

Obtención de Variantes Hiperactivas e Inactivas de la Endocelulasa Cel9 de *Myxobacter Sp. AL-1*

Francisco X. Castellanos Juárez*, Ada A. Sandoval*, Norma Urtiz-Estrada* y Mario Pedraza-Reyes*

RESUMEN

Debido a su aplicación industrial, existe un gran interés en la producción de celulasas con propiedades bioquímicas novedosas. Por ello, en el presente trabajo se utilizó una estrategia basada en un método de mutagénesis aleatoria in vivo para la obtención de variantes de la endocelulasa Cel9 del microorganismo gram-negativo *Myxobacter Sp. AL-1*. Siguiendo este enfoque, se obtuvieron cepas transformantes de *Escherichia coli* capaces de secretar variantes de la proteína Cel9 cuyas actividades específicas fueron incrementadas hasta 7.5 veces con respecto a la actividad mostrada por la enzima nativa. Del mismo modo, se generaron cepas de *E. coli* productoras de variantes de la proteína Cel9 con baja o nula actividad enzimática. Experimentos de subclonación y fraccionamiento celular revelaron que las mutaciones asociadas con los fenotipos de las variantes de la enzima Cel9 ocurrieron en la secuencia del gen cel9. Así mismo, se demostró que los fenotipos de las cepas mutantes carentes de actividad enzimática no dependen de su incapacidad para secretar las proteínas mutantes. Además de su potencial aplicación biotecnológica, los resultados obtenidos en este trabajo permiten avanzar en el entendimiento de la relación estructura-función de la celulasa Cel9 de *Myxobacter Sp. AL-1*.

ABSTRACT

Due to its biotechnological impact, there is currently a growing interest in the production of cellulases with novel biochemical properties. Here, multiple generations of random mutagenesis in vivo and screening were employed to generate variants of the modular cellulase Cel9 from *Myxobacter Sp. AL-1*. Following this approach, Cel9 variants which showed increases up to 7.5 fold of cellulase activity were obtained. In addition, Cel9 mutants which completely lost the ability to degrade cellulose were also obtained. Results revealed that mutations associated with the phenotype of the Cel9 variants occurred on the mutant gene sequence and that the mutants with null or reduced activity did not accumulate in the cell. In addition to the potential biotechnological application of the enzymes with improved activity obtained here, the results of this work will contribute to the understanding of the structure and function of cellulases grouped in the family 9 of glycosyl hydrolases.

Recibido: 26 de Abril de 2005
Aceptado: 6 de Marzo de 2006

INTRODUCCIÓN

Se estima que el consumo de enzimas industriales a nivel mundial alcanzará un valor cercano a los 630 millones de dólares para los próximos dos años. Del total de las enzimas aplicadas en la manufactura de productos de consumo humano, el 36 % incluye proteasas, amilasas y celulasas (<http://www.bccresearch.com/editors/RC-147NB.html>). Existe un gran interés en la producción y comercialización de celulasas, ya que éstas se emplean en distintos ámbitos industriales, por ejemplo, como aditivos en productos de limpieza y alimenticios, así como en las industrias papelera y textil (Tomme y col., 1995; Warren, 1996). Las celulasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por organismos pertenecientes a todas las escalas evolutivas tales como plantas, nemátodos, hongos y bacterias (Warren, 1996). Así, estas enzimas cumplen un papel muy importante ya que participan en el reciclamiento de las grandes masas de desperdicio de celulosa que existe en el medio ambiente (Tomme y col., 1995).

Palabras clave:

Celulosa; Celulasas; Evolución de proteínas.

Keywords:

Cellulose; Cellulases; Protein evolution.

* Instituto de Investigación en Biología Experimental. Edificio "L". Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N. Col. Noria Alta, Guanajuato, Gto, 36050. México. Teléfono: (473) 73 2 00 06 Ext 8161. Fax: (473) 73 2 00 06 Ext 8153. Correo electrónico: pedrama@quijote.ugto.mx.

Myxobacter Sp. AL-1 es un microorganismo gram-negativo, baciliforme, originalmente aislado del suelo y clasificado en el orden de los *Myxobacteriales* (Ensign y Wolfe, 1965). Entre las actividades enzimáticas secretadas por *Myxobacter* Sp. AL-1, a la fecha, se han caracterizado dos peptidasas (Ensign y Wolfe, 1965; Wingard y col., 1972) y una β -1,4 glucanasa que degrada carboximetilcelulosa (CMC) y quitosana (Hedges y Wolfe, 1974).

En un estudio previo se reportó la purificación de una actividad glucanolítica de *Myxobacter* Sp. AL-1 y la secuenciación de su extremo N-terminal (Pedraza-Reyes y Gutiérrez-Corona, 1997). Un análisis comparativo de dicha secuencia con secuencias depositadas en un banco de proteínas (NCBI, NIH, USA), mostró que la enzima es similar a las endocelulasas producidas por microorganismos del género *Bacillus* (Pedraza-Reyes y Gutiérrez-Corona, 1997). Por otro lado, se demostró que *Myxobacter* Sp. AL-1 posee un sistema multicelulolítico compuesto de 5 enzimas cuya aparición en el medio de cultivo ocurre de manera diferencial durante su ciclo de vida (Avitia y col., 2000). Recientemente, se clonó un operón bicistrónico denominado *cel9-cel48* del genoma de *Myxobacter* Sp. AL-1. El análisis de la estructura primaria de dicho operón reveló que *cel9* codifica para una endocelulasa modular de 67 kDa inducida por avicel, perteneciente a la familia 9 de las glicosil hidrolasas (Avitia y col., 2000; Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch., 1993). Río abajo de *cel9* se identificó un segundo marco de lectura abierto denominado *cel48*, el cual codifica para una proteína de 82 kDa con un alto grado de homología con exocelobiohidrolasas bacterianas pertenecientes a la familia 48 de las glicosil hidrolasas (resultados no publicados).

En el presente trabajo se aplicó un protocolo de mutagénesis aleatoria *in vivo* y se obtuvieron variantes hiperactivas e inactivas de la enzima Cel9 de *Myxobacter* Sp.AL-1. Los resultados obtenidos contribuirán al entendimiento de la relación estructura-función de Cel9 en

tanto que las variantes hiperactivas de la enzima Cel9 podrían tener una aplicación biotecnológica en distintos ámbitos industriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos. Las cepas bacterianas y los plásmidos que se usaron en este trabajo se describen en la Tabla 1.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Para la transformación de la cepa *E. coli* SURE se usó medio SOB, el cual contenía, por litro, Bacto triptona, 20 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 0,5 g; KCl, 2,5 mM; MgCl₂, 10 mM (Sambrook y col., 1989). Para propagar las cepas se utilizó el medio Luria Bertani (LB), sólido o líquido (Miller, 1992). Los medios de cultivo donde se crecieron las cepas mutantes se suplementaron con:

Tabla 1.
Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

CEPA BACTERIANA	GENOTIPO	REFERENCIA O FUENTE
<i>E. coli</i> SURE	e14-(McrA-) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC UMU::Tn5 (kan ^r) uvrC [Fpro AB lacI ^a Z Δ M15Tn10 (Tet ^r)].	Stratagene (USA)
<i>E. coli</i> XL-1 Red	[end A1 gyr A986 thi-1 hsdR 17Sup-E44 relA1 lac mutD5 mutS mutT Ttn10 (Tet ^r)]	Greener y Callahan (1994)
PERM157	<i>E. coli</i> SURE conteniendo el plásmido pUC19 con un fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de 1.8 kpb de pPERM142, originando un producto con actividad celulolítica.	Avitia y col., 2000
PERM212	<i>E. coli</i> SURE + pPERM212 (pPERM 157 replicado 48 h en <i>E. coli</i> XL-1 Red) Amp ^R , Tet ^R .	Este estudio
PERM213	<i>E. coli</i> SURE + pPERM213 (pPERM 157 replicado 48 h en <i>E. coli</i> XL-1 Red) Amp ^R , Tet ^R .	Este estudio
PERM214	<i>E. coli</i> SURE + pPERM214 (pPERM 157 replicado 48 h en <i>E. coli</i> XL-1 Red) Amp ^R , Tet ^R .	Este estudio
PERM216	<i>E. coli</i> SURE + pPERM216 (pPERM157 replicado 48 h en <i>E. coli</i> XL-1 Red) Amp ^R , Tet ^R .	Este estudio
PERM217	<i>E. coli</i> SURE + pPERM217 (pPERM157 replicado 48 h en <i>E. coli</i> XL-1 Red) Amp ^R , Tet ^R .	Este estudio
PERM219	<i>E. coli</i> SURE + pPERM219 (pPERM157 replicado 48 h en <i>E. coli</i> XL-1 Red) Amp ^R , Tet ^R .	Este estudio

taron con Ampicilina (Amp, 25 µg/ml) y Tetraciclina (Tet, 15 µg/ml). La actividad celulolítica de las cepas transformantes se analizó en medio LB sólido suplementado con CMC al 0,2% (p/v). Las células se propagaron en medio líquido, en un incubador ambiental (Forma Scientific) con agitación vigorosa o en medio sólido a 37 °C.

Técnicas genéticas y moleculares. La preparación de células competentes y su transformación con DNA se llevó a cabo tal y como se describió anteriormente (Sambrook y col., 1989). La preparación de DNA plasmídico a partir de células de *E. coli*, el análisis por restricción de fragmentos de DNA y la electroforesis de DNA en geles de agarosa se efectuó de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y col. (1989).

Ensayos de actividad celulolítica. La actividad celulolítica se midió mediante dos procedimientos, los cuales se describen a continuación.

1. Actividad en placa. Los fenotipos de actividad celulolítica de las cepas parental y de las mutantes se analizaron en placas de LB conteniendo CMC. Para ello, las cepas se sembraron por estría o depositando gotas de cultivos líquidos sobre las placas. Luego de incubar por 24 h a 48 h, éstas se inundaron con una solución de Rojo Congo al 0,2 % (p/v) agitándose durante 10 min a temperatura ambiente. Después de descartar el exceso de colorante, las placas se lavaron 2 veces durante 5 min con NaCl 0,5 M. Las colonias o extractos con actividad de celulasa fueron capaces de formar halos de degradación del sustrato que se observaron sobre un fondo rojo.

2. Ensayo cuantitativo. La actividad de celulasa se midió a 42 °C usando CMC como sustrato, siguiendo un protocolo similar al reportado por Hedges y Wolfe (1974). Los azúcares reductores formados durante el ensayo fueron detectados de acuerdo al procedimiento descrito por Pedraza-Reyes y Gutiérrez-Corona (1997).

Obtención de extractos libres de células. Para corroborar el fenotipo de actividad celulolítica, se obtuvieron preinóculos de 2 ml de cada cepa en medio LB suplementado con Amp y Tet y se cultivaron durante 2 días en tubos de ensaye. Se depositaron gotas de 5 µl a 10 µl de cada cultivo en placas de medio LB suplementadas con CMC, Amp y Tet, se dejaron crecer 2 días y se revelaron con Rojo Congo. Se transfirieron alícuotas de 500 µl de cada uno de los preinóculos a 25 ml de medio LB suplementado con Amp y Tet y se dejaron crecer en agitación durante 2 días a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, los cultivos fueron cen-

trifugados a 23700 x g, en una centrifuga Beckman J2-21 para separar el medio de cultivo de las células. La proteína precipitada con sulfato de amonio al 80 % de saturación del medio de cultivo se colectó por centrifugación en una microfuga Eppendorf a 13 000 durante 20 min a 4 °C y la pastilla se resuspendió en regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5. La suspensión de proteína se dializó durante 8 h a 24 °C, con dos cambios de 1 L del mismo regulador. Las pastillas celulares de las cepas arriba descritas se resuspendieron en regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5 y luego se rompieron mezclándolas con una solución de lisozima (1 mg/ml) en regulador de Tris/HCl 50 mM, pH 8, conteniendo NaCl 100 mM e incubando la suspensión 30 min a 37 °C. La mezcla se centrifugó en una microfuga Eppendorf a 13,000 rpm y 4 °C durante 20 min para eliminar los restos de pared celular y las células no rotas; el sobrenadante se utilizó para ensayar la actividad celulolítica intracelular.

Cuantificación de proteína. La cantidad de proteína en los diferentes extractos, se determinó por el protocolo de Lowry y col. (1951).

RESULTADOS

Introducción de mutaciones en la secuencia primaria del gen *cel9* y selección de enzimas Cel9 mutantes.

El gen que codifica para la enzima celulolítica Cel9 de *Myxobacter* Sp AL-1, fue clonado y secuenciado en nuestro laboratorio (Avitia y col., 2000). En el presente estudio se utilizó un plásmido de alto número de copias que contiene al gen *cel9* insertado en el sitio *Pst*I/*Eco*RI. Estudios previos (Avitia y col., 2000) indican que este fragmento se expresa de manera heteróloga en la cepa *E. coli* SURE, y que su producto se secreta al medio de cultivo produciendo halos de degradación de CMC. Este antecedente junto con el análisis de la secuencia del producto deducido nos permite inferir que en el producto generado a partir de este fragmento de DNA existen el péptido señal para su secreción, el sitio catalítico de la enzima, y parte de un dominio de unión a celulosa (Avitia y col., 2000).

Con el propósito de inducir mutaciones al azar en la secuencia del gen *cel9* y obtener formas enzimáticas con baja o elevada actividad celulolítica, el plásmido pPERM157 se introdujo en células competentes de la cepa *E. coli* XL-1 red, y se seleccionaron colonias resistentes a Amp. *E. coli* XL-1 red posee un fondo genético hipermutable, debido a que es deficiente en tres de sus principales sistemas de reparación de DNA (*mutS*, *mutD*, *mutT*) lo que hace que esta cepa tenga

una tasa de mutación casi 5 000 veces superior a la mostrada por una cepa silvestre (Greener y Callahan, 1994). De esta manera, se eligieron al azar alrededor de 250 colonias transformantes resistentes a Amp y se crecieron en medio líquido LB suplementado con este antibiótico durante 48 h. Al término de este periodo, las células se procesaron para el aislamiento de plásmidos mutantes. La colección de plásmidos se introdujo por transformación en células competentes de la cepa *E. coli* SURE y se seleccionaron colonias resistentes a Amp y Tet en placas de medio LB que contenían CMC suplementadas con Amp y Tet. A continuación se efectuó un escrutinio de las colonias identificando aquellas que mostraron un fenotipo de alta actividad o de pérdida de actividad celulolítica. Luego de analizar alrededor de 1 000 colonias, y tomando como referencia el tamaño del halo producido por la cepa de *E. coli* que secreta la proteína silvestre, es decir, *E. coli* PERM157, se seleccionaron tres colonias que mostraron mayor capacidad para degradar celulosa *in situ* (Fig. 1A) y tres que perdieron dicha actividad (Fig. 3).

Debido a que las construcciones génicas que generaron el fenotipo de interés, es decir, alta o nula actividad celulolítica provenían de una cepa hipermutable, existía la posibilidad de que dichas mutaciones hubiesen ocurrido en la secuencia del vector pUC19 afectando de manera indirecta los niveles de expresión del gen *cel9*. Para descartar esta posibilidad, se aislaron los plásmidos de las colonias mutantes, y los insertos *EcoRI/PstI* conteniendo el gen *cel9* se subclonaron en un vector pUC19 "silvestre". Las construcciones se introdujeron por transformación nuevamente en la cepa *E. coli* SURE, encontrándose que las transformantes mantuvieron los fenotipos arriba descritos, lo que demuestra que las mutaciones ocurrieron en la secuencia del gen *cel9* (Fig. 1B).

Caracterización de las mutantes con elevada actividad celulolítica.

Con el propósito de observar si existían diferencias en cuanto a velocidad de crecimiento entre la cepa parental y las cepas *E. coli* PERM212, 213 y 214, todas con fenotipo de actividad celulolítica incrementada, se determinaron sus curvas de crecimiento, observándose patrones de crecimiento muy parecidos entre las cepas analizadas (resultados no mostrados). En el mismo experimento, se tomaron muestras del medio de cultivo a las 10 h, 14 h, 24 h y 30 h de crecimiento y se les ensayó actividad de celulasa en placa. Los resultados mostraron que los medios de cultivo produjeron halos de degradación de celulosa muy similares en la cepa parental y las mutantes PERM212 y PERM214;

sin embargo, la cepa PERM213 mostró una actividad superior a la de la cepa silvestre, particularmente a las 30 h de crecimiento (Fig. 2).

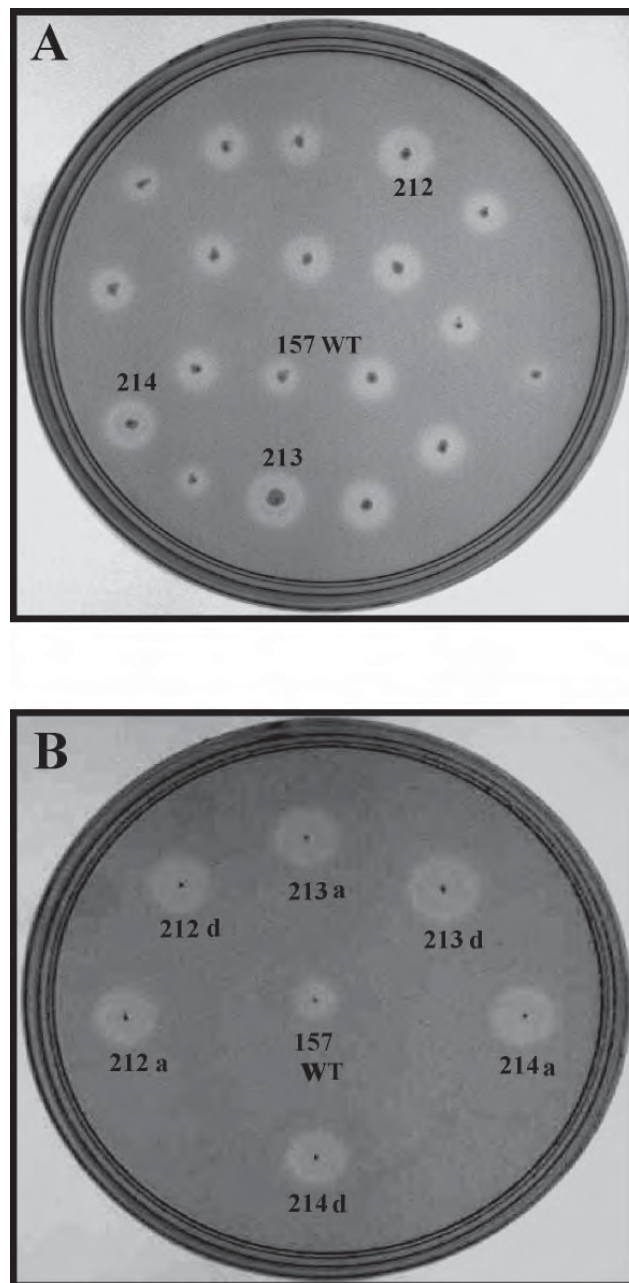


Figura 1. A. Escrutinio en placa para la selección de colonias transformantes que secretan formas mutantes de Cel9 con mayor capacidad para degradar CMC. B. Experimento para corroborar el fenotipo de alta actividad celulolítica de las cepas PERM212, PERM213, PERM214 antes (a) y después (d) de transferir los genes mutantes *cel9* al plásmido pUC19 silvestre.

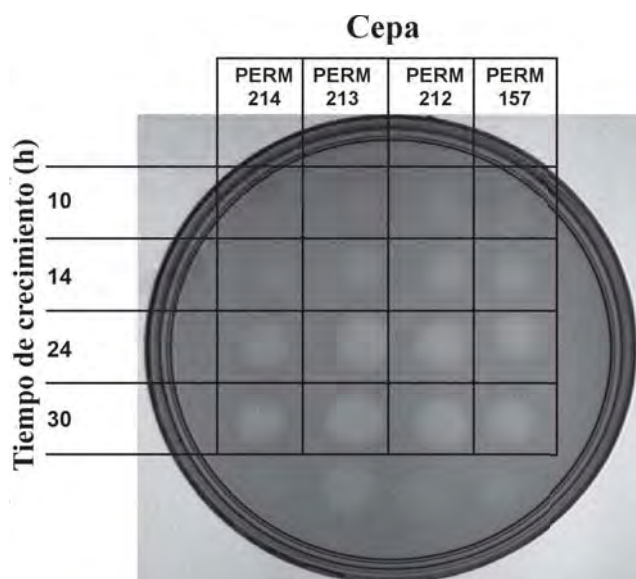


Figura 2. Niveles de actividad celulolítica secretada al medio de cultivo por la cepa parental y las mutantes PERM212, PERM213 y PERM214 a diferentes tiempos de crecimiento.

A continuación se compararon cuantitativamente los niveles de actividad de celulasa producidos por las cepas analizadas en este estudio, para lo cual el medio de cultivo de la cepa silvestre y las mutantes se concentró por fraccionamiento salino como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en la Tabla 2, indican que las fracciones proteicas obtenidas de la cepa PERM212 muestran una actividad específica de celulasa aproximadamente 7,5 veces mayor a la mostrada por la cepa parental, en tanto que las mutantes PERM213 y PERM214 mostraron actividades específicas 5,5 y 2,5 veces superiores a los de la cepa parental, respectivamente.

Tabla 2. Actividad celulolítica de las cepas PERM157, 212, 213 y 214.

Cepa	Actividad específica ^a	Incremento (Veces)
PERM 157	267	1
PERM 212	1476	5,5
PERM 213	2008	7,5
PERM 214	686	2,5

^a nmoles de glucosa x 100/min/mg de proteína (promedio de 2 experimentos).

Caracterización de las mutantes con baja actividad celulolítica.

Para corroborar que las cepas *E. coli* PERM216 y 217 producían enzimas mutantes de Cel9 carentes de actividad celulolítica y que la cepa PERM219

Tabla 3. Niveles de actividad celulolítica de las cepas *E. coli* PERM157, 216, 217 y 219.

Cepa	Actividad específica ^a	
	Medio de cultivo	Extracto celular
PERM157	300	60
PERM216	N.D. ^b	N.D.
PERM217	N.D.	N.D.
PERM219	N.D.	N.D.

^a nmoles de glucosa x 100/min/ mg de proteína (promedio de 2 experimentos).

^b N.D. No detectable.

sintetizaba una variante de Cel9 con actividad enzimática disminuida, se prepararon fracciones de las proteínas extracelulares de cultivos de dichas cepas. Para ello, las proteínas del medio se concentraron por precipitación con sulfato de amonio al 80 % de saturación y en los extractos obtenidos se determinó de manera cuantitativa la actividad celulolítica presente en el medio de cultivo. Como se muestra en la Tabla 3, sólo el extracto del medio de cultivo de la cepa PERM157 mostró actividad de celulasa, mientras que las fracciones extracelulares preparadas con las cepas PERM216, 217 y 219 no mostraron niveles detectables de actividad de celulasa. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento de las cepas PERM157, 216, 217 y 219 (resultados no mostrados).

La secreción de proteínas es un fenómeno que depende de varios factores, entre otros de la secuencia primaria de la proteína, y se conoce que las proteínas de exportación contienen un péptido señal en el extremo N-terminal que les permite ser reconocidas por el aparato secretor (Schallmey y col., 2004). Con el propósito de investigar si el producto generado por las mutantes 216, 217 y 219, contenía alguna alteración en su estructura que le impidiese ser secretado al medio extracelular, se obtuvieron extractos libres de células de las 3 mutantes y se les midieron los niveles de actividad de celulasa. Los resultados de la Tabla 3 indican que a diferencia de la cepa silvestre (PERM157), las tres mutantes carecen de actividad celulolítica intracelular.

DISCUSIÓN

Debido a su alto potencial biotecnológico y al interés de avanzar en el entendimiento de la relación estructura función de la enzima Cel9, en el presente trabajo se planteó la obtención de variantes hiperactivas e inacti-

vas de la enzima Cel9 de *Myxobacter* Sp.AL-1. Para ello, se utilizó como herramienta el fondo genético hipermutable de la cepa de *E. coli* XL-1 Red. Estudios previos han demostrado que la utilización de esta bacteria, deficiente en tres sistemas de corrección de DNA, permite la introducción aleatoria de mutaciones en la estructura primaria de genes de interés (Greener y Callahan, 1994). Este enfoque es bastante versátil, y combinado con un sistema de selección adecuado resulta en una herramienta poderosa para la obtención de enzimas con propiedades bioquímicas novedosas, adaptables para su utilización en diferentes ámbitos industriales (Kuchner y Arnold, 1997). Utilizando este enfoque, también ha sido posible identificar los residuos involucrados en la catálisis enzimática o los que juegan un papel estructural importante en la actividad de varias enzimas (Shao y Arnold, 1996).

Recientemente se demostró que el plásmido pPERM157 contiene un fragmento de DNA con información suficiente para dirigir la síntesis de una celulasa exportable al medio de cultivo en el fondo genético *E. coli* SURE (Figs. 1 y 3; Avitia y col., 2000). La replicación de este plásmido durante 48 h, en el fondo genético de la cepa hipermutable *E. coli* XL-1 Red, permitió la obtención de seis genes *cel9* mutantes. Tres genes expresados en *E. coli* generaron cepas

que mostraron fenotipos de mayor actividad celulolítica *in situ* que la cepa productora de la proteína silvestre. Además, dos cepas fueron capaces de producir variantes con una pérdida total de actividad celulolítica, en tanto que una tercera produjo un extracto con actividad enzimática disminuida. Los experimentos de subclonación de los genes en plásmidos silvestres permitieron concluir que las mutaciones muy probablemente ocurrieron dentro de la secuencia del fragmento de DNA del gen *cel9*. Debido a que la secreción de proteínas depende en gran medida de un péptido señal en su extremo N-terminal, el cual se encuentra presente en Cel9, existía la posibilidad de que el fenotipo de las cepas productoras de las variantes Cel9 con pérdida de actividad celulolítica se debiera a que las mutaciones se hubiesen generado en la secuencia codificante de dicho péptido. Sin embargo, cuando se ensayó actividad celulolítica intracelular a dichas cepas se encontró que a diferencia de la cepa que expresaba el gen *cel9* silvestre, aquellas carecían de actividad intracelular. Esta observación permite concluir que las mutaciones en cuestión no afectan el proceso de secreción de sus productos.

Resultados de alineamientos del dominio catalítico de la enzima endo/exocelulasa E4 de *Thermonospora fusca*, con dominios activos de una subfamilia de celulasas de la familia 9, entre las cuales se encuentra Cel9, revelaron la existencia de al menos 5 sitios conservados, denominados dominios I-V (Sakon y col., 1997; Téllez-Valencia y col., 2003). Este antecedente permite predecir con muy alta probabilidad que las mutaciones en los genes *cel9* de *Myxobacter* Sp.AL-1 que generaron proteínas con baja o nula actividad celulolítica pudieron haber ocurrido en residuos catalíticos o alternativamente en aquellos que cumplen un papel estructural importante en alguno de estos sitios activos. El mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa por las celulasas pertenecientes a la familia 9 de las glicosil hidrolasas requiere de un residuo ácido para protonar el enlace glicosídico y de una base que extrae un protón de una molécula de agua que actúa como nucleófilo atacando a su vez el carbón anómérico e invirtiendo su configuración (Koshland, 1953). Estudios recientes, mostraron que Glu₄₅₉ es un aminoácido esencial que cumple el papel del residuo ácido en Cel9 (Téllez-Valencia y col., 2003). Sin embargo, el aminoácido Glu₈₆, que por estudios de alineamiento se ha propuesto que podría funcionar como la base en la catálisis enzimática, no ha sido probado por mutación sitio dirigida, y éste pudo haber sido un blanco de las mutaciones presentes en las variantes de Cel9 que perdieron completamente su actividad enzimática.



Figura 3. Análisis fenotípico de la actividad celulolítica producida *in situ* por las cepas *E. coli* PERM 157 (silvestre) y las mutantes PERM216, PERM217 y PERM219.

Respecto a los cambios en la estructura primaria de las variantes Cel9 que incrementaron su actividad celulolítica, se ha reportado que los residuos involucrados en este tipo de mutaciones no corresponden a aminoácidos catalíticos. Por ejemplo, se encontró que el cambio de algunos residuos de aspartato o glutamato que no participan en la catálisis enzimática, por alanina, en la enzima CelD de *Clostridium thermoceillum* es capaz de incrementar su actividad enzimática (Chauvaux y col., 1992). Por otra parte, también se encontró que un simple cambio de una serina por una alanina en la subtilisina E de *B. subtilis* 168 es capaz de incrementar la eficiencia catalítica de la enzima y que el amino ácido mutado no es parte de la triada catalítica de la enzima (Romero-García y col., 2004).

Recientemente se logró sobreexpresar de manera exitosa el gen *cel9* de *Myxobacter* Sp. AL-1 en *B. subtilis* (Avitia y col., 2000). Este antecedente permite anticipar el diseño de cepas recombinantes de *B. subtilis* capaces de aumentar los niveles de producción de las celulasas con actividad enzimática incrementada obtenidas en este trabajo. Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio, junto con la secuenciación de los genes mutantes, nos permitirán avanzar en el entendimiento de los aspectos estructurales que rigen la función de las celulasas agrupadas en la familia 9 de las glicosil hidrolasas (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993).

REFERENCIAS

- Avitia, C.I., Castellanos-Juárez, F.X., Sánchez, E., Téllez-Valencia, A., Fajardo-Cavazos, P., Nicholson, W.L., and M. Pedraza-Reyes. (2000). Temporal secretion of a multi-cellulolytic system in *Myxobacter* Sp. AL-1: Molecular cloning and heterologous expression of *ceA9* encoding a modular endocellulase clustered in an operon with *ceA8*, an exocellobiohydrolase gene. *European Journal of Biochemistry*. 267: 7058-7064.
- Chauvaux, S., Béguin, P., and J-P. Aubert. (1992). Site directed mutagenesis of essential carboxylic residues in *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 4472-4478.
- Ensign, J.C., and R.S. Wolfe. (1965). Lysis of bacterial cell walls by an enzyme isolated from a *Myxobacter*. *Journal of Bacteriology*. 90: 395-402.
- Greener, A., and M. Callahan. (1994). XL-1 Red: A highly efficient random mutagenesis strain. *Strategies*. 7: 32-34.
- Hedges, A. and R.S. Wolfe. (1974). Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities. *Journal of Bacteriology*. 120: 844-853.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. 280: 309-316.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-88.
- Lowry, O.H, Resebrough, A.L. and R. Randall. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Koshland, D.E.J. (1953). Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews*. 28: 416-436.
- Kuchner, O. and Arnold, F. (1997). Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends in Biotechnology*. 15:523-530.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Pedraza-Reyes, M. and J.F. Gutierrez-Corona. (1997). The bifunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the Gram negative microorganism *Myxobacter* sp AL-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. *Archives of Microbiology*. 168:321-327.
- Romero-García, E.R., Esquivel-Naranjo, J.A., Ramírez-Ramírez, N., García-Soto, J. and M. Pedraza-Reyes. (2004). A single Ser₈₅Ala mutation enhances the catalytic efficiency of subtilisin E from *B. subtilis* 168. *Biotechnology* 3: 49-55.
- Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D.B., and P.A. Karplus. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Structural Biology*. 4: 810-818.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Col.d Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
- Shao, Z. and Arnold, F.H. (1996). Engineering new functions and altering existing functions. *Current Opinions in Structural Biology*. 6: 513-518.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O.P. (2004). Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Journal of Canadian Microbiology*. 50:1-17
- Téllez-Valencia, A., Sandoval-Carrillo, A. and M. Pedraza-Reyes. (2003). The non-catalytic amino acid Asp₁₄₆ is essential for enzyme activity of the modular endocellulase Cel9 from *Myxobacter* sp. AL-1. *Current Microbiology*. 46: 307-310.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., and N.R. Gilkes. (1995). Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbiology and Physiology*. 37: 1-81.
- Warren, R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*. 50: 183-212.
- Wingard, M., Matsueda, G., and R.S.Wolfe. (1972). *Myxobacter* AL-1 protease II: specific peptide bond cleavage on the amino side of lysin. *Journal of Bacteriology*. 112:940-949.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado parcialmente mediante los convenios 0462P-N, 31767-N y C02-43644 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgados a M. Pedraza-Reyes, Francisco X. Castellanos, Ada A. Sandoval y Norma Urtiz fueron apoyados con becas de CONACYT.