

PURIFICACION DE UNA XILANASA DE LA CEPA MUTANTE DE *Cellulomonas flavigena* PN-120 Y SU COMPARACIÓN CON SU SIMILAR DE LA CEPA SILVESTRE

Ma. Aurora Martínez Trujillo, Odilia Pérez Ávalos y Ma. Teresa Ponce Noyola

Centro de Investigación y Estudios Avanzados – IPN

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México, D. F.

C.P. 07000. Fax 57 47 70 00 ext. 4305

e-mail: auro_mt@yahoo.com

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena* PN-120, xilanasas, purificación.

Introducción. Las xilanasas son un conjunto de enzimas capaces de degradar a la xilana. Son producidas por organismos de diversos tipos, de entre los que destacan los hongos y las bacterias (1). Estas enzimas tienen un gran potencial biotecnológico razón por la cual es importante llevar a cabo estudios sobre su biosíntesis, regulación y actividad. *Cellulomonas flavigena* PN-120 es una mutante hiperproductora de xilanasas (2), sin embargo se conoce poco sobre las características bioquímicas de este complejo enzimático. Así mismo se ha reportado que las xilanasas están estrechamente relacionadas con las celulasas. Por esta razón, resulta necesario llevar a cabo una purificación de cada uno de estos sistemas enzimáticos para su posterior caracterización. El objetivo de este trabajo es purificar una de las xilanasas de la cepa mutante y su equivalente en la cepa silvestre, para que, al hacer la comparación de sus características bioquímicas, sea posible determinar si existe alguna diferencia entre ellas provocado por la mutación.

Metodología. El extracto enzimático de cada cepa fue obtenido a nivel reactor, utilizando bagazo de caña al 1% como fuente de carbono, y un medio mineral formulado con sales grado industrial (2). Se separó el bagazo residual por filtración y la biomasa por centrifugación, a 5000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se concentró por ultrafiltración a través de una membrana Amicon PM-10. El extracto crudo concentrado de cada cepa se sometió a filtración en gel, en una matriz de Bio Gel P100 (Bio Rad), eluyendo con regulador Tris-HCl 25 mM pH 7.2, a 0.1 ml/min. Las fracciones que formaban un pico con actividad xilanólítica se hicieron pasar por una matriz de Bio Gel A5, equilibrada con Tris-HCl 25 mM de pH 7.2, a 0.25 ml/min. A cada una de las fracciones eluidas de cada matriz se les determinó proteína, D.O. 280 nm y actividad xilanólítica. Su peso molecular se determinó por SDS-PAGE, utilizando geles al 10%. Se les determinó actividad sobre xilana y CMC, sobre geles de acrilamida. Su punto isoeléctrico se obtuvo con el equipo Mini Cell 111 (Bio Rad). Ambas xilanasas se caracterizaron bioquímicamente, determinando sus parámetros cinéticos al actuar sobre xilana de abedul como sustrato. Sobre ésta última se determinaron también sus productos de hidrólisis.

Resultados y discusión. Las xilanasas purificadas de cada una de las cepas, tienen un peso molecular aproximado de 56 KDa (Fig. 1). Presentan actividad sobre xilana y CMC en geles de poli(acrilamida). Su temperatura óptima es de 55°C y

su pI es 6.14. La xilanasas de la cepa silvestre (Xil-56-CS), presenta su actividad máxima a pH 6.5, mientras que la de la cepa mutante (Xil-56-PN120), lo hace a pH 9.5. Se observó un efecto importante del regulador utilizado sobre la actividad de la enzima. Existen diferencias en cuanto a los parámetros cinéticos, tanto en la Vmax (5.8 UI/mg para la Xil-56-CS y 26 UI/mg para la Xil-56-PN120) como en la Km (1.2 mg/ml para la Xil-56-CS y 0.4 mg/ml para la Xil-56-PN120). Ambas enzimas liberan, como productos de hidrólisis, xilobiosa y xilooligosacáridos superiores (Fig. 2).

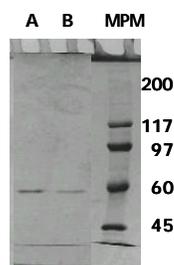


Fig. 1 SDS-PAGE de las xilanasas purificadas.

A: Xil-56-CS
B: Xil-56-PN120.

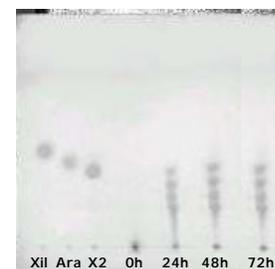


Fig. 2 Cinética de productos de hidrólisis de la Xil-56-PN120, utilizando como estándares xilosa (Xil), Arabinosa (Ara) y Xilobiosa (X2).

Conclusiones. Las Xil-56-CS y Xil-56-PN120 tuvieron un comportamiento muy parecido en cuanto a peso molecular aproximado, pI y productos de hidrólisis. A pesar de tener la misma temperatura óptima, la Xil-56-PN120 es menos estable a temperaturas elevadas y más sensible a cambios bruscos de temperatura. Se observó un cambio importante en cuanto a su pH óptimo, lo cual nos sugiere que la Xil-56-PN120 podría ser utilizada más fácilmente en procesos industriales que trabajan a pH's alcalinos, como en el caso del bioblanqueo de la pulpa y el papel. Los productos de hidrólisis liberados sugieren la clasificación de estas enzimas como endoxilanasas.

Agradecimientos

Al CONACYT y a los proyectos CONACYT 28784-B y SIHGO/97-781, por el apoyo económico.

Bibliografía.

1. Neeta, K., et. al., 1999. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases". FEMS Microbiology Reviews. 23:411-456.
2. Ponce, Noyola T. & De la Torre, M. 1995. "Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse". Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:709-712.