

Produção de β glB-CBM, uma proteína quimérica com domínios de “beta-glicosidase” e “ligação de celulose”

Mateus Galdino Cardoso, Sandro Roberto Marana

Instituto de Química - USP

mateus.galdino.cardoso@usp.br

Objetivos

A celobiose, produto formado da clivagem de celulose, é um inibidor de celulases, fazendo com que a velocidade da reação de hidrólise enzimática deste polissacarídeo diminua, se este dissacarídeo não for degradado e se acumular no meio de reação. Sendo assim uma beta-glicosidase (celobiase) que agisse na superfície das fibras de celulose, mesmo sítio de ação das celulases, diminuindo a concentração de celobiose local, contribuiria para a continuidade da reação de digestão do polissacarídeo. Uma abordagem razoável seria utilizar um CBM, domínio de ligação de celulose, para direcionar uma beta-glicosidase para superfície da celulose. Este trabalho, portanto, busca comparar a eficiência de duas beta-glicosidasas (β glA e β glB) com suas respectivas quimeras (β glA-CBM e β glB-CBM) formadas por domínios catalíticos e de ligação de celulose.

Métodos e Procedimentos

Para a produção das proteínas recombinantes usou-se o vetor pLate51 e bactérias BL21DE3. As enzimas recombinantes foram purificadas por afinidade com a resina Ni-NTA. Uma etapa adicional de cromatografia de troca aniônica foi usada particularmente no caso das quimeras. A pureza das proteínas recombinantes foi atestada com eletroforese SDS-Page. Testes de atividade beta-glicosidásica foram feitos com substrato p-nitrofenil beta-glicosídeo. Ensaio de complementação da atividade de celobiohidrolase foram realizados utilizando Avicel (celulose cristalina) como substrato e celobiohidrolase I (CBHI, Megazyme).

Resultados

As enzimas selvagens e quimeras foram produzidas e purificadas. Porém, o método utilizado para β glA e β glB não se mostrou eficiente para enzimas quiméricas. De fato, obteve-se 15 vezes mais atividade de β glA e 11 vezes mais de β glB que suas respectivas correspondentes quiméricas. Nos testes de hidrólise enzimática de celulose obteve-se o resultado abaixo.

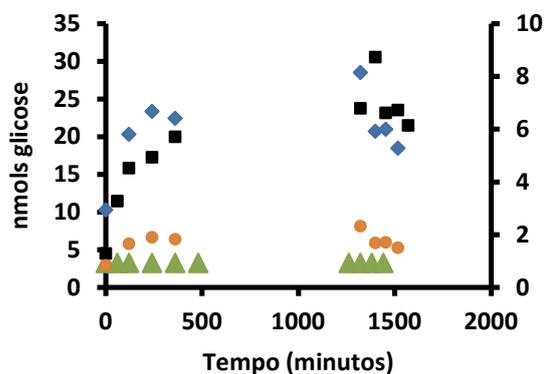


Figura 1: Produção de glicose a partir de celulose para β glA+CBHI (azul), β glACBM+CBHI (laranja), β glB+CBHI (preto) e β glBCBM+CBHI (verde). O eixo à esquerda refere-se à β glA; à direita, β glB.

Conclusões

Os ensaios de hidrólise na presença das enzimas selvagens foram funcionais. Porém, na presença das quimeras não houve acúmulo de glicose. Possivelmente pela baixa atividade das quimeras. Ensaio na presença de maior número de unidades de atividade das quimeras deverão ser repetidos para uma comparação efetiva com as enzimas selvagens.