



REACTIVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA CARBOXILESTERASA RECOMBINANTE DEL ARQUEA HALOFÍLICA *Halobacterium* sp. NRC1

Marcelo Victorio-De Los Santos¹, Jorge A. Rodríguez², Rosa M. Camacho², Jesús A. Cordova¹

¹Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara. Departamento de Química. Guadalajara, 44430, Jalisco; México. marvicsan81@hotmail.com

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Unidad de Biotecnología industrial. Guadalajara, 44270, Jalisco; México.

Palabras clave: Carboxilesterasa, Reactivación de cuerpos de inclusión, Arqueas halófilas

Introducción. En la búsqueda de enzimas robustas, capaces de llevar a cabo reacciones de síntesis en medios no acuosos, se está recurriendo al aislamiento de enzimas de microorganismos extremófilos. Debido a que la producción de enzimas de estos organismos es muy baja, se recurre al uso de la tecnología del ADN recombinante (1). Un problema muy frecuente en la expresión de proteínas recombinantes de halófilos, es la formación de cuerpos de inclusión (IB's), debido a que las proteínas no se pliegan correctamente en el citoplasma (carente de sal) de *E. coli*, produciendo aglomerados proteicos (2). En nuestro laboratorio, se logró la expresión de la carboxilesterasa (CEH) putativa de *Halobacterium* sp. NRC1 en *E. coli*; sin embargo, esta enzima fue obtenida como IB's, que aunque se facilita su purificación, carece de actividad enzimática.

El objetivo del presente trabajo fue reactivar y caracterizar parcialmente la CEH putativa de *Halobacterium* sp. NRC1.

Metodología. Se usó la cepa *E. coli* BL21 (D3E) Star para clonar y expresar el gene VNG1474G que codifica a una carboxilesterasa putativa (CEH) del arquea halofílica *Halobacterium* sp.3 NRC1, misma que se presentó como IB's. Estos fueron purificados en un sólo paso, usando cromatografía de afinidad a níquel. Fueron realizados estudios de fluorescencia intrínseca para determinar la concentración de aditivos que reactivaran a la enzima, por el método de diálisis y dilución, usando buffers con diferentes concentraciones de urea, KCl y L-arginina (3). Para determinar la identidad de la CEH obtenida, los cuerpos de inclusión se identificaron mediante LC-MS. Se determinó la actividad específica de los IB's reactivados, usando ésteres de *p*-nitrofenilo (acetato, propionato, butirato, valerato, caprilato, laurato, miristato y palmitato), así como termoestabilidad.

Resultados. Los IB's de la CEH fueron recuperados empleando un tampón conteniendo urea 3 M, KCl 2 M e imidazol 150 mM. El análisis por SDS-PAGE reveló la presencia de una sola banda de proteína (Fig. 1), con un peso molecular de 38 kDa, cuya identidad fue posteriormente confirmada por espectrometría de masas, coincidiendo con la secuencia predicha mediante el análisis bioinformático. Para disgregar los IB's y reactivar la enzima, se emplearon diferentes concentraciones de L-arginina, urea y KCl, por el método de diálisis,

encontrado que la mejor recuperación de la actividad enzimática se logró con 0.3, 3, y 2 M, respectivamente. Durante la reactivación, se mostró que la actividad catalítica de la CEH fue dependiente de la concentración de KCl, pues la actividad disminuyó hasta un 50% cuando no fue adicionado, revelando su carácter halofílico. Esto sugirió que la sal, junto con la arginina y la urea, poseen un efecto cooperativo de renaturalización de la proteína. Sin embargo, la recuperación de la actividad enzimática de la CEH a partir de los IB's fue baja (40%). La CEH reactivada mostró preferencia para hidrolizar ésteres de *p*-nitrofenilo de cadena corta, observando una especificidad hacia *p*-nitrofenil-butilato (0.581 U/mg), confirmando que se trata de una esterasa. La enzima mostró una actividad óptima a la temperatura y el pH de 60°C y 7.5 y un pI de 4.84.

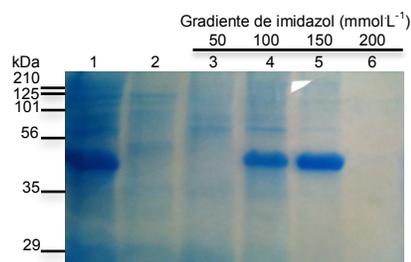


Fig. 1. SDS-PAGE al 12 %, de las fracciones proteicas de la CEH purificadas por cromatografía de afinidad a Níquel. Carril 1, IB's previo a la columna; carril 2, extracto no retenido; carriles 3-6, gradientes de elución.

Conclusiones. Empleando diferentes estrategias de disgregación de los IB's, se logró la reactivación de hasta un 40 % de la CEH, mediante el método de diálisis, observando un efecto cooperativo entre la L-arginina, la urea y el KCl. Están en curso pruebas de estabilidad en solventes no acuosos, para revelar a la CEH de *Halobacterium* sp. como un biocatalizador robusto, para luego llevar a cabo reacciones de síntesis.

Agradecimiento. El presente trabajo fue apoyado por SEP-CONACYT (proyecto 61207).

Bibliografía.

1. Bommarius A y Riebel B. (2004). Introduction to biocatalysis. En: *Biocatalysis: Fundamentals and applications*. Wiley-Blackwell. USA (pp 1-18).
2. Clark E. (2001). *Curr Opin Biotechnol.* 12(2):202-207.
3. Chen J, Liu Y, Wang Y, Ding H, Ma G, Su Z. (2009). *Prot. Exp. Purif.* 66:82-89.