



## EFFECTO DEL AMPc EN LA BIOSINTESIS DE LA CELOBIOHIDROLASA DE *Cellulomonas flavigena*.

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

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería<sup>1</sup>, Departamento de Bioquímica<sup>2</sup>. CINVESTAV-IPN. Av. IPN 2508, col. San Pedro Zacatenco, México, D. F. cp 07000. Fax 50613313. Tel 506138000 ext. 4318. e-mail: oaibarra@yahoo.com.mx.

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, celobiohidrolasa, AMPc.

**Introducción.** El sistema celulolítico de *Cellulomonas flavigena* está formado por glucanasas del tipo endo, exo que participan en la degradación de los residuos hemicelulósicos. La celobiohidrolasa (CBH; EC 3.2.1.91) es una enzima que hidroliza oligosacáridos cortos liberando principalmente celobiosa. En sistemas enzimáticos inducibles de bacterias y hongos el AMPc controla la velocidad de formación de algunas enzimas (1, 2). El objetivo de este trabajo es determinar el efecto que tiene el AMPc sobre la biosíntesis de la CBH de *C. flavigena* al crecer en bagazo de caña.

**Metodología.** *C. flavigena* se creció en medio mineral (MM), suplementado con 1% (p/v) de glicerol, 1 mg/L tiamina y 10 µg/L biotina, por 24 h a 37°C y 150 rpm. Las bacterias se lavaron 2 veces con NaCl 0.85% estéril, posteriormente se usaron en una relación al 10% (v/v) para inocular el reactor. La producción de la CBH se realizó en un reactor Sixfors con 200 ml de MM y 1% de bagazo de caña, operado a 600 rpm, 37°C y 1 vvm. Durante la fase exponencial (13 h) se adicionó a diferentes reactores 10 mM de glucosa (Baker); 0.05 mM de AMPc (Sigma), 0.05 mM de 8-Br-AMPc (Sigma) o 1 mM de teofilina (Sigma), con sus respectivos controles. Después de la adición, se tomaron muestras cada 2 h hasta las 24 h de cultivo, posteriormente se tomaron cada 4 h hasta las 48 h. El bagazo residual se separó por filtración, el sobrenadante se recuperó por centrifugación (5000 rpm, 4°C, 10 min). Se determinó la actividad de CBH (3) y proteína por el método de Bradford (4). Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

**Resultados y Discusión.** *C. flavigena* a las 17 h de cultivo produce 50 UI/mg de CBH, utilizando bagazo de caña como fuente de carbono. Cuando se adicionó 10 mM de glucosa a un cultivo con bagazo de caña, la actividad enzimática, a las 15 h, fue de 12 UI/mg. Esta disminución pudo ser causada por represión catabólica. La actividad recuperó su nivel similar al del control cuando se consumió la glucosa, a las 21 h de cultivo.

Cuando se adicionó simultáneamente 0.05 mM de AMPc y 10 mM de glucosa no se observó disminución en la actividad de CBH, ya que ésta fue de 54 IU/mg a las 15 h de cultivo, lo que apoya la hipótesis de que el efecto observado es similar a la represión catabólica. Cultivos crecidos en bagazo de caña, a los que se les adicionó únicamente 0.05 mM de AMPc, mostraron una actividad de CBH de 56 UI/mg (15 h). Estos resultados sugieren que el AMPc está actuando como un activador y que probablemente, evita la represión causada por glucosa sobre la síntesis de esta enzima. Se llevaron a cabo experimentos utilizando teofilina (que inhibe las fosfodiesterasas protegiendo el AMPc endógeno), los resultados favorecen nuestra hipótesis sobre la importancia del AMPc como desrepresor del sistema celulolítico. La biosíntesis de celobiohidrolasa de *C. flavigena* está sujeta a represión catabólica, donde el intermediario de esta regulación es el AMPc. Actualmente estamos caracterizando una proteína que podría estar mediando la represión catabólica en un operón de glucanasas.

**Conclusiones.** La biosíntesis de celobiohidrolasa extracelular de *C. flavigena* está sujeto a un mecanismo de represión-activación regulado por el AMPc.

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

### Bibliografía.

1. Bostford L (1981) Cyclic nucleotides in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 45:620-642.
2. Pall L. (1981) Adenosine 3', 5'-phosphate in fungi. *Microbiol. Rev.* 45:462-480.
3. Ohmiya K & Shimizu S (1988) Cellobiosidase from *Ruminococcus albus*. In *Methods in Enzymology* Vol. 160. Edited By Wood W & Kellogg S. Academic Press, INC.
4. 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.