



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Identificación de glucanasas bifuncionales de *Cellulomonas flavigena* creciendo en bagazo de caña.

Odilia Pérez Avalos y Teresa Ponce Noyola

Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, México, D. F. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco 07300, D.F. operez@cinvestav.mx.

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, celulasas, xilanasas.

Introducción. En la degradación de la biomasa lignocelulósica participan varias glucanasas, el mecanismo y modo de acción depende de la naturaleza del biocatalizador (1). El sistema celulolítico y xilanolítico de *Cellulomonas flavigena* es inducido por bagazo de caña (2) y se ha reportado que produce proteínas bifuncionales (3). El objetivo de este trabajo es identificar las proteínas bifuncionales con actividad de celulasa y xilanasas de *C. flavigena* que se expresan al crecer en bagazo de caña.

Metodología. Las enzimas se produjeron en un reactor Sixfors con 400 ml de medio mineral, 1 % de bagazo de caña como sustrato e inductor a 37°C, 600 rpm y 1 vvm por 17 h. Se separó el paquete celular por centrifugación a 8000 rpm, 4°C, 10 min. Las proteínas extracelulares se precipitaron con TCA 10%, se lavaron con acetona y etanol al 70%. Se rehidrataron 100 µg de proteína con 200 µl de regulador. La primera separación se hizo por punto isoeléctrico (pI 4-7) usando una cámara protean IEF cell (BioRad). Posteriormente se realizó la segunda dimensión en geles de acrilamida 10%. Para identificar las proteínas se realizaron zimogramas en geles de agarosa 1 % incorporando para la actividad de celulasas CMC [1 mg/mL] y para xilanasas, xilana acoplada a azul de remazol (Sigma). Los geles se incubaron a 60 °C, 17 h y 6 h respectivamente. Las zonas de hidrólisis de CMC se identificaron con rojo Congo 0.1%.

Resultados. En los geles de actividad se observan al menos 12 halos de hidrólisis correspondientes a las proteínas de *C. flavigena* con actividad tanto celulolítica (Fig. 1A) como xilanolítica (Fig. 1B). Las proteínas están distribuidas en el intervalo de pI de 4-7 y con PM de 109 a 14 kDa (Tabla 1). Entre estas proteínas se identificó la proteína bifuncional de 49 kDa y pI de 4.3 con actividad de endo/celulasa y endo/xilanasas que previamente se había reportado (3). Es evidente que *C. flavigena* tiene la capacidad de producir proteínas bifuncionales con alto y bajo peso molecular, que le permiten hidrolizar el bagazo de caña y otros residuos con composición variable, liberando oligosacáridos cortos, disponibles para sustentar su crecimiento y producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas.

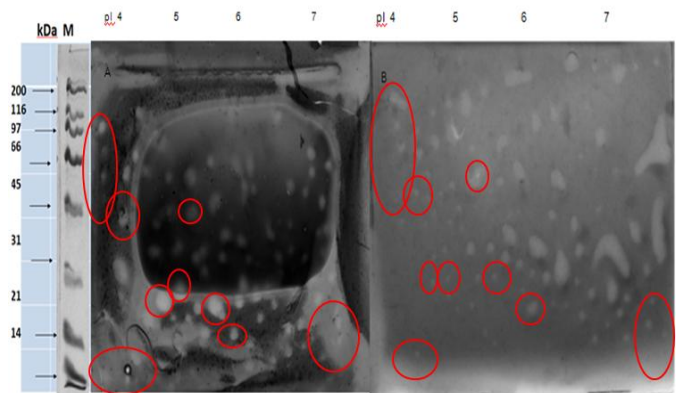


Fig. 1. SDS-PAGE 2D, zimograma de actividad de celulasas (A) y xilanasas (B) de las proteínas extracelulares de *C. flavigena*.

Tabla 1. Proteínas extracelulares de *C. flavigena* que presentaron halo de hidrólisis en CMC y xilana.

pI (pH)	PM (kDa)
4.0	109, 88, 68
4.3	49, 14
4.7	28
4.8	31
5.0	54
5.4	28
6.0	29
7.0	15, 27

Conclusiones. *C. flavigena* produce diversas proteínas bifuncionales con actividad de celulasa y xilanasas, inducidas con bagazo de caña.

Agradecimiento. Proyecto 104333 CONACYT.

Bibliografía.

- Gilbert HJ, Hazlewood GP (1993). Bacterial cellulases and xylanases. *J Gen Microbiol* 139:187-194.
- Sánchez-Herrera LM, Ramos-Valdivia AC, de la Torre M, Salgado LM, Ponce-Noyola T. (2007). Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. *Appl. Microbiol Biotechnol* vol (77):589-595.
- Pérez-Avalos O, Sánchez-Herrera M, Salgado LM, Ponce-Noyola T (2008). A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Curr Microbiol* 57:39-44.