

PURIFICACION DE UNA ENZIMA DE *Cellulomonas flavigena* Y SU CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL.

Odilia Pérez Avalos y Teresa Ponce Noyola
operez@mail.cinvestav.mx tel.57477000 ext. 4318

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN
Av. IPN No 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F. 07000

Palabras clave: *C. flavigena*, celulosa, xilanasa.

Introducción. Los residuos lignocelulósicos son degradados por un complejo enzimático formado por celulasas, hemicelulasas, ligninasas entre otras. Existe gran interés biotecnológico por las endoglucanasas y xilanasas debido a que estas enzimas tienen aplicación en la industria textil y papelería respectivamente (1). El sistema enzimático de *Cellulomonas flavigena* produce celulasas y xilanasas simultáneamente. El objetivo de este trabajo es purificar y caracterizar parcialmente una de las enzimas que forman parte de este complejo multienzimático.

Metodología. La producción de enzimas por *C. flavigena* se efectuó en matraz Ferbach de 2800 ml con 1000 ml de medio mineral, biotina y tiamina como factores de crecimiento y 1% de bagazo de caña como fuente de carbono e inductor. Se incubó a 37 °C, 200 rpm por 48 h. El sobrenadante se recuperó por centrifugación (10000 rpm, 10 min a 4°C); se concentró por ultrafiltración (Amicon) a través de una membrana con límite de exclusión 10 kDa. Las proteínas se precipitaron con acetona (3:1) y la pastilla se resuspendió en regulador Tris-HCl pH 7.2. La separación se efectuó por filtración en gel con Bio-Gel P-100 (Bio-Rad), se eluyó con regulador Tris-HCl 50 mM pH 7.2. La proteína parcialmente purificada se pasó por una columna de hidroxilapatita (Bio-Rad), se eluyó con regulador de fosfatos 5 mM suplementado con 200 mM de KCl (pH 6.8). Se midió proteína por el método de Bradford, las diferentes fracciones proteicas se colectaron y liofilizaron. Se les midió actividad de celulasas y xilanasas (2). A la enzima purificada se le estimó su peso molecular por electroforesis en gel (3); actividad celulolítica y xilanolítica en gel, se determinó punto isoelectrico y reacción de glicoproteína (4) así como temperatura y pH óptimos.

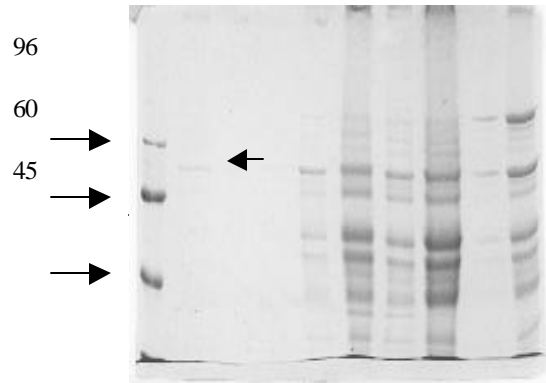
Resultados y discusión. La enzima purificada mostró actividad tanto de celulasa como de xilanasa. En carboximetilcelulosa (CMC) mostró una V_{max} de 18.45 UI/mg y K_m de 0.16 mg CMC/ml; así mismo, como celulasa su pH óptimo fue de 6 en regulador citratos fosfatos. Al evaluarse como xilanasa su V_{max} fue 50.24 UI/mg y una K_m de 0.72 mg de xilana/ml. En estas condiciones su pH óptimo fue de 9 usando regulador Tris-HCl. Además mostró una temperatura óptima de 50°C. Esta condición favorece su uso en la industria de pulpa y papel; sin embargo, la actividad celulolítica podría aún estar presente.

Por otro lado su peso molecular aproximado fue de 70 kDa (Fig. 1), con un pI de 4.3. Los datos obtenidos indican que esta glicosilhidrolasas pertenece a la familia 10 donde su característica principal es xilanolítica pero también tienden a hidrolizar celulosa en contraste con aquellas enzimas de la familia 11 de bajo peso molecular las cuales hidrolizan exclusivamente xilana (5). Por lo que no es sorprendente que la enzima purificada de alto peso molecular presente actividades de celulasa y xilanasa.

Conclusiones. Los resultados obtenidos sugieren que la enzima purificada es una β -1-4 glucanasa que corresponde a la familia 10 las cuales hidrolizan mas eficientemente xilana que celulosa.

kDa A B C D E F

Fig. 1. Diferentes pasos de purificación de la enzima purificada de *C. flavigena*. A) Marcador de peso molecular, B) Enzima Pura, C) Paso por hidroxilapatita, D) Pasos por Biogel, E) Precipitado con acetona, F) Extracto crudo. Electroforesis en gel (10%) en condiciones desnaturizantes. (tinción



con azul de Coomassie.

Agradecimientos. Este trabajo recibió apoyo del CONACYT con el proyecto 28784-B.

Bibliografía.

1. Sreenath, H K., Shah, A B., Yang, V W., Gharia, M M., Jeffries, T W. (1996). Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. *J. of Ferment. & Bioeng.* 81 (1) 18-20.
2. Pérez-Avalos, O., Ponce-Noyola, T., Magaña-Plaza, I. & De la Torre, M. (1996). Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:405-409.
3. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
4. Chaudhary, P. & Deobagkar, D. N. (1997). Purification and characterization of xylanases from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25:127-133.
5. Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R., Withers, S. & Rose, D. 1998. Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase Cex from *C. fimi* through crystallography and mutation. *Biochemistry* 37:4751-4758.