



## ANÁLISIS *IN SILICO* PARA LA INMOVILIZACIÓN DE CELULASAS EN NANOSOPORTES MAGNÉTICOS POR ACOPLAMIENTO DIRIGIDO

Perla Guadalupe Vázquez Ortega, Javier López Miranda, Juan Antonio Rojas Contreras, Oscar Nicolás Soto Cruz, Jesús Bernardo Páez Lerma, Anna Iliná.

Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Química y Bioquímica, Durango, Dgo. C.P. 34080.  
perla\_vaz27@hotmail.com

*Palabras clave:* Inmovilización de enzimas, Celulasas, Mutagénesis sitio dirigida

**Introducción.** La hidrólisis biológica de la celulosa se realiza mediante la acción concertada de las enzimas endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas (1). La economía del proceso se puede mejorar aumentando la estabilidad térmica y la eficiencia de las enzimas o facilitando su reciclado. La inmovilización de estas enzimas sobre un nanosoporte magnético (NSM) a base de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_2$ ), recubierta con quitosano, permite la recuperación y reutilización de las enzimas durante varios ciclos de reacción (2). La mutagénesis sitio dirigida es una técnica que puede usarse para controlar la orientación de las enzimas al soporte (3). Ésta puede realizarse por enriquecimiento de la enzima con residuos de lisina. La presencia de estos residuos permitirá la unión multipunto enzima-soporte y consecuentemente, mejorará la estabilidad de la enzima inmovilizada (4). El objetivo del presente trabajo es realizar un análisis *in silico* para la inmovilización de la enzima endoglucanasa enriquecida en residuos de lisina, con el propósito de dirigir su acoplamiento a nanosoportes magnéticos a base de magnetita recubierta con quitosano.

**Metodología.** Se identificaron las secuencias que codifican la biosíntesis de Endoglucanasa en *Bacillus subtilis* y *Trichoderma reesei* y de la  $\beta$  glucosidasa en *T. reesei* y se identificaron los dominios conservados en la base de datos del NCBI. Se realizaron alineamientos múltiples con el algoritmo ClustalW del programa BioEdit. El enriquecimiento de las tres secuencias con residuos de lisina se realizó mediante 3 estrategias de modificación: 1) Al inicio de la secuencia, 2) En los últimos 20 aminoácidos y 3) Agregando una cola de lisinas en el extremo carboxilo terminal. Finalmente se crearon las estructuras tridimensionales utilizando el programa RaptorX y se visualizaron en Discovery Studio 4.0

**Resultados.** Se identificaron las secuencias aminoácidas reportadas para las endoglucanasas de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma reesei*, con una longitud de 499 aa y 242 aa, respectivamente. Se identificaron dos dominios conservados en la proteína del género *Bacillus*. Se eligieron los sitios de la secuencia en donde se pueden realizar modificaciones a la misma sin afectar los dominios funcionales de la enzima. En la figura 1 se observa la estructura predicha para la endoglucanasa de *B. subtilis*. La figura 2 muestra un cambio estructural en el dominio catalítico de la enzima. La figura 3 muestra la estructura

de la Endoglucanasa modificada en el extremo carboxilo terminal, presentándose cambios estructurales en sus dos dominios funcionales. La estrategia 3 (figura 4), no produjo modificaciones en los dominios conservados de la estructura tridimensional de la enzima. Por tal motivo, se eligió adicionar una cola de 6 lisinas en la Endoglucanasa y de 8 lisinas en la  $\beta$  glucosidasa.

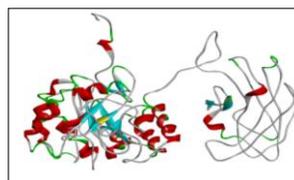


Fig. 1. Estructura predicha de Endoglucanasa en *Bacillus subtilis* sin modificaciones.

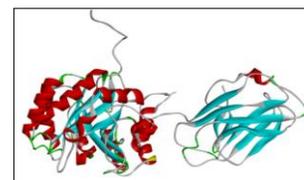


Fig. 2. Endoglucanasa modificada en el amino terminal.

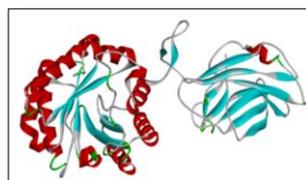


Fig. 3. Endoglucanasa modificada en el extremo carboxilo terminal.

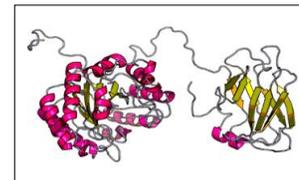


Fig. 4. Endoglucanasa con cola de lisinas

**Conclusiones.** La adición de una cola de 6 lisinas en la Endoglucanasa y de 8 lisinas en la  $\beta$  glucosidasa, resultó la más adecuada, ya que la estructura tridimensional de sus dominios catalíticos no se degenera, además de que las lisinas quedan en la parte exterior de la enzima, pudiendo de esta manera facilitar su posterior unión al nanosoporte.

**Agradecimiento.** Al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto.

### Bibliografía.

- Verma M., Barrow C. y Puri M. (2013). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (1): 23–39.
- Sánchez J., Contreras J., Martínez J., Iliná A., Medina M., Aguilar C. y Segura E. (2014). *Química Nova.* 37(3): 34-39
- Hemsley A., Arnheim N., Toney M., Cortopassi G. y Galas D. (1989). *Nucleic Acids Research.* 17(16): 6545-6551.
- Abian O., Grazu V., Hermoso J., González R., García J., Fernández R. y Guisan J. (2013). *Appl Environ Microbiol.* 70:1249-1251.