

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE DOS CELULASAS DE 70 Y 120 kDa PRODUCIDAS POR *Cellulomonas flavigena*.

Ma. Teresa Mejía Castillo y Jaime Ortega López. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV IPN. México D.F. Fax. 57473800 ext. 4305 jortega@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, celulastas, purificación.

Introducción. Las celulastas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos de la celulosa (1). Estas enzimas están constituidas al menos por un dominio catalítico y otro responsable de la unión al sustrato, unidos por pequeñas regiones llamadas "linkers" (2). Para demostrar que las celulastas de *C. flavigena* con afinidad a celulosa son enzimas modulares, se purificaron y caracterizaron dos proteínas con afinidad a celulosa cristalina de 70 y 120 kDa.

Metodología. *C. flavigena* se cultivo en Avicel (celulosa microcristalina), como única fuente de carbono y las proteínas que se unieron fuertemente al Avicel (CBPs), se eluyeron con etilenglicol (EG). Después de eliminar el EG las proteínas se sometieron a una cromatografía de intercambio iónico en una columna UnoQ1 y las fracciones conteniendo las celulastas de 70 y 120 kDa se sometieron a una cromatografía de afinidad (Cibacron Blue). Estas celulastas se sometieron a una digestión controlada con α -quimotripsina a 37°C y pH 7.5, la reacción se inhibió por la adición de PMSF a una concentración final de 1 mM, los productos generados se interaccionaron con Avicel y se analizaron en geles de poliacrilamida.

Resultados y Discusión. La Fig.1. muestra las dos proteínas con un alto grado de purificación. después de la columna de afinidad. El Panel (A), muestra la CBP70 y el Panel (B), la CBP120. Los resultados obtenidos en la proteólisis limitada de la CBP70 se muestran en la Fig.2 Panel A, se muestra el fragmento de la proteína no unido Avicel. Carril 1: muestra al tiempo 0, Carril 2, 3, 4 y 5 muestras tomadas a los 60, 90, 120 y 360 minutos respectivamente.

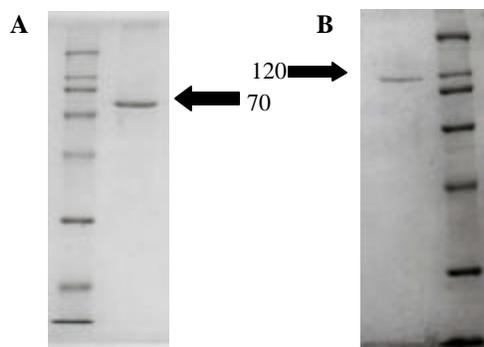


Fig.1. Análisis en geles de poliacrilamida de las proteínas purificadas.

El panel B, muestra la evolución de la proteólisis. Los Carriles: 1,2,3,4,5,6,7 y 8 son muestras tomadas a los 15, 30, 45, 60, 90, 150, 180 y 360 minutos respectivamente. Los tres fragmentos generados: de 59 kDa, 13 y 14 kDa correspondientes al dominio catalítico y al dominio de unión a celulosa CBD respectivamente. A diferencia de la CBP70, la proteólisis de la CBP120 generó cinco fragmentos que sugieren que esta proteína consta de más de dos dominios.

Conclusiones. Se lograron purificar dos CBPs 70 y 120 kDa. por cromatografía de intercambio iónico y afinidad.

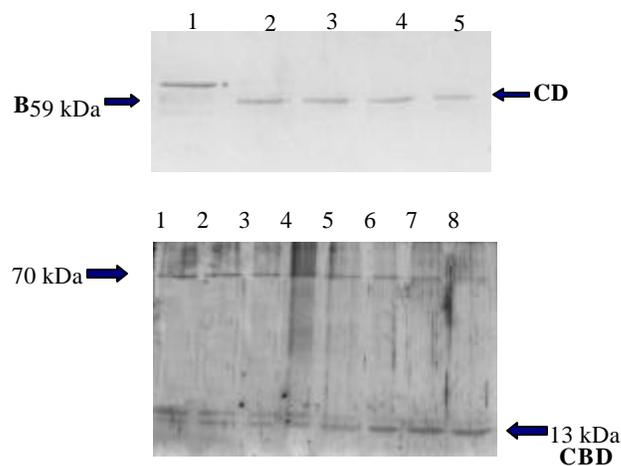


Fig.2. Análisis electroforético de los productos de proteólisis. Panel (A), identificación del CD. Panel (B), identificación del CBD.

La CBP70 efectivamente está constituida por dos dominios, un dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa mientras que la CBP120 está constituida por más de dos dominios.

Agradecimiento. Al CONACYT por el financiamiento del proyecto 26309-B otorgado a JOL y por la beca concedida a MTMC

Bibliografía.

- Warren, R. (1996) Microbial hydrolysis of Polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol (50): 183-212.
- Gilkes, N., Kilburn D., Miller, R. and Warren R. (1989). Structural and Functional Analysis of a Bacterial Cellulase by Proteolysis. Vol (264): 17802-17808.