



IDENTIFICACIÓN DE β -GALACTOSIDASA, β -FRUCTOFURANOSIDASA Y GLICOSIL TRANSFERASA DE *Cellulomonas flavigena* AL CRECER EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

IDENTIFICATION OF β -GALACTOSIDASE, β -FRUCTOFURANOSIDASE and GLYCOSILTRANSFERASE ENZYMES FROM *Cellulomonas flavigena* WHEN GROWN IN SEVERAL CARBON SOURCES

E. Solís-Badillo¹, L. Mayorga-Reyes², A. Azaola-Espinosa^{2*}, A. Gutiérrez-Nava²

¹Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán. C. P. 04960 México, D. F.

²Dpto. de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán. C. P. 04960 México, D. F.

Received September 4, 2013; Accepted December 31, 2013

Resumen

Cellulomonas produce una amplia variedad de glucanasas, entre estas las celulasas y hemicelulasas son las más sobresalientes por sus aplicaciones industriales. Sin embargo, ha mostrado la capacidad de crecer en sustratos diferentes a los derivados de residuos lignocelulósicos. *C. flavigena* creció lactosa, sacarosa y raftilosa. En lactosa y sacarosa la producción de células fue de aproximadamente 2 mg/mL y en raftilosa solo alcanzó 1 mg/mL. Se determinó la actividad hidrolítica en los extractos intracelulares y extracelulares correspondientes a las actividades de β -galactosidasa y β -fructofuranosidasa. La mayor actividad hidrolítica se encontró en los extractos intracelulares cuando se utilizó raftilosa como sustrato y disminuyó significativamente al utilizar lactosa. Los perfiles de proteínas de los distintos extractos intracelulares presentan gran cantidad de bandas en los distintos sustratos utilizados como fuente de carbono. Probablemente en cada de las fuentes estudiadas, la síntesis de enzimas intracelulares no esté regulada y se exprese todo el potencial de esta bacteria. Además se identificó la presencia del gen de la β -galactosidasa

Palabras clave: *Cellulomonas flavigena*, β -galactosidasa, β -fructofuranosidasa, bifuncionalidad.

Abstract

The genus *Cellulomonas* is a cellulose degrading bacteria which produce a wide variety of glucanases, mainly cellulases and hemicellulases with industrial applications. *C. flavigena* has the ability to grow on carbon sources that are not derived from lignocellulosic wastes such as lactose, sucrose and raftilose. In this study, when *C. flavigena* was cultured on lactose and sucrose, the cell production was approximately 2 mg/mL, and when was cultured on raftilose, it reached 1 mg/mL. The hydrolytic activity of β -galactosidase and β -fructofuranosidase enzymes were tested in the intra and extra cellular fractions where the highest activity was found in the intracellular fraction using raftilose as substrate, nevertheless using lactose as substrate the activity was significantly low. The protein profiles of the intracellular extracts presented great quantity of bands in the different substrates used as carbon sources of carbon. Probably the synthesis of intracellular enzymes is not regulated and the cell expresses its whole potential. In addition the presence of the gene β -galactosidase was identified.

Keywords: *Cellulomonas flavigena*, β -galactosidase, β -fructofuranosidase, bifunctionality.

1 Introducción

Cellulomonas tiene la capacidad de degradar los hidratos de carbono presentes en residuos agrícolas,

lo que implica la producción de una gran diversidad de enzimas que hidrolizan el almidón, hemicelulosa y celulosa.

*Corresponding author. E-mail: azaola@correo.xoc.uam.mx
Tel. 55-54-83-73-77

Las celulasas y hemicelulasas son las más reportadas ya que estas tienen varias aplicaciones industriales (Rajoka y Malik, 1999; Pérez-Avalos y Ponce-Noyola, 2002). Chaudhary y col. (1997) reportaron que algunas de estas enzimas son multifuncionales y poseen una estructura de multidominio, lo cual le confiere a la bacteria una adaptación muy versátil al medio ambiente. La multiplicidad de las actividades enzimáticas es el resultado de tres factores: la existencia de multigenes de la familia de las celulasas, glicosilación de los productos de genes de celulosa y la escisión de los productos de genes de celulosa producida por proteólisis del huésped (Wong y col., 1988).

Estudios previos han demostrado que *C. flavigena* produce una mayor cantidad de enzimas celulolíticas y xilanolíticas al crecer en un medio con bagazo de caña como única fuente de carbono; además, sus actividades enzimáticas son mayores en sustratos complejos, en contraste cuando crece en fuentes de carbono fácilmente metabolizables como glucosa, glicerol y xilosa entre otras, donde estas actividades se ven reprimidas. Belmares-Cerda y col. (2003) reportaron mayor actividad de tanasa extracelular cuando en *Aspergillus niger* creció en sustratos complejos. Las enzimas con actividad de glicosilhidrolasas (GHs) son reguladas por mecanismos de inducción/represión (Pérez-Avalos y col., 1996; Montes y col., 1998; Ponce-Noyola y de la Torre, 2001; Mayorga-Reyes y col., 2002; Gutiérrez-Nava y col., 2003; Sánchez-Herrera y col., 2007; Mejía-Castillo y col., 2008; Amaya-Delgado y col., 2010). La adición de AMP cíclico exógeno mostró una regulación positiva en la síntesis de celobiohidrolasa de *C. flavigena* al crecer en bagazo de caña (Herrera y col., 2009).

Otras actividades enzimáticas que han sido reportadas en *Cellulomonas* son celobiosa-fosforilasa, β -glucosidasa y aril- β -D-glucosidasa (Schmiz y col., 1983). En *Cellulomonas fimi* se presentaron 2 β -glucosidasas, sin embargo la enzima que se producía constitutivamente podía hidrolizar P-Nitrofenilglucósido (PNPG) pero no celobiosa, mientras que la otra puede hidrolizar tanto PNPG como celobiosa (Wakarchuk y col., 1984). No existen reportes en la literatura sobre las actividades de glicosil transferasas (GTs) en *C. flavigena*. Las GTs intervienen en la transferencia regioespecífica y estereoespecífica de varios azúcares donadores a una variedad de importantes biomoléculas incluyendo los glicanos, lípidos, péptidos y pequeñas moléculas (Chang y col., 2011). Entre las enzimas que pueden

presentar actividad GH y GT se encuentran las β -galactosidasas y las β -fructofuranosidasas (Roy y col., 2002). En un estudio previo, se observó que *C. flavigena* tiene un buen crecimiento en medios con lactosa y raftilosa como únicas fuentes de carbono, estos no son sustratos usuales para este microorganismo puesto que no son polímeros de reserva de las plantas, sin embargo tienen en común el tipo de enlace β -1,4 (Solís-Badillo, 2009). El objetivo del proyecto fue inducir la actividad de β -galactosidasa y β -fructofuranosidasa en *Cellulomonas flavigena* cuando se crece en diferentes fuentes de carbono y su posible bifuncionalidad de glicosil transferasas.

2 Materiales y métodos

2.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

C. flavigena CDBB-531 conservada a -20°C en medio BHI (Bioxon) con glicerol al 10%, fue activada en 30 mL de medio BHI, durante 24 h a 37°C y 180 rpm. Este cultivo se centrifugó a $6000 \times g$ durante 10 min, el paquete celular se lavó con solución salina isotónica (SSI) y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 30 mL de medio mineral, cuya composición en g/L es: NaNO_3 1.0, K_2HPO_4 1.0 y MgSO_4 0.05, con extracto de levadura 1.0 y fuente de carbono 1.0. El pH se ajustó a 7.0.

2.2 Cinética de crecimiento

Se prepararon 50 mL de medio con las diferentes fuentes de carbono: glucosa (Merck), raftilosa (Megafarma), lactosa (Merck), sacarosa (J.T. Baker) o fructosa (Merck) y se incubaron toda la noche con las condiciones antes mencionadas. Con estas células de inocularon 100 mL de medio fresco a una densidad óptica de 0.15 a una longitud de onda de 660 nm. Se tomaron 2 mL de muestra, se centrifugaron a $9,000 \times g$ durante 4 min, las células se utilizaron para medir crecimiento. Las muestras se tomaron cada 2 h durante las primeras 12 h y posteriormente cada 4 h hasta alcanzar la fase estacionaria. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.3 Determinación de biomasa

Las células se resuspendieron en 2 mL de agua destilada, la densidad óptica se midió en un espectrofotómetro Cary 50 Conc (Varian) a una

longitud de onda de 660 nm. La cantidad de biomasa, se determinó a partir de una curva estándar de densidad óptica vs peso seco realizada previamente. La tasa específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$) fue estimada durante la fase de crecimiento exponencial por regresión lineal del $\ln X/X_0$ (peso seco biomasa celular) vs tiempo (González y col., 2004).

2.4 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína en los extractos enzimáticos intracelulares y extracelulares se determinó con el reactivo Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó una curva estándar con albumina de suero bovino (Merck) cuyas concentraciones fueron de 1.2 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

2.5 Obtención de extractos enzimáticos

Una vez conocida la curva de crecimiento en cada sustrato, se realizaron nuevamente cultivos para recuperar las muestras en la fase exponencial. Estas fueron centrifugadas a 4,000 $\times g$ por 10 min para separar sobrenadante y paquete celular.

2.6 Extractos extracelulares

Las proteínas del sobrenadante fueron concentradas a 2 mL utilizando unidades de filtración Ultra-15 con membranas de 30 kDa (Millipore), el concentrado de 2 mL fue almacenado a -20°C para su posterior análisis.

2.7 Extractos intracelulares

Los paquetes celulares obtenidos de cada cultivo, se lavaron con SSI, se resuspendieron en 5 mL de agua inyectable y se tomó una alícuota de 1 mL (a una D.O. de aproximadamente 1), a esto se les agregaron aproximadamente 100 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm y se colocaron en un disruptor (Genie Scientific Industries) durante 3 min, a continuación se colocaron 2 min en hielo; se realizaron 4 ciclos. Las células lisadas se centrifugaron a 9 000 $\times g$ durante 20 min, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -20°C .

2.8 Actividades hidrolíticas

Los sustratos para medir la actividad fueron lactosa pH 7 y raftilosa pH 5.5, ambas al 2% en amortiguador de fosfatos 0.2 M. Para cada ensayo se mezclaron 25 μL de sustrato con 10 μL de muestra, se incubaron a 50°C

durante 20 min. Posteriormente, se agregaron 965 μL de agua y 1 ml de reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma) (Miller, 1959). Las muestras se hirvieron durante 5 min, se dejaron enfriar y se llevaron a un volumen de 5 mL, a continuación se leyeron a 550 nm. Se hicieron blancos para el extracto enzimático y el sustrato. Las actividades hidrolíticas en los extractos enzimáticos (intracelulares y extracelulares) se hicieron por triplicado. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de proteína cruda necesaria para liberar un mmol de azúcares reductores por minuto.

2.9 Actividad de glicosiltransferasa

Para determinar la actividad de transferasa se hicieron soluciones de lactosa y sacarosa al 30% en regulador de fosfatos 0.2 M, pH 7.0 para lactosa y pH 5.5 para sacarosa. Se tomaron 250 μL de extracto (intracelular o extracelular) y se colocaron con 250 μL de la solución concentrada a una temperatura de 50°C . Posteriormente, se tomaron muestras de 50 μL a las 0, 3, 6, 10 y 24 h. De estas muestras se tomó 1 μL , y se hizo una dilución 1:10, de aquí se tomaron 2 μL y estas se colocaron en placas de aluminio con sílica gel 60F254 (Merck), se eluyeron 2 veces con una mezcla de solventes (butanol, 2-propanol, agua 3:12:4). Posteriormente, se revelaron con una solución de anisaldehído a 100°C por 2 min.

2.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes con un gel concentrador al 5 % y el gel separador al 12% de acrilamida-bisacrilamida (Bio-Rad). Las condiciones de corrida fueron 30 min a 80 V y posteriormente 120 min a 110 V. La concentración de las muestras fue de 10 μg de proteína total, que fueron mezcladas con 5 μL de buffer de carga. Se empleó un marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa. El gel fue teñido con azul de Coomassie.

2.11 Análisis genómico

2.11.1 Extracción de DNA genómico

De un cultivo de 8 h de *C. flavigena* se tomaron 1.5 mL y se colocaron en un microtubo, se centrifugó a 8000 $\times g$ durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 480 μL de EDTA

(Promega) 50 mM y se agregaron 50 μL de lisozima (Sigma) (20 mg/mL), la mezcla se incubó 1 h a 37°C y se agitó suavemente cada 10 min. Después se centrifugó a 8000 \times g durante 2 min y se retiró el sobrenadante. Posteriormente, para la extracción de DNA se utilizó el kit Genomic DNA purification (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar la integridad del DNA y después se cuantificó en un NanoDrop (Thermo Scientific ND-2000 1-position).

2.11.2 Amplificación del gen β -galactosidasa por PCR

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen de la β -galactosidasa con los dominios conservados de diferentes microorganismos, a partir de los cuales, las regiones consenso se utilizaron para buscar en la secuencia reportada (GeneID:9144960), en el GenBank de *C. flavigena* DSM 20109 (gi:296127869). Forward: 5' TACCACTGGGACCTGCCGACG3' y reverse 5'GTAGCCCCGCACGTTCGACGCC3', como control positivo se utilizaron los primers forward: 5'GCGGCCTATCAGCTTGTGG3' y reverse: 5'CGCAGCGTTGCTGATCTGCGA3' que amplifican el gen rRNA 16s de *C. flavigena*. La mezcla contenía 20 ng de DNA molde, 1 μL de dNTP (Promega) (10 mM), 5 μL de buffer 10X con 20 mM MgCl_2 (Fermentas), 1 μL de cada uno de los primers (1 pmol/ μL), 1U Taq polimerasa (Fermentas) y agua a un volumen final de 50 μL . Las condiciones de reacción en el termociclador (Biometra T Gradient), fueron 94°C 5 min 1 ciclo y 30 ciclos a 94°C 1 min, 69°C 1 min, 75°C 2 min y finalmente un ciclo a 75°C 5 min.

2.11.3 Secuenciación

El producto amplificado se purificó a partir de un gel preparativo, utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), siguiéndose las instrucciones del proveedor. El fragmento purificado se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del IFC UNAM con un equipo de sistema capilar ABI Prism 3100.

2.12 2.11.4 Dot blot

A partir de DNA genómico de *C. flavigena* a una concentración de aproximadamente 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se hicieron 4 diluciones decimales seriadas. En un papel hybrid N+ (Amersham) de aproximadamente 6 x 2

cm se colocó 1 μL de cada dilución, se dejó secar y se fijó el DNA durante 2 h a 80°C.

El fragmento de ADN purificado y amplificado por PCR, se utilizó como sonda una vez marcado con el kit Biotin Deca Label DNA Labeling (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. La membrana se incubó durante 4 h a 37°C en 10 mL de solución de pre-hibridación (SSC 6X, Solución de Denhardt 5X, SDS 0.5% p/v y formamida 50% p/v). Posteriormente, se adicionó la sonda marcada a la solución de hibridación y se incubó con la membrana, en agitación a 37°C durante 12 h.

La membrana se lavó dos veces con 10 mL solución de lavado 1 (SSC 2X, SDS 0.1% p/v); cada lavado fue de 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron otros dos lavados con 10 mL de solución de lavado 2 (SSC 0.1X, SDS 0.1% p/v), cada uno de 20 min a 65°C. Para eliminar el exceso de solución, la membrana se colocó en papel filtro. Para revelar la membrana, se usó el kit Biotin Chromogenic Detection (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.13 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre las actividades enzimáticas de *C. flavigena* se realizó un análisis de varianza de una vía y se realizó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para determinar en cuál fuente de carbono se presentó una mayor actividad enzimática tanto intracelular como extracelular.

3 Resultados y discusión

3.1 Cinética de crecimiento

C. flavigena presentó un buen crecimiento en glucosa y sacarosa, en ambas fuentes de carbono la fase exponencial inició a las 4 h y aproximadamente a las 22 h dio inicio su fase estacionaria, con una producción de 2.3 mg/mL. En el caso de rafilosa y lactosa el crecimiento fue similar al inicio, sin embargo a las 14 h en rafilosa comenzó la fase estacionaria y tuvo una producción celular de 1 mg/mL; mientras que en lactosa siguió creciendo incluso a las 52 h donde la producción celular fue de 2 mg/mL. En fructosa, el crecimiento inició 10 h después del inóculo y a las 48 h se obtuvo una producción de 2.3 mg/mL (Fig. 1).

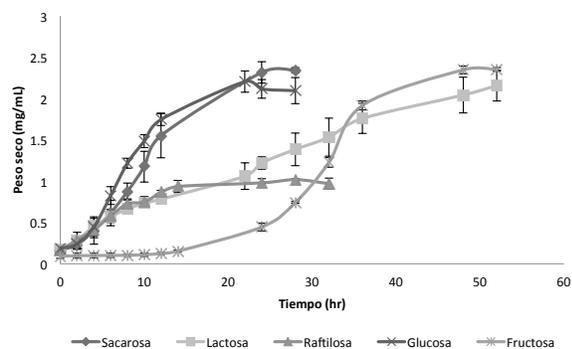


Fig. 1. Cinéticas de crecimiento de *Cellulomonas flavigena* en sacarosa, lactosa, raftilosa, glucosa y fructosa. Los datos se presentan como el promedio de tres experimentos diferentes, la barra de error representa la desviación estándar.

También, se determinaron las tasas de crecimiento (μ); sacarosa 0.143 h^{-1} , glucosa 0.163 h^{-1} y fructosa 0.122 h^{-1} . Mientras que en lactosa fueron de 0.038 h^{-1} y en raftilosa de 0.05 h^{-1} que se pueden relacionar con la capacidad de utilizar los sustratos anteriores. Rajoka (2004) con otra cepa de *C. flavigena* reportó tasas de crecimiento en varios azúcares simples y complejos semejantes a los reportados en este estudio.

Las diferencias mostradas en la Figura 1 y en las tasas de crecimiento pueden deberse al mecanismo por el que *C. flavigena* incorpora y utiliza las fuentes de carbono. En bacterias, el sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) es el más conocido; se han reportado 105 proteínas similares distribuidas en 87 organismos diferentes (Warner y Lolkema, 2003), por lo que cabe suponer que *C. flavigena* puede transportar las fuentes de carbono utilizadas mediante este sistema.

Los géneros de *Cellulomonas*, *Streptomyces* y *Bifidobacterium* pertenecen a la clase de las actinobacterias. Son bacterias Gram positivas con alto contenido de G+C y sus genomas contienen entre un 8 y 9% de genes que codifican para proteínas del transporte y metabolismo de carbohidratos (Abt y col., 2010; Parche y col., 2000; Parche y col., 2007). Todas ellas utilizan el sistema PTS para el transporte de azúcares.

Para que raftilosa y sacarosa sean usadas como fuente de carbono, es necesario hidrolizarlas, la enzima encargada de hacerlo es la β -fructofuranosidasa. Aunque se necesita la misma enzima, hay una gran diferencia en el crecimiento, esto podría estar relacionado con el tamaño de los

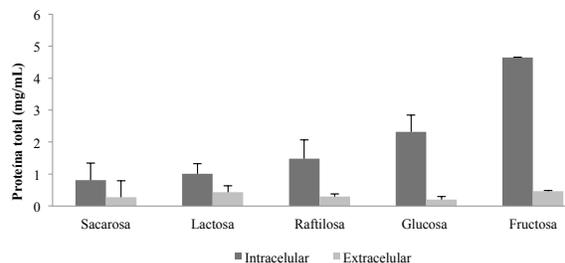


Fig. 2. Producción de proteínas totales intracelulares y extracelulares de *Cellulomonas flavigena*, al crecer sacarosa, lactosa, raftilosa, glucosa y fructosa.

azúcares ya que la sacarosa es un disacárido mientras que la raftilosa derivada de inulina tiene un grado de polimerización de 4 y 5 (Madrigal y Sangronis, 2007), probablemente esta estructura pueda interferir en la hidrólisis.

3.2 Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas totales extracelulares no muestra diferencias significativas en todos los caldos de fermentación estudiados. Sin embargo, las diferencias se presentan con las proteínas intracelulares (Figura 2) donde la concentración de proteínas de *Cellulomonas* en fructosa fue entre 2 y 5 veces más alta con respecto a los otros sustratos. Este resultado se debe probablemente a una fase de adaptación larga que se correlaciona con un estado de estrés, por lo que se expresa una alta concentración de proteínas. La secuencia del genoma de *C. flavigena* muestra que tiene cerca de 3700 genes que codifican para proteínas (Abt y col., 2010) y que en las condiciones de estrés, puedan ser expresadas gran cantidad de ellas para adaptarse al medio ambiente.

3.3 Actividades enzimáticas hidrolíticas

En la Figuras 3 y 4 se presentan las actividades enzimáticas de los extractos intracelulares y extracelulares con lactosa (Figura 3) y raftilosa (Figura 4) respectivamente como sustratos. Los extractos intracelulares de *C. flavigena* crecida en sacarosa, lactosa y raftilosa presentaron actividad de β -galactosidasa (Figura 3). Sin embargo, las actividades de β -fructofuranosidasa fueron hasta tres veces mayores para la hidrólisis de raftilosa. La actividad de β -fructofuranosidasa se puede inducir con sustratos como la sacarosa sin embargo, la actividad aumenta cuando el grado de polimerización del sustrato aumenta (Biedrzycka y Bielecka, 2004)

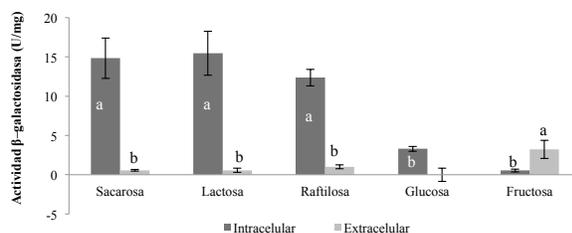


Fig. 3. Actividad de β -galactosidasa de los extractos intracelulares y extracelulares de *C. Flavigena* crecida en diferentes fuentes de carbono (sacarosa, lactosa, raftilosa, glucosa y fructosa). Los datos se muestran como la media de tres repeticiones \pm las desviaciones estándar, las unidades están dadas en U/mg. Letras diferentes en colores iguales indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

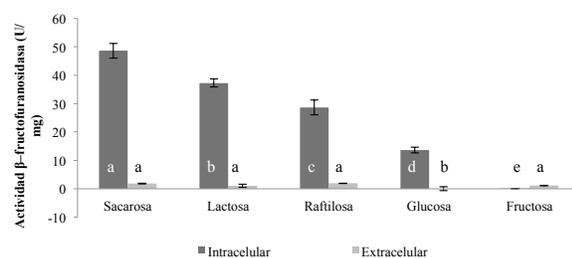


Fig. 4. Actividad de β -fructofuranosidasa de los extractos intracelulares y extracelulares de *C. Flavigena* crecida en diferentes fuentes de carbono (sacarosa, lactosa, raftilosa, glucosa y fructosa). Los datos se muestran como la media de tres repeticiones \pm las desviaciones estándar, las unidades están dadas en U/mg. Letras diferentes en colores iguales indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

(Figura 4). Para los extractos extracelulares las actividades encontradas fueron mínimas.

La lactosa generalmente es inductora de la actividad de β -galactosidasa; sin embargo, Pliego-Arreaga y col. (2013), reportaron que la lactosa actuó como inductora de las peroxidasas en *E. coli*. No obstante que no existen reportes de esta actividad en *Cellulomonas*, en el extracto proveniente de lactosa la actividad hidrolítica usando el mismo sustrato fue menor en un 50% que cuando se utilizó raftilosa como sustrato para la actividad hidrolítica de β -fructofuranosidasa (Figs. 3 y 4). Resultados similares se encuentran cuando se comparan las actividades provenientes de los extractos intracelulares para ambos sustratos en las figuras anteriores.

Estos resultados pueden parecer no consecuentes

con lo que señala la literatura que para un sustrato puede existir una enzima específica. Dao y col. (2013) reportan la actividad de inulinasa en tres glucoamilasas comerciales purificadas y señalan que esta actividad encontrada se debe seguir estudiando. Chaudhary y col. (1997), Pérez-Avalos y col. (2008) y Zhou y col. (2012) reportaron la multifuncionalidad de las enzimas hidrolíticas. En este caso es interesante señalar que estos sustratos tienen en común la unión beta entre la glucosa y el otro monosacárido (fructosa y galactosa).

En el caso de la β -fructofuranosidasa, se observó que en los extractos intracelulares provenientes de las fermentaciones con sacarosa y lactosa la actividad es mayor que en raftilosa, cuando se utilizó este azúcar para medir la actividad enzimática. Esto puede ser explicado porque en sacarosa se inducen β -fructofuranosidasas inespecíficas que pueden hidrolizar fructosidos con enlaces β -2,1 y β -2,6, entre las que se incluyen exo- β -fructosidasas (exoinulasas o exolevanasas) y 2,6- β -fructan-6-levanbiohidrolasas. Por el contrario, para los derivados de inulinas, como la raftilosa, solo se producen endo-inulasas específicas para enlaces internos β -2,1 (Muñoz-Gutiérrez y col., 2009). También, se puede suponer que esta enzima es constitutiva, ya que el extracto de células proveniente de glucosa presentó actividad de β -fructofuranosidasa (Figura 4).

Los extractos extracelulares, excepto glucosa, presentaron actividades hidrolíticas mínimas comparadas con las actividades intracelulares. Puesto que las enzimas inducidas en lactosa, raftilosa y sacarosa hidrolizan a ambos sustratos, se puede suponer que éstas tienen una especificidad de clase, es decir que para que la enzima actúe no depende del tipo de molécula sino del tipo de enlace (Koolman y Röhm, 2004).

3.4 Actividades de glicosiltransferasa

Bajo las condiciones usadas no se encontró actividad de transferasa en los extractos enzimáticos de *C. flavigena* crecida en los diferentes sustratos, lo que puede indicar que en ambos extractos las enzimas presentes solo tienen actividad hidrolítica. Abt y col. (2010) reportaron 17 genes para glicosiltransferasas al secuenciar el genoma de *C. flavigena* DSM 20109, pertenecientes a la familia 2, como β -1,3-glucan sintetiza que son frecuentemente encontradas en la familia GT. No obstante, cabe la posibilidad de que las condiciones de cultivo o la técnica usada para determinar esta actividad no sean las más adecuadas.

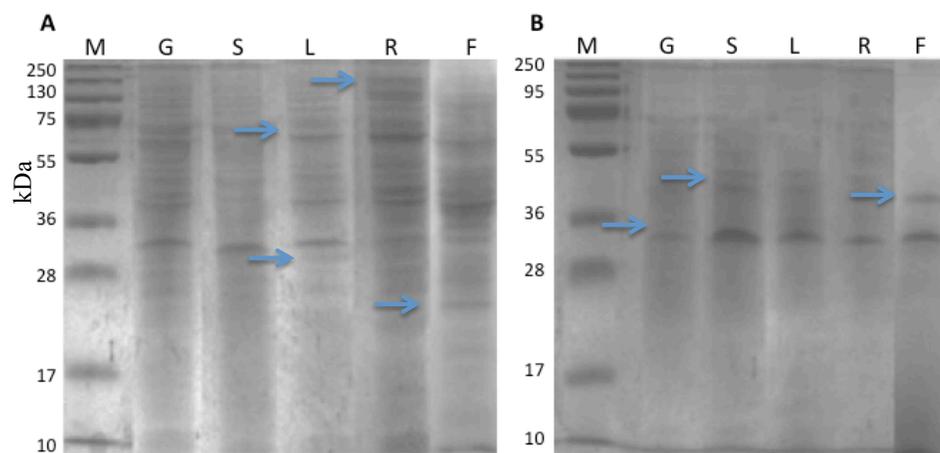


Fig. 5. Perfil proteico A) Intracelular B) Extracelular de *C. Flavigena* crecida en diferentes fuentes de carbono G-glucosa, S-sacarosa, L-lactosa, R-rafitilosa, F-fructosa.

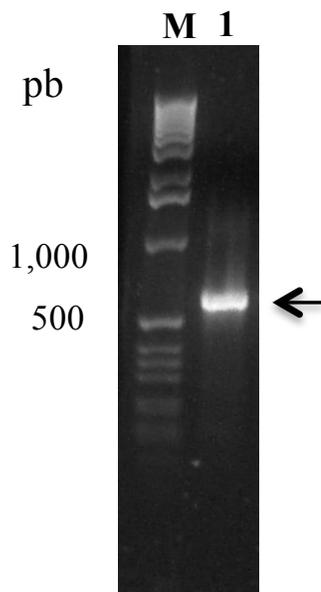


Fig. 6. Producto amplificado por PCR de aproximadamente 800 pb. M (marcador de peso molecular), 1 (producto amplificado).

Es preciso aclarar que para el caso de las β -galactosidasas, solo las que se encuentran en la familia GH2 tienen actividad de hidrólisis y de transferasa. GH2 β -galactosidasas predominantemente usan lactosa como sustrato y han sido frecuentemente caracterizadas en bacterias ácido-lácticas (BAL) y bifidobacterias aisladas de leche (Schwab *y col.*, 2011). BAL y bifidobacterias generalmente expresan

β -galactosidasas durante su crecimiento en medios con lactosa (Splechtina *y col.*, 2006, 2007; Tzortzis *y col.*, 2005; Vasiljevic *y Jelen*, 2002). El gen reportado en *C. flavigena* para β -galactosidasa se encuentra dentro de las glicosilhidrolasas en la familia 1 (Abt *y col.*, 2010).

3.5 Perfil proteico de los extractos crudos

Se conoce el perfil de la expresión de proteínas en *C. flavigena* cuando crece en residuos agrícolas (Gutiérrez-Nava, 1997). Sin embargo, en sustratos como fructosa, lactosa, sacarosa y rafitilosa no existe información. En la figura 5 A se observa el perfil proteico de los extractos intracelulares; una banda de aproximadamente 130 kDa en el extracto proveniente de las células crecidas en rafitilosa no está presente en las otras fuentes de carbono. De igual manera, debajo de la línea de 75 kDa se observa una banda que aparece solo en lactosa y rafitilosa. Arriba de la línea de 28 kDa aparecen bandas en rafitilosa, lactosa y fructosa que no se observan en glucosa y sacarosa. En los extractos extracelulares (Figura 5 B) la línea de aproximadamente 30 kDa se presenta en todos los sustratos y en fructosa se observa una banda de aproximadamente 40 kDa que no se observa en los otros sustratos. Los perfiles proteicos son semejantes en sacarosa, lactosa y rafitilosa a diferencia de los perfiles proteicos de fructosa y glucosa.

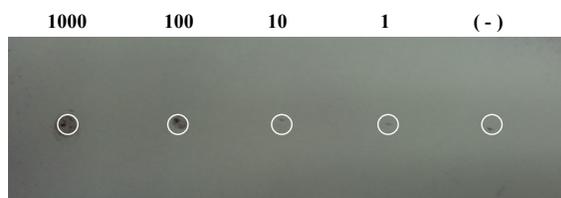


Fig. 7. Detección del gen β -galactosidasa de *C. Flavigena* por Dot Blot.

Probablemente las bandas observadas arriba de 100 kDa en los extractos intracelulares de *C. flavigena* crecida en raftilosa y lactosa correspondan a una β -galactosidasa. Hung y Lee, (2002) reportaron en *Bifidobacterium infantis* HL96 una banda de 115 kDa que corresponde a la β -galactosidasa. Así mismo, en la figura 5 A y en los mismos sustratos se observan bandas mayores a 72 kDa que probablemente correspondan a enzimas con actividad de β -galactosidasa según lo reportado en la literatura (Onishi y Tanaka, 1995).

Las bandas que se observan entre 65 y 75 kDa probablemente correspondan a enzimas con actividad β -fructofuranosidasa (Ende y col., 1996), por lo que cabe la posibilidad de que esta enzima se esté produciendo en las diferentes fuentes de carbono. Estos resultados previos indican la necesidad de purificar las bandas y secuenciarlas para verificar que correspondan a las β -fructofuranosidasas y β -galactosidasa.

3.6 Identificación del gen β -galactosidasa por técnicas moleculares

Para identificar el gen que codifica a β -galactosidasa de *C. flavigena* CDBB-53, se diseñaron una serie de oligonucleótidos basados en las secuencias de dominios conservados de varias β -galactosidasas de diferentes microorganismos. Con estos se amplificó un fragmento de aproximadamente 800 pb (Figura 6). La identificación de este fragmento se realizó primero determinando su secuencia nucleotídica por medio del algoritmo BLAST. Esta secuencia mostró 40% de identidad con una proteína hipotética de *C. flavigena* DSM 20109 (YP.003638214.1). Posteriormente, se realizó un Dot blot para comprobar la presencia del gen β -galactosidasa de *C. flavigena* CDBB-531 (Figura 7), utilizando el producto de PCR como sonda. Abt y col., (2010) reportaron la secuencia del gen β -galactosidasa en el genoma de *C. flavigena* DSM 20109.

Conclusiones

C. flavigena presentó actividad β -galactosidasa y β -fructofuranosidasa intracelular en los diferentes sustratos utilizados como fuente de carbono, variando la actividad enzimática de acuerdo al sustrato utilizado. De igual manera se observaron diferencias en los perfiles proteicos intra y extracelulares de *C. flavigena* al crecer en las diferentes fuentes de carbono. Así mismo, se identificó la presencia del gen de la β -galactosidasa en el genoma de *C. flavigena* CDBB-531. Estos resultados nos permiten continuar los estudios sobre la expresión de genes que codifican a estas enzimas, así como la expresión y purificación de las proteínas y su actividad específica de GH y GT.

Agradecimientos

ESB agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado durante la realización de los estudios de Maestría (367516).

References

- Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., Clum, A. y col. Abt, B., Foster, B., Lapidus, A., Clum, A., Sun, H., Puka, R., Lucas, S., Glavina, T., Nolan, M., Tice, H., Cheng, J., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y., Jeffries, C., Rohde, M., Göker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Klenk, H. (2010). Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134T). *The Genomic Standards Consortium* 3, 15-25.
- Amaya-Delgado, L., Mejía-Castillo, T., Santiago-Hernández, A., Vega-Estrada, J., Farrés-G, A., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, MC. y Hidalgo-Lara, ME. (2010). Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cfl xyn11A) from *Cellulomonas flavigena*. *Bioresource Technology* 101, 5539-5545.
- Belmares-Cerda, R., Reyes-Vega, M.L., Contreras-Esquível, J.C., Rodríguez-Herrera, R. (2003). Efecto de la fuente de carbono sobre la

- producción de tanasa en dos cepas de *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2, 95-100.
- Biedrzycka, E. and Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology* 15, 170-175.
- Chang, A., Singh, S., Phillips, G. N. Jr. y Thorson, J. S. (2011). Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 800-808.
- Chaudhary, P., Kumar, N. y Deobagkar, D. (1997). The glucanases of *Cellulomonas*. *Biotechnology Advances* 15, 315-331.
- Dao, TH., Zhang, J. y Bao, J. (2013). Characterization of inulin hydrolyzing enzyme(s) in commercial glucoamylases and its application in lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers (Jat). *Bioresource Technology*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.123>. Accesado: 24 agosto 2013
- Ende, WVD., Wouterghem, DV., Verhaert, P., Dewil, E. y Laere, A. (1996). Purification and characterization of fructan: fructan fructosyl transferase from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Planta* 199, 493-502.
- González, R., Blancas, A., Santillana, R., Azaola, A. y Wachter, C. (2004). Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 606-610.
- Gutiérrez-Nava, A. (1997). *Identificación de las glucanases de Cellulomonas flavigena crecida en diferentes fuentes de carbono*. Tesis de Maestría en Biotecnología, CINVESTAV, México.
- Gutiérrez-Nava, A., Herrera-Herrera, A., Mayorga-Reyes, L., Salgado, L.M. y Ponce-Noyola, T. (2003). Expression and characterization of the *celcflB* gene from *Cellulomonas flavigena* encoding an endo- β -1,4-glucanasa. *Current Microbiology* 47, 359-363.
- Herrera-Herrera, J. A., Pérez-Avalos, O., Salgado, L. M. y Ponce-Noyola, T. (2009). Cyclic AMP regulates the biosynthesis of cellobiohydrolase in *Cellulomonas flavigena* growing in sugar cane bagasse. *Archives of Microbiology* 191, 745-750.
- Hung, M-N. y Lee, B. H. (2002). Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 439-445.
- Koolman, J. y Röhm K. (2004). *Bioquímica: Texto y atlas*. Editorial Panamericana, España.
- Madrigal, L. y Sangronis, E. (2007). La inulina y sus derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57, 387-396.
- Mayorga-Reyes, L., Morales, Y., Salgado, L.M., Ortega, A. y Ponce-Noyola, T., (2002). *Cellulomonas flavigena*: characterization of an endo-1,4-xylanase tightly induced by sugarcane bagasse. *FEMS Microbiology Letters* 214, 205-209.
- Mejía-Castillo, T., Hidalgo-Lara, M.E., Brieba, L.G. y Ortega-López J. (2008). Purification, characterization and modular organization of a cellulose-binding protein, CBP105, a processive β -1,4-endoglucanase from *Cellulomonas flavigena*. *Biotechnology Letters* 30, 681-687.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Montes, H.C., Ortega, L.J. y Magaña P.I. (1998). Xylanases from *Cellulomonas flavigena*: purification and characterization. *Biotechnology Techniques* 12, 663-666.
- Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E. y López, M. A. (2009). Kinetic behavior and specificity of β -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry* 44, 891-898.
- Onishi, N. y Tanaka, T. (1995). Purification and properties of a novel thermostable galactooligosaccharide-producing beta-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4026-30.

- Parche, S., Amon, J., Jankovick, I., Rezzonico, E., Beleut, M., Barutcu, H., Schnedel, I., Eddy, M., Burkovski, A., Arigoni, F. y Titgemeyer F. (2007). Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 12, 9-19.
- Parche, S., Nothaft, H., Kamionka, A. y Titgemeyer F. (2000). Sugar uptake and utilization in *Streptomyces coelicolor* a PTS view to the genome. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 243-251.
- Pérez- Avalos, O., Sánchez- Herrera, L., Salgado, L. y Ponce-Noyola, T. (2008). A bifunctional endoglucanase/endoxylanase from *Cellulomonas flavigena* with potential use in industrial processes at different pH. *Current Microbiology* 57, 39-44.
- Pérez-Avalos, O. y Ponce-Noyola T. (2002). Synthesis and regulation of D-xylanase from *Cellulomonas flavigena* wild type and a mutant. *Biotechnology Letters* 24, 813-817.
- Pérez-Ávalos, O., Ponce-Noyola, T., Magaña-Plaza, I. y de la Torre, M. (1996). Induction of xylanase and β -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46, 405-409.
- Pliego-Arreaga, R., Regalado, C., Amaro-Reyes, A., García-Almendárez, B.E. (2013). Lactose-induced expression of recombinant turnip peroxidase in *E. coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 505-515.
- Ponce-Noyola, T. y de la Torre, M. (2001). Regulation of cellulases and xylanases from derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar cane bagasse in continuous culture. *Bioresource Technology* 78, 285-291.
- Rajoka, M. (2004). Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*. *Electronic Journal of Biotechnology* 7, 259-266.
- Rajoka, M. y Malik, K. (1999). *Cellulomonas*. En: Encyclopedia of Food Microbiology, Pp. 365-371. Academic Press, London.
- Roy, D., Daoudi, L. y Azaola, A. (2002). Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* rw-8120 using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 281-285.
- Sánchez-Herrera, L.M., Ramos-Valdivia, A.C., de la Torre, M., Salgado, L.M. y Ponce-Noyola, T. (2007). Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 77, 589-595.
- Schmiz, K.L., Broil, B. y John, B. (1983). Cellobiose phosphorylase of *Cellulomonas*, occurrence induction and its role in cellobiose metabolism. *Archives of Microbiology* 135, 241-249.
- Schwab, C., Lee, V., Sørensen, K. I. y Gänzle, M. G. (2011). Production of galactooligosaccharides and heterooligosaccharides with disrupted cell extracts and whole cells of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Dairy Journal* 21, 748-754.
- Solís-Badillo, E. (2009). *Estudio de la actividad hidrolítica en lactosa por Cellulomonas sp.* Reporte de Servicio Social, UAM-Xochimilco, México.
- Splechtna, B., Nguyen, T. H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W. y Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4999-5006.
- Splechtna, B., Nguyen, T. H., Zehetner, R., Lettner, H. P., Lorenz, W. y Haltrich, D. (2007). Process development for the production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using β -galactosidase from *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Journal* 2, 480-485.
- Tzortzis, G., Goulas, A. y Gibson, G. (2005). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* ncimb 41171. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 412-416.
- Vasiljevic, T. y Jelen, P. (2002). Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β -galactosidase

- extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3, 175-184.
- Wakarchuk, W.W., Kilburn, D.G. Miller, R.C.Jr. y Warren R.A.J. (1984) The preliminary characterization of the 13-glucosidases of *Cellulomonas fimi*. *Journal of General Microbiology* 130, 1385-1389.
- Warner, J. y Lolkema, J. (2003). CcpA-dependent carbón catabolite repression in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 475-490.
- Wong, K., Tan, L. y Saddler, J. (1988). Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiology Review* 52, 305-317.
- Zhou, Y., Lee, Y., Park, I., Sun, Z., Yang, T., Yang, P., Choi, Y. y Sun M. (2012). Cyclodextrin glycosyltransferase encoded by gene of *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5 exhibited a new function to hydrolyze polysaccharides whit β -1,4 linkage. *Enzyme and Microbial Technology* 50, 151-157.