

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL SISTEMA MULTI-CELULOLÍTICO DEL ORGANISMO AERÓBICO *Myxobacter* Sp. AL-1

Norma Ramírez, Claudia Avitia, Alfredo Téllez y Mario Pedraza-Reyes¹
Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, A.P. 187, Guanajuato, Gto. CP. 36000, México. Fax (473) 2-00-06 ext. 8153
Correo electrónico: ¹pedrama@quijote.ugto.mx

Palabras Clave: *Myxobacter* Sp.AL-1, Sistema multi-celulolítico

Introducción. *Myxobacter* Sp. AL-1 es un organismo aeróbico Gram-positivo aislado del suelo que secreta al entorno, entre otras actividades, peptidasas, quitosanasas y celulasas que le permiten degradar bacterias y hongos y muy probablemente asimilar fuentes alternas de carbono, como quitosana y celulosa. Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo demostraron que dicho organismo es capaz de crecer en condiciones aeróbicas en medio mínimo conteniendo celulosa micro-cristalina como fuente única de carbono. En el presente trabajo se describen los avances tendientes a la caracterización molecular y bioquímica, así como de los aspectos fisiológicos que regulan la expresión de un sistema multi-celulolítico presente en *Myxobacter* Sp. AL-1.

Metodología. *Myxobacter* Sp.AL-1 se creció en extracto de levadura al 2% (YEA) en ausencia o presencia de avicel al 1% (YEA-1). El operón *cel9-cel48* se clonó generando un mini-banco de genes de *Myxobacter* Sp. AL-1 con fragmentos *EcoRI* de alrededor de 4 a 9 kpb en pBR322, el cual se introdujo a células competentes de *E. coli* DH5a. Se seleccionaron colonias transformantes con actividad celulolítica *in situ*. De esta forma se clonó un inserto de 6 kpb el cual se secuenció completamente por ambas cadenas. La enzima quitosanasasa-celulasa, Cel9 se purificó por métodos cromatográficos convencionales, Cel9 se purificó por FPLC. La proteína recombinante His₆-Cel48 se purificó mediante cromatografía de afinidad metálica.

Resultados y discusión. El análisis del patrón de la síntesis temporal de celulasas durante el crecimiento en medio YEA-1 de *Myxobacter* Sp. AL-1, reveló la presencia de al menos 5 celulasas con masas moleculares de 29, 32, 36, 50 y 67 kDa. Excepto por la expresión constitutiva de la enzima de 29 kDa, la síntesis de las demás celulasas ocurre de manera diferencial. La proteína de 32 kDa purificada a homogeneidad, además de degradar quitosana, mostró actividad sobre celo-oligosacáridos y sobre carboximetil-celulosa. Utilizando un enfoque molecular se clonó un fragmento de 6 kpb del genoma de *Myxobacter* Sp. AL-1, el cual contiene el operón *cel9-cel48*. El análisis de la secuencia mostró que dentro de *cel48* existe otro marco de lectura (denominado *celR*) que codifica para un regulador transcripcional del tipo AraC/XilR. La existencia de

secuencias palindrómicas ubicadas río arriba del codon de inicio del *cel9* sugieren que CelR podría participar en controlar *en trans* la expresión del operón *cel9-cel48*. *cel48* se expresó heterológicamente en *E. coli* y *Bacillus subtilis* y su producto se purificó a homogeneidad por HPLC. Adicionalmente, una construcción *his₆-cel48* se expresó en *E. coli* y se purificó a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad metálica. e 6 histidinas. El análisis comparativo de las secuencias primarias de Cel9 y Cel48, así como la especificidad de sustrato de las enzimas purificadas, revelaron que *cel9* codifica para una endo-celulasa en tanto que *cel48* codifica para una exo-celobiohidrolasa con capacidad para degradar celulosa micro-cristalina. El análisis del posible sinergismo existente entre las celulasas hasta ahora caracterizadas nos permitirá avanzar en el entendimiento del mecanismo mediante el cual *Myxobacter* Sp.AL-1 cataliza la degradación de la celulosa.

Conclusiones. *Myxobacter* Sp.AL-1 produce al menos 6 celulasas en diferentes etapas de su ciclo de vida. Tres de ellas, purificadas a homogeneidad, mostraron diferencias no solo a nivel de su estructura primaria sino en cuanto a sus propiedades bioquímicas y especificidad de sustratos.

Agradecimientos: Trabajo financiado por CONACyT, convenios 0462P-N y 31767-N a MPR

Bibliografía.

- 1.-Pedraza-Reyes, M., Gutierrez Corona, F . (1997). *Arch. Microbiol.* 168:321-327.
- 2.-Avitia CI, Castellanos-Juárez FX, Sánchez E, Téllez-Valencia A, Fajardo-Cavazos P, Nicholson W. and Pedraza-Reyes, M. (2000). *Eur. J. Biochem.* 267: 7058-7064.
- 3.-Téllez-Valencia, A., Sandoval-Carrillo, A. and Pedraza-Reyes, M. (2003). *Current Microbiol.* 46:307-310

