

### PROTEINAS BIFUNCIONALES DE *Cellulomonas flavigena*.

Odilia Pérez Avalos<sup>1</sup>, Luis Miguel Salgado Rodríguez<sup>2</sup> y Teresa Ponce Noyola<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. IPN 2508, col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. cp 07360. Fax 57473313. Tel 57473800 ext. 4318.e-mail:oaibarra@yahoo.com.mx. <sup>2</sup>CICATA-IPN. Cerro Blanco 141. Col. Colinas del Cimatario, Querétaro, Qro.

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, xilanasa, celulasa, AMPc.

**Introducción.** La holocelulosa es una fuente de energía renovable por naturaleza. La pared celular de las plantas formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina son hidrolizadas por un complejo enzimático de glucanasas (1). Actualmente existe un gran interés en la degradación de este polisacárido para obtener azúcares fermentables y usarlos para obtener biocombustibles (2). Para la aplicación de los biocatalizadores es importante conocer su potencial catalítico y los factores que intervienen en la regulación de su biosíntesis.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de las proteínas extracelulares de *C. flavigena* creciendo en bagazo de caña y en presencia de glucosa o AMPc. Introducción.

**Metodología.** *Cellulomonas flavigena* se creció por 24 h, a 37°C y 150 rpm en medio mineral, bagazo de caña 1%, tiamina (1 mg/L) y biotina (10 µg/L) como factores de crecimiento. La expresión de proteínas se realizó en 3 reactores (Sixfors) conteniendo 200 mL de medio mineral, 1% de bagazo de caña, operado a 600 rpm, 37°C y 1 vvm. Un reactor se usó como control. Durante la fase exponencial (13 h) se adicionó a un reactor 10 mM de glucosa y a otro 0.05 mM de AMPc. Se tomó una muestra a las 24 y 40 h de edad del cultivo. El sobrenadante se recuperó por centrifugación y se concentró 10 veces en un ultrafiltro con membrana de 30 kDa de corte. En el extracto crudo concentrado se determinó actividad de xilanasa y celulasa, y proteína (3). Con los extractos enzimáticos crudos, se realizaron SDS-PAGE, las proteínas se renaturalizaron para los zimogramas de actividad de celulasa y xilanasa. Como sustrato se usó 0.01 % carboximetilcelulosa (Sigma) y 0.01 % xilana acoplada a azul de remazol (Sigma). Los geles se incubaron a 50°C, 24 h, pH 7.

**Resultados y Discusión.** El patrón electroforético de los extractos proteicos de 24 y 40 h de *C. flavigena* creciendo en bagazo de caña, no mostraron cambios significativos, observándose una amplia gama de proteínas (Fig. 1A). Con la adición de glucosa, el perfil proteico fue muy difuso, ya que se ha reportado que en *C. flavigena* la glucosa reprime la síntesis de las glucanasas. Por otra parte, en los extractos donde se adicionó AMPc, las proteínas se manifestaron con mayor claridad respecto al control (Fig 1A). En las 3 condiciones probadas se observaron claramente 2 proteínas de alto

peso molecular, que corresponden a 127 y 137 kDa. Estas mostraron actividad de celulasas (Fig. 1B) y de xilanasas (Fig. 1C) en los zimogramas.

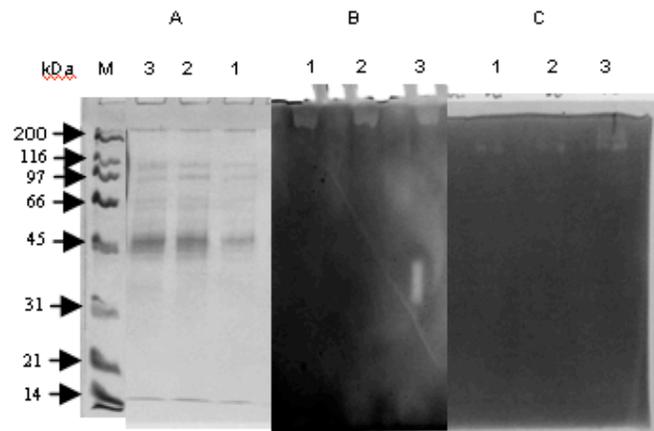


Fig. 1 Expresión de las proteínas de *C. flavigena* creciendo en bagazo de caña, a las 13 h se adicionó: 1) 10 mM glucosa, 2) control, 3) 0.05 mM AMPc.

Estos resultados muestran que *C. flavigena* produce en bajos niveles, proteínas aun en presencia de 10 mM de glucosa y el AMPc estimula esta producción. Las proteínas de alto peso molecular son bifuncionales y pueden estar en forma constitutiva para iniciar la degradación de la celulosa

**Conclusiones.** *C. flavigena* produce constitutivamente proteínas de alto peso molecular con actividad aun en presencia de glucosa que es un represor del sistema.

**Agradecimientos.** Este trabajo forma parte del proyecto 45678-Z del CONACYT.

#### Bibliografía.

1. Demain AL, Newcomb M, Wu JHD. (2005) Cellulase, Clostridia, and Ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:124-154.
2. Howard RL, Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J. Biotechnol.* 2:602-619.
3. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.