



**EXPRESION HETERÓLOGA Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ALCOHOL DESHIDROGENASA
PROVENIENTE DEL ARQUEON *THERMOPLASMA ACIDOPHILUM*.**

Erika Nahomy Marino-Marmolejo · Antonio De León-Rodríguez · Ana Paulina Barba de la Rosa · Leticia Santos*

*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ª Sección, CP 78216, San Luis Potosí, México. Fax (444) 8342010, lsantos@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: Alcohol deshidrogenasa, Thermoplasma acidophilum, reacción oxidativa

Introducción. Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) son enzimas capaces de catalizar la interconversión de alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas utilizando diferentes cofactores¹. *Thermoplasma acidophilum* es un microorganismo termo-acidófilo que pertenece al reino arquea y su genoma contiene dos marcos de lectura (ORFs) que codifican alcohol deshidrogenasas (ADHs): *Ta0841* y *Ta1316* (no. de acceso NCBI: NP344301 y CAC12437)². El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo la expresión y caracterización bioquímica y funcional de ambas proteínas con fines biotecnológicos.

Metodología. Los genes *Ta0841* y *Ta1316* se clonaron en el plásmido de expresión pET28a(+) para adicionar hexa-histidinas en la porción C-terminal. Las clonas seleccionadas se confirmaron por secuenciación de ADN. Ambos genes se expresaron y purificaron por afinidad con resina de Níquel y se llevaron a cabo los ensayos de actividad oxidativa en presencia de alcoholes primarios y secundarios en la reacción de reducción de NAD⁺ a NADH⁺. La actividad enzimática se confirmó además por zimogramas. Se determinó por último el estado de oligomerización por electroforesis nativa.

Resultados y discusión. El análisis de las secuencias *in silico* de las ADHs mostró diferencias claves entre ambos genes de *T. acidophilum*; no se encontró un consenso en los sitios catalíticos y estructurales de unión a Zinc de la proteína Ta0841 en comparación con las ADH canónicas. De tal manera en este estudio solamente la ADH Ta1316 presentó actividad en la reacción oxidativa en un rango de pH 2-8 (óptimo 5.0) y a temperaturas desde 25° a 90°C (óptimo 75°C). Esta alcohol deshidrogenasa cataliza la oxidación de distintos alcoholes tales como etanol, metanol, 2-propanol, butanol y pentanol durante la reducción del cofactor NAD⁺ (Cuadro 1).

Conclusiones. La ADH Ta1316 cataliza la oxidación de distintos alcoholes durante la reducción del su cofactor NAD⁺. La máxima actividad se encontró en presencia de etanol produciendo acetaldehído ópticamente puro. La actividad enzimática de Ta1316 purificada en presencia de etanol como sustrato en las condiciones óptimas fue

de 628.7 U/mg. Los resultados de estos experimentos están reportados en el Cuadro comparativo 2. La ausencia de actividad de la enzima Ta0841 puede ser explicada por los cambios puntuales en los residuos de aminoácidos³.

Cuadro 1. Especificidad de sustrato de la ADH Ta1316

Sustrato	Actividad relativa (%)
Etanol	100
2-propanol*	73.5
1-butanol	67.7
Metanol	49.9
1-pentanol	19.1
1-hexanol	15.3
2-pentanol*	5.7

*Alcoholes secundarios

Cuadro 2. Características bioquímicas de distintas ADHs

Microorganismo	Actividad específica U/mg ¹	pH ^d	T°C ^d	K _m mM	V _{max} mM ⁻¹	Estado Oligomérico
Ta 1316^a	628.7	5.0	75	5.7	4.3x10⁻⁴	Tetramero
<i>P. torridus^a</i>	225	8.0	83	0.056	ND	Dodécámero
<i>S. solfataricus^a</i>	10.1	10.0	78	0.260	ND	Tetramero
<i>S. sp (RC3)^a</i>	2.88	10.0	78	0.0172	ND	Tetramero
<i>N. pharaonis^a</i>	ND	9.0	70	1.3	2.7x10 ⁻⁵	ND
<i>R. erythropolis^a</i>	846	6.0	50	ND	ND	ND
<i>Z. mobilis</i> ADH ^b	93	9.5	37	4.8	ND	ND
<i>Z. mobilis</i> ADH ^b	470	6.5	37	1.3	ND	ND
Higado caballo ^c	ND	6.1	37	118	ND	Dímero

^aArquea; ^bBacteria; ^cEucariote; ^dCondiciones óptimas, ND, No determinado

Bibliografía.

- Littlechild, J.A., Guy, J.E., and Isupov, M.N. (2004). Hyperthermophilic dehydrogenase enzymes. *Biochem Soc Trans.* 32, 255-8.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M.L., Koretke, K.K., Volker, C., Mewes, H.W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A.N., and Baumeister, W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature.* 407, 508-13.
- Bogin, O., Peretz, M., and Burstein, Y. (1997). *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase: characterization of the active site metal and its ligand amino acids. *Protein Sci.* 6, 450-8.