad por celulosa microcristalina (Avicel).

Metodología. *C. flavigena* se creció en un medio mineral suplementado con Avicel al 1%. Las proteínas adsorbidas al Avicel fueron eluidas con etilenglicol y sujetas a cromatografía de intercambio iónico (AEC) (MonoQ, Pharmacia), utilizando un gradiente lineal de KCl (0.05M-0.6M) a una velocidad de flujo de 1ml/min. Las fracciones con actividad de xilanasas se sometieron a una cromatografía de filtración en gel (GFC). Las fracciones obtenidas se analizaron por su actividad hidrolítica sobre carboximetilcelulosa (CMC) y xilana. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando BSA como estándar (BioRad). La enzima purificada se analizó por PAGE-SDS al 10%, utilizando estándares de PM (BioRad).

Resultados y discusión. La xilanasas de 57 kDa se purificó aprovechando su afinidad a celulosa cristalina a partir de cultivo de *C. flavigena* crecida en presencia de Avicel. Al término del cultivo, el Avicel se recuperó y las proteínas adsorbidas a este sustrato se eluyeron con etilenglicol al 100%. Después de remover el etilenglicol por filtración en gel, el extracto proteico se fraccionó por AEC. El análisis electroforético de las fracciones obtenidas permitió la

detección de una proteína de 57 kDa en la fracción correspondiente al material que no se unió a la columna de intercambio aniónico (Fig 1, carriles 2-5). La proteína de 57 kDa se purificó por un paso posterior de GFC (Fig. 1, carriles 7-8). La enzima purificada mostró actividad hidrolítica sobre xilana pero no sobre Avicel ni sobre CMC. La unión de la xilanasas de 57 kDa al Avicel fue reproducible y resistente a lavados exhaustivos con KCl 1 M.

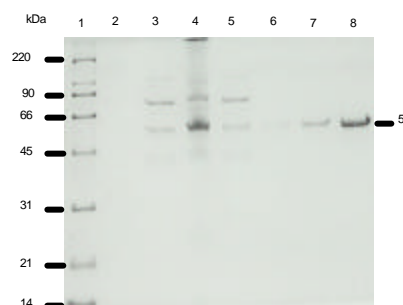


Fig. 1 Purificación de la xilanasas de 57 kDa. PAGE-10%. Carril 1, marcadores de PM. Carriles 2-8, fracciones de la cromatografía de AEC (2-5) y de GFC (6-8).

Conclusiones.

C. flavigena secreta una xilanasas de aproximadamente 57 kDa con afinidad por celulosa microcristalina, sugiriendo que esta enzima presenta por lo menos un dominio CBM. El estudio de las moléculas responsables de la actividad xilanolítica de *C. flavigena* nos permite mejorar nuestro conocimiento sobre la biología de esta bacteria; y al mismo tiempo, aumentar los recursos biotecnológicos disponibles para la utilización potencial de desechos agrícolas ricos en xilana.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Bibliografía.

Montes-Horcasitas C, Ortega-López J, Magaña-Plaza I (1998) Xylanases from *Cellulomonas flavigena*: purification and characterization. *Biotechnol Tech* 12:663-666.