

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD LIPOLITICA DE LA ARQUEA HALÓFILA *Natronococcus sp.* TC6 EN *Haloferax volcanii*

Ruben Espinosa S.¹, Vicente P. Armenta P.¹, Rosa M. Camacho R.¹, Juan C. Mateos D.¹, Marcelo Müller-Santos², Jorge A. Rodríguez G.¹, ¹ Depto. de Biotecnología Industrial Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Zapopan, Jal. 45019, ² Depto. de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Paraná, 19046, Curitiba-PR, Brazil. esru88@gmail.com.

Palabras clave: actividad esterasa/lipasa, pNP ésteres, arqueas halófilas

Introducción. Las arqueas halófilas están adaptadas a ambientes hipersalinos, sus enzimas son de importancia biotecnológica dada su estabilidad bajo condiciones extremas (1). Concretamente las esterasas y lipasas pueden ser empleadas para el desarrollo de moléculas de interés agroalimentario, cosmecéutico y farmacéutico (2). *Haloferax volcanii* es una arquea halófila utilizada para la expresión heteróloga en arqueas debido a su fácil cultivo en laboratorio, y que se han desarrollado varios plásmidos y marcadores (3). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la inducción con diferentes concentraciones de triptófano (Trp) en la expresión heteróloga de una enzima de *Natronococcus sp.* TC6 en *Haloferax volcanii*.

Metodología. Se realizó la activación en placa con medio Hv-YPC de *Hfx. volcanii* con el inserto de una enzima de *Natronococcus sp.* TC6 de un conservado a -80 °C, se incubó durante 4 días a 45 °C. A partir de una colonia se inocularon 10 mL de medio Hv-YPC incubando a 45 °C y 170 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 0.4 y 0.6. El pellet celular fue centrifugado y resuspendido en 50 mL de medio Hv-Ca, al alcanzar una DO de 0.3 se adicionó Trp (0, 1, 3, 6 y 9 mM) y se incubó durante 20 h bajo las mismas condiciones. El extracto enzimático fue obtenido por disrupción celular y centrifugación. Se determinó la proteína soluble por el método de Bradford y la actividad esterasa/lipasa (1) fue determinada empleando como sustratos *p*-nitrofenil-ésteres (valerato C5, octanoato C8, dodecanoato C12 y palmitato C16). Una Unidad enzimática (U) fue definida como la cantidad de proteína que libera 1 μmol de pNP por minuto en las condiciones de ensayo.

Resultados. La cuantificación de proteína por el método de Bradford y actividad enzimática con *p*-nitrofenil-octanoato indican que el Trp indujo la expresión de la enzima de interés, siendo los tratamientos con mayor producción de proteína (mg/mL) y actividad (U/mL) los de 6 y 9 mM de Trp (Tabla 1); mientras que, el tratamiento con 6 mM de Trp produjo la respuesta más alta de actividad específica (Tabla 1). Se realizó un ensayo de actividad esterasa/lipasa con pNP de diferente longitud de cadena para el tratamiento con 6 mM de Trp, y se encontró que la enzima presente en el extracto exhibe mayor actividad sobre los ésteres de pNP de cadena corta (C5) y mediana (C8), teniendo la mayor actividad con *p*-nitrofenil-octanoato (Fig. 1) y menor actividad en C12, mientras que con C16 no se detectó actividad con el extracto, lo cual puede ser atribuido a la insolubilidad del sustrato al ser de mayor longitud de cadena acilo.

Tabla 1. Proteína soluble del cultivo de *Hfx. volcanii* con variaciones en la concentración de Trp como inductor de la expresión enzimática y actividad específica con *p*-nitrofenil-octanoato

Trp (mM)	Proteína (mg/mL)	Actividad (U/mL)	Actividad específica (U/mg)
0	1.31±0.01	0.40±0.01	0.31
1	1.33±0.02	1.07±0.03	0.81
3	1.35±0.01	1.46±0.01	1.08
6	1.43±0.02	1.52±0.01	1.07
9	1.44±0.02	1.48±0.02	1.02

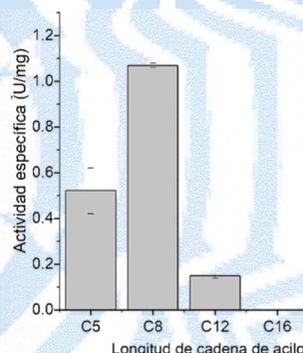


Fig. 1. Actividad específica del extracto enzimático del cultivo de *Hfx. volcanii* con 6 mM de Trp sobre la hidrólisis de *p*-nitrofenil-ésteres.

Conclusiones. Se determinó que 6 mM de Trp es suficiente para lograr la máxima expresión de proteína de interés soluble por *Hfx. volcanii* y la enzima producida presenta la mayor actividad con un éster de cadena mediana (pNPC8).

Agradecimiento. Este trabajo contó con el apoyo de CONACYT a través de la beca de estancia posdoctoral académica inicial 2022 (Ruben E.S.) y el proyecto B-S-34029-2019: "Evaluación de análogos de la capsaicina para el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico".

Bibliografía.

- Martin del Campo M., Camacho R. M., Mateos J. C., M. Müller M., Córdova J., y Rodríguez J. A. (2015) Extremophiles. 19 (6):1121–1132.
- Serveau C., Verger R., Rodriguez J. A., y Abousalham A. (2013) Analyst. 138 (18): 5230–5238.
- Allers T., Barak S., Liddell S., Wardell K., y Mevarech M. (2010) Appl. Environ. Microbiol. 76 (6):1759–1769.