



“ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LOS DOMINIOS DE LA CBP105 DE *Cellulomonas flavigena*”

Myriam Sánchez Casco, Teresa Mejía Castillo, Luis G. Brieba de Castro, Jaime Ortega López.
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. Av. IPN # 2508, San Pedro
Zacatenco, CP 07360 Mexico, DF. Fax 5061-3313. mysanchez@cinvestav.mx.

Módulos de unión a carbohidrato, Carboximetil celulosa, actividad enzimática

Introducción: La celulosa es un polímero de glucosa, la cual se une por enlaces β -1,4; la mayor reserva de energía renovable en el planeta se encuentra almacenada en la celulosa (1). *Cellulomonas flavigena* produce endo y exoglucanasas que hidrolizan eficientemente la celulosa, la mayoría de estas enzimas están constituidas de varios dominios cuyo mecanismo molecular en la hidrólisis de celulosa es poco conocido. En un trabajo previo se purificó y caracterizó una endoglucanasa con afinidad a celulosa cristalina de aproximadamente 105 kDa (CBP105) producida por *C. flavigena* y se determinó que contiene un dominio catalítico (CD) y dos tipos de dominios de unión a carbohidrato (CBMIII y CBMII) (Fig 1). También se observó que la tasa de hidrólisis de un fragmento de 85kDa que contiene el CD y CBMIII fue tres veces mayor a la obtenida con la CBP105 (2).

Para probar que el aumento en la tasa de hidrólisis se debe a la eficiencia catalítica del CD de la CBP105, planeamos realizar una disección funcional de los dominios del CBP105. Se clonaron y expresaron de forma recombinante las tres proteínas CD, CD-CBMIII y CD-CBMIII-FIII.

Metodología.

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el fragmento de ADN que codifican para CD, CBMIII, FIII. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector de expresión pET-28b(+) y pColdI, en células de *E. coli*, se indujeron las proteínas recombinantes con IPTG 0.5 y 1mM, se analizó el extracto proteico total por medio de SDS-PAGE. Se purificaron en condiciones desnaturizantes por afinidad a níquel y se replegaron por dilución, se midió la actividad de las proteínas sobre CMC y se compararon las actividades con la enzima rCBP105 (recombinante de CBP105).

Resultados y discusión.



Fig. 1. Estructura para la CBP105 de *C. flavigena*.
CD dominio catalítico, CBMIII y CBMII módulo de unión a carbohidrato tipo III y tipo II, FIII módulo de fibronectina tipo III.

En la fig. 1 se muestra la estructura para la CBP105 obtenida por análisis bioinformático. Se amplificaron por PCR tres fragmentos correspondientes a cd, cd-cbdIII y cd-cbdIII-fii los cuales se clonaron en vectores de expresión. Las

proteínas recombinantes CD, CD-CBMIII y CD-CBMIII-FIII se expresaron en cuerpos de inclusión, por lo que se solubizaron con 8M de urea y se purificaron por afinidad a níquel. Se replegaron las proteínas recombinantes por dilución, pasando de 8M de urea a 0.4M de urea. Se determinó la actividad sobre CMC 1%, en la tabla I se muestran los resultados obtenidos.

Tabla I. Actividad de las proteínas recombinantes.

PROTEINA	MW (kDa)	PI	Actividad (U/mg)
rCBP105	116	4.9	82
CD-CBMII-FIII	85	4.99	123
CD-CBMIII	66	4.73	329
CD	51	4.76	38

Al comparar la actividad enzimática de las proteínas recombinantes CD (51 kDa), CD-CBMIII (66 kDa) y CD-CBMIII-FIII (85 kDa) con la rCBP105 (110 kDa), encontramos que la actividad de CD fue de 50%, mientras que la actividad de las proteínas CD-CBMIII y CD-CBMIII-FIII fueron 4 y 1.5 veces mayores que la rCBP105.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que la organización estructural del CD y el CBMIII de la CBP105 le confieren una eficiencia catalítica posiblemente debida aun fenómeno de procesividad que se afecta drásticamente con la remoción del CBMIII y en menor grado por las interacciones con la celulosa de los dominios FIII y CBMII. Los resultados son consistentes con el aumento observado en la actividad del fragmento de 85 kDa de la CBP105.

Agradecimiento. Agradecemos al CONACYT por la beca (191652) otorgada a MSC y el financiamiento a través del proyecto 40387-Z (JOL) y al CINVESTAV-IPN.

Bibliografía

1. Knauf, M. y Moniruzzaman, M., (2004). Lignocellulosic biomass processing A perspectiva. *Int. Sugar J.* vol (106): 147-150.
2. Mejia, T. (2001). Purificación y caracterización bioquímica de dos celulasas de 70 y 105 kDa producidas por *Cellulomonas flavigena*. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN.