

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE FRAGMENTO RECOMBINANTE CD-CBM3 DE LA ENDOGLUCANASA CBP105 DE *Cellulomonas flavigena*.

Arturo Vera Rodríguez¹, Myriam Sánchez Casco², Aurora Antonio Pérez² y Jaime Ortega López². ¹ Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología IPN, ² Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. Tel 57473800 ext. 4381. Fax 57473313, radiocafeta@hotmail.com

Palabra claves: Cellulomonas flavigena, endoglucanasa, CBP105.

Introducción: Los microorganismos celulolíticos, como *Cellulomonas flavigena*, secretan endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas para hidrolizar la celulosa. El estudio de esta reacción de hidrólisis y la caracterización de las enzimas que participan, tiene interés biotecnológico por su importancia en la producción de biocombustibles (1). Recientemente, se clonó, secuenció y caracterizó una endoglucanasa multidomínios de *C. flavigena* de 105 kDa (CBP105) (2). Experimentos previos mostraron que la actividad enzimática de un fragmento del amino terminal, que incluye el dominio catalítico y un CBM tipo3 (CD-CBM3) expresado como cuerpos de inclusión, fue hasta cuatro veces mayor que la actividad enzimática de la CBP105 y del dominio catalítico (CD) (3).

El objetivo de este trabajo es expresar, purificar y determinar la fracción bien plegada del CD-CBM3 recombinante para demostrar que efectivamente la eficiencia catalítica del CD-CBM3 es mayor que el CD o la CBP105.

Metodología: Con el fragmento CD-CBMIII clonado en los vectores de expresión pET32a(+) y pColdI, se transformaron diversos genotipos de *Escherichia coli*, *E. Coli* BL21 (DE3), *E. coli* trxB y *E. coli* BL21 Star(DE3). Para la expresión de ambas construcciones se usó el medio 2TY variando la temperatura (16, 32 y 37 °C), las concentraciones de IPTG (0.1mM a 1mM) y el tiempo de inducción (16, 20 y 24 h) para obtener la proteína recombinante en forma soluble. Una vez concluida la inducción se recuperaron las células, se lisaron y se separó la fracción soluble de la insoluble. Ambas fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y ensayos de actividad enzimática usando CMC al 1% como sustrato. Posteriormente, la proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad a níquel.

Resultados y discusión: El análisis por SDS-PAGE y actividad enzimática indican que el fragmento de CD-CBMIII se expresó en forma insoluble en todas las cepas de *E. coli* y todas las condiciones de cultivo estudiadas. El mejor nivel de expresión se observó con la construcción pET32a(+) en *E. Coli* BL21 Star (DE3) a 20 h de inducción con 0.6 mM de IPTG y 32°C

(Figura 1). Resultados preliminares con el CD-CBM3 recombinante replegado muestran una actividad enzimática mayor que la CBP105. Para determinar la alta eficiencia catalítica del fragmento CD-CBMIII se determinará el porcentaje de replegamiento usando dicroísmo circular y fluorescencia.

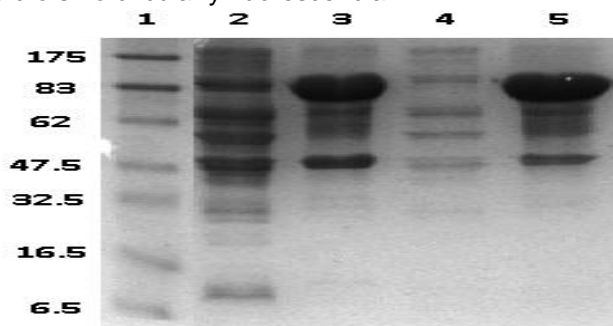


Fig. 1. Expresión del fragmento CD-CBM3 de la CBP105 en *E. coli* BL21 Star (DE3). Marcador de peso (Carril 1), Expresión antes (carril 2) y después de 20 h de inducción con 0.6 mM de IPTG a 32° C (carril 3), fracción soluble (carril 4) y fracción insoluble (carril 5).

Conclusiones: Se obtuvo la expresión del fragmento CD-CBMIII solo en forma insoluble, logrando un mayor nivel de expresión en la cepa *E. Coli* BL21 Star (DE3) transformada con la construcción en pET32a(+).

Agradecimientos: Al CONACYT proyectos 40387-Z y 49987 (JOL).

Bibliografía:

- Haiqiang, J., Darrell, C. (2008). Production and purification of the isolated family 2^a Carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi*. *Protein expression and purification*. vol (64): 63-68.
- Mejía-Castillo, T., y col. (2008). "Purification, characterization and modular organization of a cellulose-binding protein, CBP105, a processive beta-1,4-endoglucanase from *Cellulomonas flavigena*. *Biotechnology Letters*. vol (30): 681-687.
- Sanchez, M. (2007) Clonación y expresión de los dominios de la endoglucanasa CBP105 de *Cellulomonas flavigena*. Tesis de maestría. CINVESTAV, IPN.