



IDENTIFICACION DE XILANASAS EN EL PROTEOMA EXTRACELULAR DE *Cellulomonas flavigena* PN-120

^aIleana Vera Reyes, ^aAna C. Ramos Valdivia, ^bLuis M. Salgado, ^aMa. Teresa Ponce Noyola. CINVESTAV-IPN, ^aDpto. Biotecnología y Bioingeniería y ^bDpto. Bioquímica. Av. Instituto Politécnico Nacional #2508 Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360. México, D.F. Tel. 5061 3800 ext. 4318. anaelivera@yahoo.com.mx
Palabras clave: proteoma, xilanasas; Cellulomonas flavigena PN-120.

Introducción. En los últimos años, el uso biotecnológico de las xilanasas ha crecido notablemente. En los 80's las xilanasas empezaron a ser utilizadas para la preparación de alimento para animales, en las industrias textiles y papeleras, etc. Actualmente, las xilanasas y las celulasas, junto con las pectinasas, ocupan el 20% del mercado de producción de enzimas en el mundo. El uso de las xilanasas hace necesario la mejora genética de microorganismos (1). *Cellulomonas flavigena* es una bacteria capaz de crecer en diferentes fuentes de carbono y producir xilanasas, celulasas y amilasas (2). La fuente de carbono tiene un efecto importante en la producción de estas enzimas. La mutante PN-120 presenta cuatro veces más actividad de xilanasas que la cepa silvestre creciendo en bagazo de caña, aún en presencia de altas concentraciones de glucosa. Esta mutante es un buen candidato para la producción de xilanasas, sin embargo no se conoce el cambio ocurrido en ella, que expliquen esta sobreproducción. Por lo anterior se propone identificar, mediante una separación en electroforesis bidimensiones, la(s) xilanasas que fueron modificadas o presenten mayor actividad con respecto a la cepa silvestre, y clonar el gen respectivo para su posible caracterización y sobreexpresión en un microorganismo recombinante.

Metodología. *C. flavigena* silvestre y PN-120 se hicieron crecer en medio mineral adicionado con biotina (10 µg/l) y tiamina (1mg/l). Como fuentes de carbono se utilizó bagazo de caña y glucosa al 1 %. Se obtuvo el sobrenadante de los cultivos los cuales se precipitaron con TCA, posteriormente se resuspendió y cuantificó la proteína con el 2-D Quant Kit (Amershan Bioscience). Se llevo a cabo un isoelectroenfoco en geles ReadyStrips IPG Strips de 11cm, pH 4-7 (BioRad), posteriormente se llevó la segunda dimensión mediante una electroforesis SDS-PAGE en gradiente de 8-16 %. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. La concentración de proteína cargada para cada gel fue aquella que se precipitó en el mismo volumen de muestra utilizado para cada condición. Se realizaron zimogramas para detectar actividad enzimática de xilanasas (Mackenzie y Williams, 1984).

Resultados y discusión. Se llevaron a cabo las electroforesis en 2D de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas mutante y silvestre crecidos en bagazo de caña o glucosa. Comparando los cuatro patrones entre sí, no hemos detectado algún cambio cualitativo significativo en el patrón de la cepa mutante crecida en bagazo de caña (Fig. 1). Analizando los zimogramas realizados para estos

geles se observaron halos de hidrólisis muy similares. Lo anterior sugiere que son las mismas proteínas, pero no descartamos que haya diferencia en cuanto a la cantidad de proteína presente e incluso en la actividad específica de algunas de ellas.

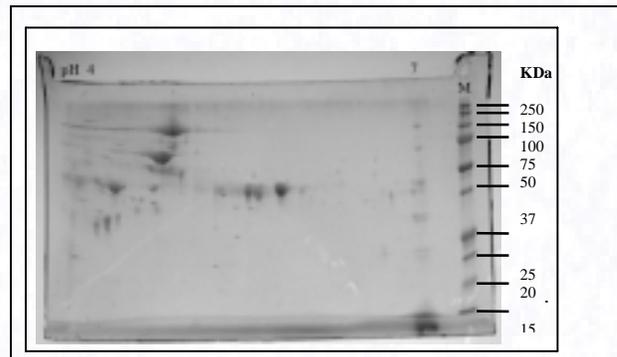


Fig. 1. Patrón electroforético de las proteínas extra-celulares de la cepa PN-120 de *Cellulomonas flavigena* crecida en bagazo de caña.

Conclusiones. La cepa mutante PN-120 tiene alterada la expresión de sus proteínas extracelulares, ya que presenta el mismo patrón electroforético tanto en un sustrato represor (glucosa) como en el inductor (bagazo de caña). Comportamiento que no se encuentra en la cepa silvestre analizada bajo estas mismas condiciones.

Agradecimiento. Al CONACYT (45678-Z) por el apoyo recibido para la realización de este proyecto. Ileana Vera Reyes es becario CONACYT.

Bibliografía.

1. Ponce-Noyola T., de la Torre M. (1995) Isolation of a high specific-grow-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Appl Microbiol Biotechnol*; 42:709-712.
2. Chaudhary P. and Deobagkar D. (1997) Purification and characterization of xylanases from *Cellulomonas* spp. NCIM2353. *Biotechnol Appl Biochem*; 25:127-33.
3. Mackenzie C. R. and Williams R.E. (1984) Detection of cellulose and xylanase activity in isoelectric-focused gels using agar substrate gels supported on plastic film. *Can. J. Microbiol.* 30:1522-1525.