

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE UNA β -1,4 ENDOGLUCANASA DE *Cellulomonas flavigena* EXPRESADA EN *Escherichia coli*

Reyes-Luengas, D.C.¹, Gutierrez-Nava, A.¹, Salgado Luis Miguel.² T. Ponce-Noyola¹
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería¹, Departamento de Bioquímica² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. IPN, 2508, Col San Pedro Zacatenco, CP. 07000. Tel/Fax 57473800 ext 3905. e-mail: tponce@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, β -1,4 endoglucanasa, Carboximetilcelulosa

Introducción *Cellulomonas flavigena* produce varias celulasas extracelulares⁽¹⁾ en cantidades importantes, además a diferencia de los hongos, sus celulasas son más activas en pH's alcalinos. Una alternativa para incrementar la producción de celulasas ha sido la clonación de genes en vectores de expresión a hospederos libres de celulasas, con el fin de obtener solamente la actividad celulolítica de interés para un proceso industrial o bien para el estudio de las enzimas en su forma individual para reconstruir posteriormente el sistema original.

El gen *celcflB* de *C. flavigena* que codifica para una endoglucanasa fue aislado y clonado en el vector de expresión pQE30 en *E. coli*⁽²⁾. La proteína recombinante de aproximadamente 58 Kda presentó actividad hacia carboximetilcelulosa en placa. Sin embargo, en cultivo sumergido y bajo condiciones de inducción (IPTG 1 mM) la sobre-expresión de la proteína da lugar a una proteína sintetizada en grandes cantidades pero en forma inactiva. Debido a lo anterior se planteó como objetivo de nuestro trabajo el obtener y purificar la β -1,4 endoglucanasa en su forma activa para su posterior caracterización bioquímica.

Metodología. Se realizaron fermentaciones sumergidas de *E. coli* (pQE30celB_2) en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 mg/ml) y kanamicina (10 mg/ml) incubando toda la noche a 37°C. Con 1/20 v/v de este cultivo se inoculó un segundo cultivo bajo las mismas condiciones, en el cual al alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5 se indujo la proteína con IPTG [1 mM]. Se tomó una alícuota antes de la inducción (control no inducido). Se tomaron muestras cada hora para seguir la cinética de formación de la proteína. Por otro lado, un cultivo inducido se sometió a diferentes tratamientos de lisis celular con la finalidad de solubilizar la enzima de interés. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE al 10%. Mediante Western Blot y utilizando anticuerpos policlonales⁽³⁾ se detectó la proteína recombinante.

Resultados y Discusión. La cinética de inducción muestra que una hora después de la adición del IPTG fue suficiente para que la proteína recombinante se encontrara en el cultivo (Fig. 1). Ya que *E. coli* no exporta las proteínas, se llevó a cabo el rompimiento celular con diferentes tratamientos para liberar la enzima. Sin embargo el análisis en SDS-PAGE

mostró que la proteína recombinante siempre se encontró en el paquete celular (Fig. 2). Por otra parte, para comprobar que efectivamente la endoglucanasa de *C. flavigena* se está expresando en *E. coli*, se realizó un Western Blot utilizando anticuerpos policlonales obtenidos previamente⁽³⁾. La señal obtenida, indica que la proteína expresada en *E. coli* corresponde a la endoglucanasa esperada (Fig 3).

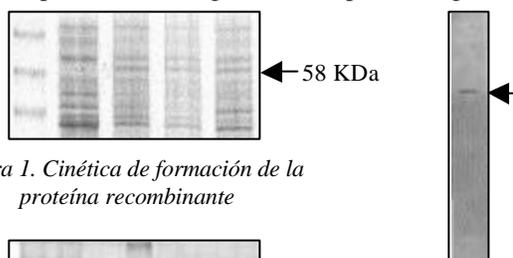


Figura 1. Cinética de formación de la proteína recombinante

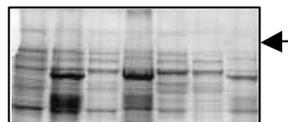


Figura 3. Western Blot

Figura 2. Tratamientos de lisis celular. Carriles: (1) Control no inducido, (2) Inducción después de 3 h (3) Sobrenadante lisis con lisozima, (4) Pellet lisis con lisozima-tween, (5) Sobrenadante lisis con lisozima-tween, (6) Pellet lisis con prensa Francesa, (7) Sobrenadante lisis con prensa Francesa

Conclusiones. La endoglucanasa de *C. flavigena* se clonó en *E. coli* sin embargo la proteína sobre-expresada se encuentra en forma insoluble formando cuerpos de inclusión.

Bibliografía

- Beguín P. and Eisen H. (1978) Purification and partial characterization of three extracellular cellulases from *Cellulomonas* sp. *Eur. J. Biochem.* 87:52-531
- Gutiérrez-Nava, A. (2003). Aislamiento, caracterización y expresión del gen *celcflB* de *Cellulomonas flavigena* que codifica para una endoglucanasa. Tesis de doctorado. Depto. De Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN
- Gutiérrez-Nava, A. (1997) Identificación de las glucanasas de *C. flavigena* creciendo en diferentes Fuentes de carbono. Tesis de maestría. Depto. de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN.