

Tutora de TFM: María Isabel González-Siso



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# Purificación y caracterización bioquímica de una $\beta$ -galactosidasa térmofila

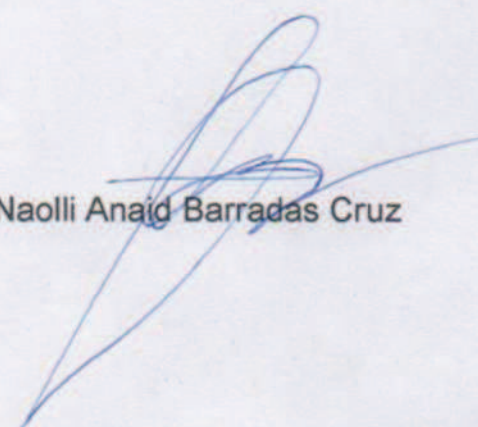
- Purificación e caracterización bioquímica dunha  $\beta$ -galactosidasa termófila
- Purification and biochemical characterization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase

Naolli Anaid Barradas  
Cruz

13/09/2019

El presente trabajo titulado Purificación y caracterización de una  $\beta$ -galactosidasa termófila ha sido realizado por la alumna Naolli Anaid Barradas Cruz.

El trabajo reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido como trabajo fin de master.



Naolli Anaid Barradas Cruz

GONZALEZ SISO  
MARIA ISABEL -  
DNI 32754332D

Firmado digitalmente  
por GONZALEZ SISO  
MARIA ISABEL - DNI  
32754332D  
Fecha: 2019.09.04  
09:53:00 +02'00'

María Isabel Gonzales Siso



# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Objetivos</b>	<b>4</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>5</b>
<i>E. coli</i> T7 Express (New England Biolabs)	5
Plásmido pET-21a-d(+) (Novagen)	5
Medio LB	5
ONPG	5
Preparación de células competentes	<b>6</b>
Expresión inducida por IPTG	6
Extracción y purificación de proteínas	7
Cromatografía de afinidad (Sistema ÁKTA)	7
Cuantificación de proteínas por el medio <i>Bradford</i>	8
SDS-PAGE	8
Ensayo de pH óptimo	9
Ensayo de temperatura óptima	9
Ensayo de cinética enzimática	9
Ensayo de iones	10
<b>Resultados y discusión</b>	<b>11</b>
Crecimiento celular e inducción de la proteína	<b>11</b>
Purificación	12
Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford	13
Temperatura y pH óptimos	14
Ensayos de cinética enzimática	16
Ensayo de iones	17
<b>Conclusiones</b>	<b>17</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>18</b>



## Introducción

Los hábitats extremos son un gran reservorio de vida, donde quedan por descubrir organismos que podrían tener un gran interés biotecnológico, ya que presentan genes y metabolitos que permiten su supervivencia en estos ecosistemas extremos. Por ello, en los últimos años las fuentes geotermales se han convertido en objeto de investigación en la búsqueda de productos microbianos para su utilización en las diferentes áreas de la industria, por rentabilidad y sostenibilidad (Arias Factos, 2016).

La metagenómica es una rama de la biología que ayuda a hacer el análisis de una comunidad microbiana desde una perspectiva nueva, se encarga de estudiar el ADN de todos los organismos que componen un hábitat, (metagenoma) (Handelsman, 2004). Con este ADN se crean bibliotecas genómicas para su estudio se emplean análisis funcionales y de secuencias de los genomas microbianos contenidos en una muestra ambiental, basándose ya sea en expresión o secuenciación (Bonilla-Rosso et al., 2008). Al estudiar el metagenoma de un ambiente en particular, es probable que se descubran bacterias u otros organismos no cultivables, que no podrían aislarse en condiciones de laboratorio.

El ADN metagenómico obtenido se puede clonar en vectores y expresar en diversos huéspedes procariontes, lo que ha permitido la identificación de nuevos microorganismos y sus funciones. Todo este material genético nos brinda una oportunidad de encontrar una serie de genes, antes inaccesibles, que podrían codificar nuevos o mejores productos metabólicos. De la misma manera, la secuenciación masiva es un método que se está empleando para generar genomas completos de organismos que no se pueden cultivar, (Hernández-León et al., 2010).

El conocimiento del ADN metagenómico de un ambiente en particular, permite conocer diversos aspectos de la vida microbiana que allí se está generando, genes y proteínas que se solo se expresan bajo esas condiciones (Hernández-León et al., 2010).



Las enzimas obtenidas a partir de microorganismos termófilos o termoenzimas presentan mejores cualidades que sus homólogas procedentes de mesófilos, no sólo frente a la temperatura, sino también frente a otros agentes desnaturalizantes como cosolventes, agentes caotrópicos y detergentes, además no requieren una refrigeración a temperaturas bajas para mantener su forma activa y presentan vidas medias más largas (Helene Chautard, Emilio Blas-Galindo, Thierry Menguy, Laure Grand'Moursel, Felipe Cava, 2008).

Las  $\beta$ -galactosidasas (EC.3.2.1.23) son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces galactosídicos beta-1,4 pero también pueden catalizar la síntesis de oligosacáridos. Estas enzimas, se han encontrado distribuidas en toda la naturaleza presentes en una multitud de microorganismos, plantas y animales.

Las  $\beta$ -galactosidasas pueden llevar a cabo tres actividades enzimáticas, primero, pueden escindir el disacárido lactosa para formar glucosa y galactosa. En segundo lugar, la enzima puede catalizar la transgalactosilación de la lactosa a alolactosa, un isómero de la lactosa, que consiste en los monosacáridos D-galactosa y D-glucosa unidos por un enlace glucosídico  $\beta$ 1-6, en lugar de  $\beta$ 1-4, y que genera la expresión de un operón o un gen. Es la alolactosa que se une al represor lac Z y crea el circuito de retroalimentación positiva que regula la cantidad de  $\beta$ -galactosidasa en la célula de *Escherichia coli*. En tercer lugar, las  $\beta$ -galactosidasas pueden catalizar la síntesis de galacto-oligosacáridos o GOS (Corral García, 2005).

Las  $\beta$ -galactosidasas se dividen en familias, siendo las más importantes la 1, 2, 35 y 42. A la familia 2 pertenece la  $\beta$ -galactosidasa Lac Z de *E. coli*. El gen LacZ está presente como parte del operón lac que es activado en presencia de lactosa con niveles bajos de glucosa (Zavaleta et al., 2013).

Los genes en el operón lac especifican las proteínas que ayudan a la célula a utilizar la lactosa. El gen lacZ codifica una enzima que divide la lactosa en monosacáridos. Dos reguladores encienden y apagan el operón en respuesta a los niveles de lactosa y de glucosa: el represor lac y la proteína activadora por catabolito (CAP). Estas proteínas se fijan al ADN del operón lac y regulan su transcripción con base en los niveles de lactosa y de glucosa (Juers et al., 2012).



La  $\beta$ -galactosidasa de *E.coli* es un tetrámero de cuatro cadenas polipeptídicas idénticas, cada una de 1023 aminoácidos. Dentro de cada monómero, los 1023 aminoácidos forman cinco dominios estructurales bien definidos. El tercer dominio (central) es lo que se denomina triosa fosfato isomerasa (TIM) o barril  $\alpha$ -8- $\beta$ -8, y el sitio activo forma un foso profundo en el extremo C-terminal de este barril, su peso molecular es alrededor de los 100 000 KD por unidad (Jacobson et al., 1994; Juers et al., 2012).

La industria láctea se encuentra en la constante búsqueda de enzimas  $\beta$ -galactosidasas, que hidrolicen la lactosa a altas temperaturas de entre 55-60° C, para poder utilizarla en el proceso de hidrolisis de la lactosa, y que esta pueda agregarse inmediatamente después de la esterilización, para así evitar la contaminación de la leche y de sus derivados; la enzima para considerarse óptima, tendrá que dejar inalterados los componentes lácticos, lograr elevadas velocidades de reacción y alargar el periodo de utilización de los derivados, por ello se están haciendo más investigaciones en el campo de la metagenómica para encontrar  $\beta$ -galactosidasas termoestables que cumplan con todos los requerimientos en el campo industrial (Chitunda Pessela, 2002).

La sobre-expresión de enzimas de termófilos como proteínas recombinantes extracelulares en hospedantes mesófilos, facilita su obtención y purificación, esto ha permitido la obtención  $\beta$ -galactosidasas con excelente termoestabilidad y su uso en bioprocesos industriales, como la hidrólisis de la lactosa, para aumentar la digestibilidad de la leche y la mejora de las propiedades de los productos lácteos (Zavaleta et al., 2013).

La enzima p37, objeto de este trabajo, es una  $\beta$ -galactosidasa termoestable procedente de una búsqueda funcional en una metagenoteca en plásmido construida a partir del ADN metagenómico de la fuente termal de As Burgas (Ourense).

## Objetivos

- Expresión heteróloga en *E. coli* de una  $\beta$ -galactosidasa termoestable de origen metagenómico (p37).
- Purificación por métodos cromatográficos.



- Cinética enzimática: Determinación de parámetros cinéticos con ONPG y el sustrato natural lactosa
- Determinación de pH óptimo.
- Determinación de temperatura óptima.
- Determinación de actividad con diferentes iones.

## Materiales y Métodos

### *E. coli* T7 Express (New England Biolabs)

Son células de *E. coli* químicamente competentes de alta eficiencia adecuadas para la expresión de la proteína p37.

### Plásmido pET-21a-d(+) (Novagen)

El gen de interés se insertó en el plásmido pET-21a-d(+), que tiene un gen de resistencia a antibióticos, un gen *lacI* que codifica para el represor *lacI*, el gen de interés insertado después de la secuencia de ADN del promotor T7, la secuencia de ADN del operador *lac* y el sitio de unión del ribosoma (para el comienzo de la transcripción).

### Medio LB

Se prepara el medio LB (Peptona 1%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%) en matraces de 2 L, en 200 mL de agua destilada y ampicilina en una concentración final de 100 µg/mL.

### ONPG

Es posible una prueba rápida de actividad galactosidasa, utilizando orto-nitrofenil-β-galactósido (ONPG) como sustrato, debido a que éste entra rápidamente en las células, la β-galactosidasa hidroliza al sustrato ONPG (incoloro), liberando o-nitrofenol que en medio alcalino produce una coloración amarilla y que presenta absorbancia a longitud de onda 420nm.

Se prepara en 10 mL de *Buffer Z* (100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1,6mM MgSO<sub>4</sub>) a una concentración de 4 mg/mL de ONPG.



## Preparación de células competentes

Para la expresión de la secuencia clonada que tiene actividad  $\beta$ -galactosidasa, se utilizó el plasmido pET-21a-d(+) del kit comercial Novagen y se transformó en las células competentes XL1blue, para más tarde usar células de expresión. Para determinar la concentración de ADN, se cuantificó la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro y el cociente 260/280 para conocer su grado de pureza.

Para la expresión de la proteína, se utilizaron las *E. coli* T7 express C2566 (New England Biolabs), porque son células altamente eficientes.

Para preparar las células competentes se utilizó el *Mix and go E. Coli transformation kit & buffer* (Zymo Research).

A continuación, el ADN plasmídico que contenía la ORF codificante para la proteína p37 (pET21ap37) se transformó en estas células competentes siguiendo el protocolo de transformación exprés de 5 minutos recomendado para las células C2566 (*New England Biolabs*).

## Expresión inducida por IPTG

El isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es una molécula que se usa como análogo no hidrolizable de la alolactosa, para inducir la expresión del operón Lac en *E. coli*, ya que esta molécula es fácilmente transportada al interior de la célula donde se va a inhibir la proteína represora LacI y activar la expresión Lac, su uso se ha hecho común en los laboratorios de biología molecular (Borrallho et al., 2002).

El IPTG contiene un átomo de azufre (S) que crea un enlace covalente no hidrolizable por  $\beta$ -galactosidasa, lo que evita que el IPTG sea degradado con lo cual acumulando progresivamente, así que va a actuar como activador constante del operón Lac, lo que permite la actividad enzimática (Borrallho et al., 2002).

Se preparo un pre-inóculo de las células T7 Express C2566 con la construcción, en 200 mL de medio LBA (100  $\mu$ g/ $\mu$ L ampicilina), dejándose crecer toda la noche a 37°C con agitación.





Pasado el tiempo, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm ( $OD_{600}$ ), lo que permite determinar la densidad celular y, con ello, el crecimiento del cultivo. A partir del pre-inóculo, se hace una dilución en LBA para comenzar el crecimiento del inóculo a una  $OD_{600}$  de 0,2. Cada hora, se mide la  $OD_{600}$  del cultivo (Figura 1) y se deja crecer el inóculo hasta que alcance una  $OD_{600}$  de 0.8. Una vez alcanzada, se procede a la inducción mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,4mM, y se deja 2h a 37°C. Pasado este tiempo, se centrifuga a 5000 rpm 4°C 10min. Se congelan las células a -20°C hasta su posterior utilización.

## Extracción y purificación de proteínas

Las proteínas recombinantes en *E.coli* pueden ser expresadas de dos formas, secretadas en el medio extracelular (solubles) o expresadas en el interior de la célula, para este último caso es necesario la ruptura de las células para extraer las proteínas de su interior (García et al., 2013).

Las células se descongelan a temperatura ambiente, se resuspenden en 10mL de tampón fosfato sódico 20mM (pH7,4, NaCl 500mM) y se añaden inhibidores de proteasas (impidiendo que actúen proteasas para que no se rompa la proteína): fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF 1M (2 $\mu$ L por mL), Benzamidina 0,5M (2 $\mu$ L por mL) y Pepstatina 1mM (5 $\mu$ L por mL).

Se lisan las células mediante sonicación durante 15 min a 100% amplitud (2"on/8" off) en frío. A continuación, se centrifuga a 14000 rpm 15min a 4°C. Como primer paso de purificación para desnaturalizar las proteínas mesofílicas de *E.coli*, el sobrenadante recuperado se calienta a 70°C durante 10 min, se centrifuga a 14000 rpm 15min a 4°C y el sobrenadante resultante, que será el extracto crudo (EC), se filtra con un filtro de 0,22 $\mu$ m.

## Cromatografía de afinidad (Sistema ÄKTA)

La cromatografía de afinidad es una técnica ampliamente usada como método de purificación de proteínas, ya que es un método relativamente sencillo de aplicar, y no modifica la proteína objeto de estudio.



La cromatografía de afinidad por histidinas se basa en la unión directa, específica y reversible entre la proteína etiquetada y un ligando, los residuos de histidina quedan unidos covalentemente a una resina que contiene níquel, la proteína se purifica de forma selectiva, ya que sólo aquellas proteínas que contengan la etiqueta de histidina van a quedar ligadas a la matriz, cuando se añade el tampón de elución, que contiene imidazol, éste hará que la proteína se separe de la histidina unida a la matriz por medio del níquel, y por lo tanto la proteína eluya.

El extracto crudo se carga en una columna de afinidad de histidinas HiTrap 5mL (GE Healthcare), equilibrada previamente con el tampón de equilibrado (fosfato sódico 20mM, 20mM imidazol y 0,5M NaCl pH7,4) utilizando el sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Se lava la columna con el tampón de equilibrado hasta que las proteínas inespecíficas eluyen y finalmente se eluye nuestra proteína de interés mediante un gradiente con el tampón de elución (fosfato sódico 20mM, 500mM imidazol y 0,5M NaCl pH7,4) de 0 hasta el 100% de imidazol, tomándose fracciones de 2mL.

Las proteínas presentes en las fracciones seleccionadas están en imidazol y, por tanto, se dializan pasándolas a tampón fosfato sódico 20mM, y 0,5M NaCl pH7,4 mediante una columna Amicon Ultracel 3k (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para realizar la medida de la concentración proteica se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se cuantifican las muestras obtenidas de las diferentes etapas de purificación, utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay (BioRad). Una vez realizada la mezcla de la muestra con el reactivo Bradford, se espera 15 minutos y se lee la absorbancia a 595nm en el lector Bio Tek Synergy H1 Hybrid Reader. Los valores de absorbancia son interpolados a una recta patrón, previamente hecha con un rango de concentraciones de 0,05 mg/mL a 0,5 mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA).

## SDS-PAGE

Se realizó un gel desnaturizante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) al 10% de acrilamida, para ver la



eficiencia de las diferentes etapas de purificación (Raol et al., 2015). Para ello, las muestras se calientan a 95°C con el tampón de carga durante 10 min, se carga el gel con una concentración de proteína de 15µg para cada muestra, se deja correr por aproximadamente 1h a 150 mA, pasado el tiempo el gel se tiñe con azul de Coomassie durante 10min en agitación constante. Después, se hace un lavado con agua y se deja 12h a temperatura ambiente en agitación, se visualiza en una cámara de UV.

## Ensayo de pH óptimo

En este ensayo se van a realizar medidas de actividad a diferentes niveles de pH utilizando ONPG como sustrato. Se realiza una dilución 1:100 de la enzima, en 150 µL de Britton-Robinson *buffer* (se va a trabajar con pH de 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, y 8) (Wierzbicka-Woś et al., 2013). La mezcla se calienta durante 5 min a 80°C, y se agregan 150µL de ONPG (4 mg/mL). Cuando se observa una coloración amarilla, se retira y se ponen 100µL de la muestra más 100µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M), se anota el tiempo que tardó en tomar la coloración amarilla. El blanco lleva 150µL de Britton-Robinson *buffer* con el pH correspondiente, se hacen triplicados y se mide a la absorbancia a 440nm.

## Ensayo de temperatura óptima

En el ensayo de temperatura óptima, la enzima se diluye 1:100 en 150 µL de *buffer* Z. Se calienta la muestra durante 5 min a un rango de temperaturas de 65°C-90°C. Pasado el tiempo, se agregan 150µL de ONPG (4mg/mL) para iniciar la reacción. Cuando se observe la coloración amarilla se toman 100µL de la muestra y se agregan 100µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M), para parar la reacción. Como blanco se utiliza 150µL de *buffer* Z. Se mide la absorbancia a 440nm. Todas las medidas se hacen por triplicado.

## Ensayos de cinética enzimática

- **ONPG**

El sustrato artificial o-nitrofenil-D-galactopiranosido (ONPG) es comúnmente utilizado para cuantificar la actividad beta-galactosidasa (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2013).



Para este ensayo, la proteína previamente purificada se diluye en 150  $\mu\text{L}$  de *buffer Z* (100mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM de KCl, 1,6 de  $\text{MgSO}_4$ ) y se incuba durante 5 min a  $80^\circ\text{C}$ . La reacción se inicia cuando se agregan los 150 $\mu\text{L}$  de ONPG (4mg/mL). A continuación, se espera a que se presente una coloración amarilla, momento en el que se saca y se ponen 100 $\mu\text{L}$  de la muestra en una placa y se le adicionan 100 $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M) que detienen la reacción. El o-nitrofenol liberado se mide por absorbancia a 440 nm. Las mediciones se hacen por triplicado.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa es expresada en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima capaz de liberar un  $\mu\text{mol}$  de producto (o-nitrofenol) por minuto ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en las condiciones experimentales. El ajuste no lineal se basó en los mínimos cuadrados para inferir los parámetros cinéticos enzimáticos de los gráficos de Michaelis-Menten, utilizando Prime 6.00 para Windows (GraphPad Software Inc.).

- **Lactosa**

La cinética de hidrólisis de la lactosa se determina por la glucosa producida por la enzima a diferentes concentraciones de lactosa. Las muestras purificadas se diluyen en *buffer Z* y la velocidad inicial se mide por triplicado con 4,188  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de enzima y una concentración de lactosa de 0 a 80 mM. Se utilizan tiempos de reacción de 6-10 min a  $80^\circ\text{C}$ . Posteriormente, la reacción se detiene calentando a  $96^\circ\text{C}$  durante 5 min. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresa en unidades enzimáticas (U), definidas como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de producto (D-glucosa) por minuto en las condiciones experimentales ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La concentración de glucosa liberada se mide utilizando el kit comercial D-Glucose GOD-POD (Nzytech). Finalmente se realiza el ajuste no lineal mediante el método de los mínimos cuadrados para inferir los parámetros cinéticos enzimáticos de los gráficos de Michaelis-Menten (a través de Prism 6).

## Ensayo de iones

Se lleva a cabo este ensayo con la finalidad de saber el comportamiento de la enzima p37 en unión con diferentes iones metálicos (Adalberto et al., 2010). Para ello, se toman 500 $\mu\text{L}$  de la enzima p37 purificada y se diluye hasta 5mL de



TrisHCl (100mM pH7 con EDTA 10mM pH7) y se deja 1h a 4°C con agitación continua. A continuación, se lleva a cabo una cromatografía de exclusión con tampón TrisHCl 100mM pH7 con el fin de eliminar el EDTA. Para ello, se utilizó una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) acoplada al sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare).

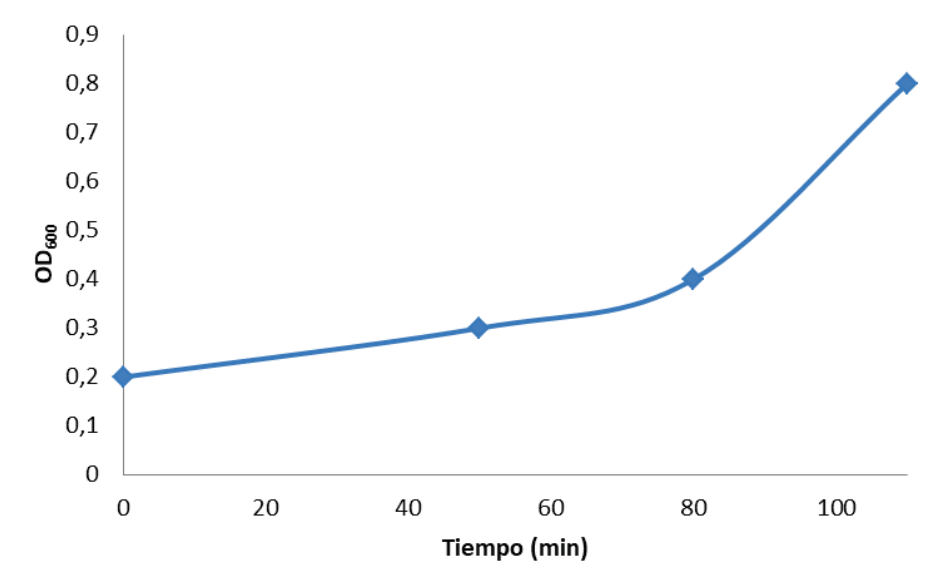
Se concentra la proteína con una columna Amicon Ultracel 3k (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante, resultando en p37+EDTA purificada.

Se llevan a cabo los ensayos de actividad de la proteína con ONPG (4mg/ml) y los iones a las siguientes concentraciones finales en tampón TrisHCl 100mM pH7: MgCl<sub>2</sub> 10mM, KCl 10mM, NaCl 10mM, MgCl 10mM, ZnSO<sub>4</sub> 1mM y CuSO<sub>4</sub> 1mM. Para ello se siguió el mismo protocolo descrito en los apartados anteriores: incubación 5 min a 80°C, adición de 150 µL de ONPG y parada de la reacción con 100µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M). Se mide por absorbancia a 440 nm. Las reacciones se hacen por triplicado.

## Resultados y discusión

### Crecimiento celular e inducción de la proteína

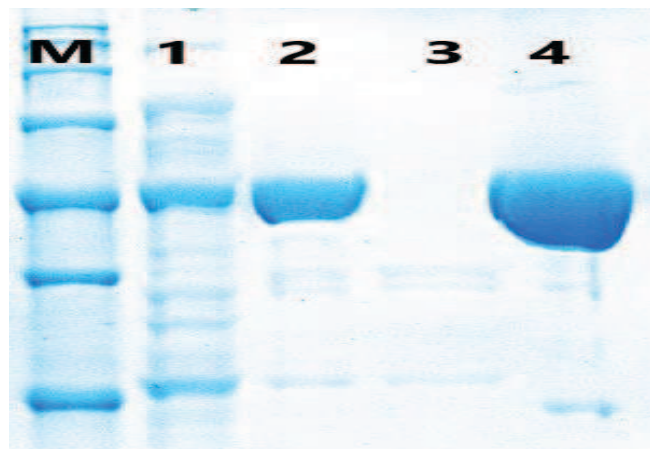
En la figura 1 se observa la curva de crecimiento del cultivo de *E.coli* T7Express C2566 con la construcción pET21ap37. Esta curva es similar a la observada en otros ensayos (Fujikawa et al., 2004).



**Figura 1.** Curva de crecimiento del cultivo de *E.coli*.

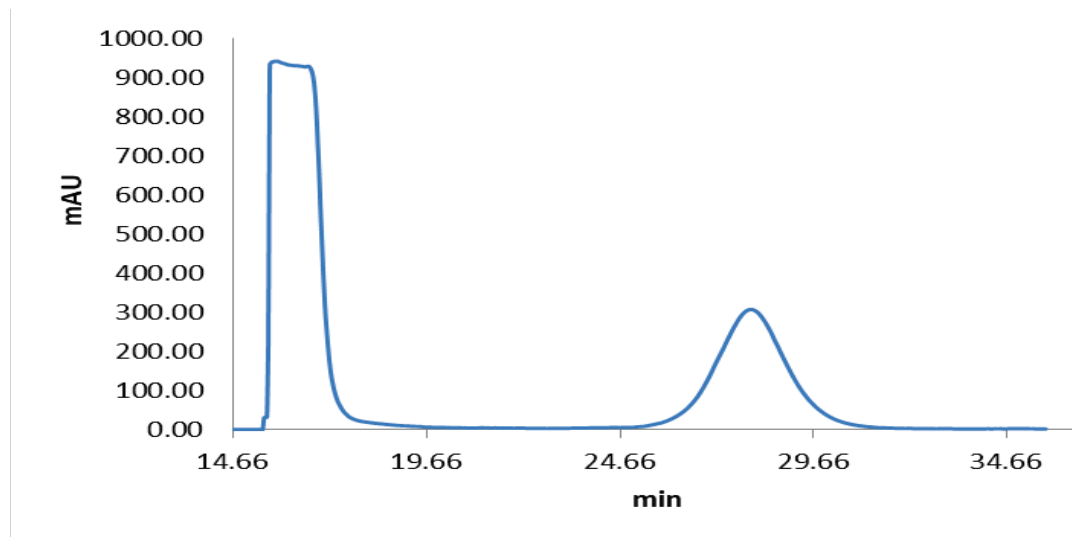
## Purificación

De los pasos de purificación que se llevaron a cabo, se puede observar que el paso previo de calentamiento a 70°C durante 10 minutos permite la desnaturalización y precipitación de gran parte de las proteínas no termoestables de *E.coli* (Figura 2), como ya había sido descrito por (Pessela et al., 2004). Por ello, la proteína ya presentaba un grado de pureza adecuado tras el tratamiento térmico, lo que lleva a pensar que en sucesivas purificaciones no sería necesaria la purificación posterior por histidinas, ya que la proteína aguanta temperaturas altas sin desnaturalizarse



**Figura 2.** Gel de electroforesis, M: Marcador, 1: Extracto Crudo sin calentar 2: Extracto crudo calentado a 70°C 3: *Flow through* 4: P37 purificada en cromatografía de afinidad.

En la cromatografía de afinidad (Figura 3) se observa un solo pico que presenta un grado elevado de pureza y concentración, como pudo comprobarse en el gel de electroforesis (Figura 2). La ausencia de banda de proteína p37 en el *flow through* pone de manifiesto que la etiqueta de histidinas de la proteína ha funcionado adecuadamente y que ésta es una técnica eficaz de purificación (Figura 2).



**Figura 3.** Cromatografía de afinidad para p37.

## Cuantificación de la concentración de proteína por el método de *Bradford*

Para determinar la concentración de la proteína, previamente se hace una recta patrón, con un rango de concentración de 0,05 mg/mL a 0,5 mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA). Para esta recta se siguió el mismo protocolo que para las muestras, determinándose la absorbancia a 595nm. Cuando se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 595nm de las muestras, se interpolaron en la recta patrón y se calculó la actividad, concentración, actividad total y rendimiento de la proteína, que se recogen en la tabla 1.

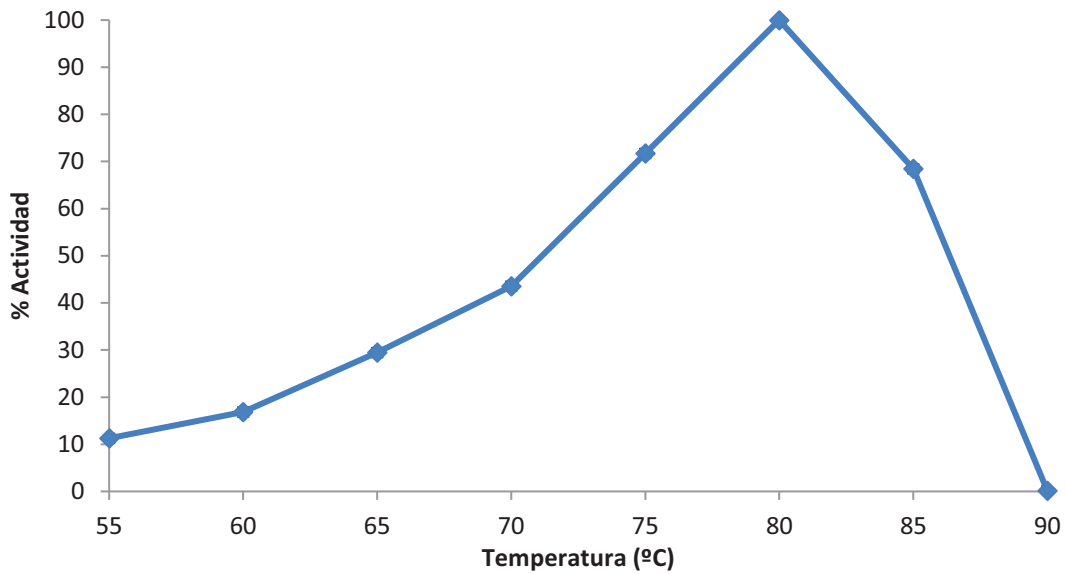
**Tabla 1.** Tabla de purificación de proteínas en cada una de las muestras analizadas.

Muestras	Actividad (U/mL)	Concentración proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Extracto crudo s/calentar	77.68	15,821	4.91	-
Extracto crudo calentado 70°C	32.37	2,378	13,61	2,77
Flow through	18,10	0,791	4,32	-
p37 purificada	274.50	4,189	65,53	13,35

## Temperatura y pH óptimos

Por lo general, las proteínas termófilas presentan un conjunto de modificaciones en su estructura que las convierten en una estructura mucho más compacta y rígida, lo cual hace que tengan una mayor resistencia a la desnaturalización térmica con respecto a las proteínas mesófilas (Helene Chautard, Emilio Blas-Galindo, Thierry Menguy, Laure Grand'Moursel, Felipe Cava, 2008; Zhang et al., 2013). Los resultados obtenidos en la determinación de la temperatura óptima de la enzima p37 ponen de manifiesto que la mayor actividad enzimática tiene lugar a 80°C, lo que demuestra el origen termófilo de la enzima (Figura 4). Esta temperatura óptima es incluso superior a la descrita para otros microorganismos termófilos como *Bacillus stearothermophilus* (Chen et al., 2008) o *Deinococcus geothermalis* (Lee et al., 2011) y es comparable a la temperatura óptima de la  $\beta$ -galactosidasa de *Thermotoga maritima* (Li et al., 2009).





**Figura 4.** Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima p37.

Una vez determinada la temperatura óptima, se ha estudiado el efecto del pH en la actividad de la enzima p37 con el fin de determinar su pH óptimo. En la figura 5 se observa que la máxima actividad enzimática tiene lugar a pH 7. Este resultado es comparable con los valores de pH óptimo de otras  $\beta$ -galactosidasas de origen termófilo como la de *Lactobacillus thermophilus* (Mlichová and Rosenberg, 2006), la de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (Ustok et al., 2010), *Saccharomyces fragilis* (Wendorff and Amundson, 1971) o la del mesófilo *Kluyveromyces lactis* (Ramírez Matheus and Rivas, 2003) que tienen un pH óptimo de 7. Estos valores nos señalan que la enzima tiene características idóneas para poder utilizarse en la industria láctea, ya que se trata de una enzima termoestable y con pH neutro que podría servir para realizar procesos lácticos sin alterar la calidad del producto, la enzima p37 puede soportar temperaturas altas, y mantenerse estable con un funcionamiento normal, sin que haya pérdida de actividad.

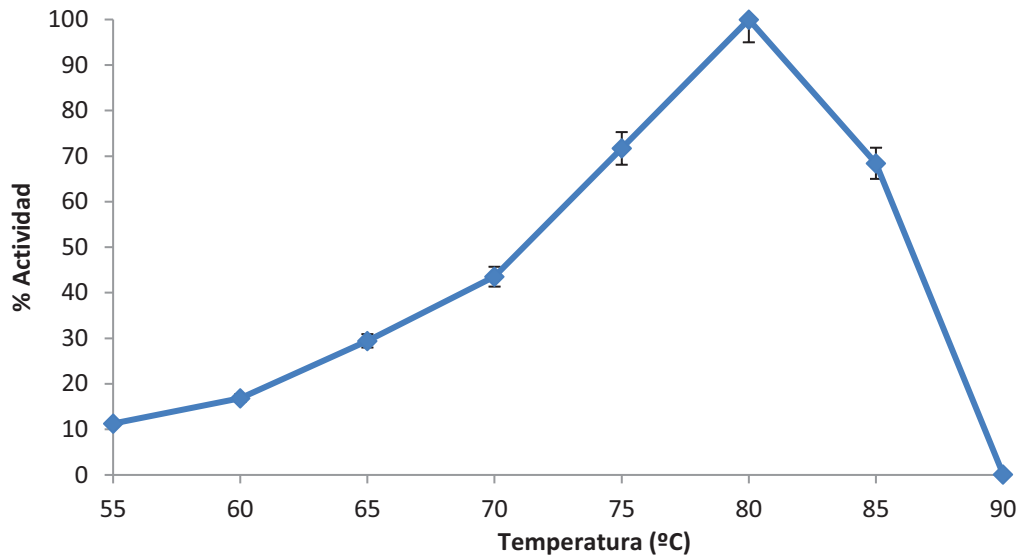


Figura 5. Efecto del pH en la actividad de la enzima p37.

## Ensayos de cinética enzimática

La proteína p37 tiene mayor afinidad hacia el sustrato ONPG que con la lactosa, en función de  $K_m$  como se puede ver en la tabla 2, con una velocidad máxima de 42,74 U/mg con ONPG y 25,86 U/mg en lactosa, este resultado en lactosa es muy parecido al de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Rico-Díaz et al., 2017). La constante de especificidad ( $V_{max}/K_m$ ) es de 36,85 con ONPG, lo que demuestra el alto poder catalítico de la enzima con el sustrato ONPG, este da un valor superior al de *Aspergillus tubingensis* (Raol et al., 2015), y mayor que el de la lactosa donde da un valor de 1,98.

Tabla 2. Actividad de p37 con ONPG y Lactosa

	ONPG	Lactosa
$K_m$ (mM)	1,16±0,421	13,05±1,694
$V_{max}$ (U/mg)	42,74±3,93	25,86±1,034
$V_{max}/K_m$	36,85	1,98

## Ensayo de iones

Se tomó como 100% de actividad la medida con la enzima p37 sin EDTA, cuando se le adicionó el EDTA como quelante a 10mM se vio que la actividad no había disminuido, así que se decidió por subirlo a una concentración de 250mM, se observó una disminución drástica en la actividad de la proteína en este caso. La proteína tratada con EDTA 10mM en presencia de NaCl, mantiene el 100% de su actividad, mientras que con CuSO<sub>4</sub> y ZnSO<sub>4</sub>, se ve disminuida. Como se ha comprobado los iones CaCl<sub>2</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub> son activadores de la reacción de hidrólisis en la β-galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* y *Lactobacillus reuteri*, y los iones CuSO<sub>4</sub> y ZnSO<sub>4</sub> bajan la actividad de la β-galactosidasa de *Bacillus licheniformis* resultados que concuerdan con los de la enzima p37 (Akcan, 2011; Bzdrenga et al., 2014; Mlichová and Rosenberg, 2006; Zolnere et al., 2017).

**Tabla 2.** Determinación del efecto de diferentes iones sobre la actividad enzimática de p37.

Muestra	% Actividad
Sin EDTA	100
EDTA (10mM)	101.11
NaCl (10mM)	100.78
CaCl <sub>2</sub> (10mM)	94.68
MgCl <sub>2</sub> (10mM)	91.92
KCl (10mM)	92.86
CuSO <sub>4</sub> (1mM)	0.29
ZnSO <sub>4</sub> (1mM)	0.24
EDTA (250mM)	30.21

## Conclusiones

En el presente estudio se ha llevado a cabo con éxito la sobre-expresión de la proteína p37, de origen metagenómico, en células *E.coli* T7 express C2566. Tras la lisis celular y obtención del extracto crudo, gran parte de las proteínas de *E.coli* se han eliminado eficientemente por calentamiento térmico a 70°C pasando a un factor de purificación de 2,77. A continuación, se ha concentrado y purificado más la proteína p37 mediante cromatografía de afinidad, obteniéndose un factor



de purificación de 13,35 y una actividad específica de 65,53 U/mg. Los ensayos del efecto del pH óptimo y la temperatura sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la enzima ponen de manifiesto que presenta un pH óptimo de 7 y una temperatura óptima de hidrólisis de ONPG de 80°C. Asimismo, se han determinado las constantes enzimáticas de la proteína determinándose una  $K_m$  de 1,16 mM demostrando una alta afinidad por ONPG y una  $K_m$  de 13,05 mM que determina una menor afinidad por la lactosa. En cuanto al efecto de los iones, se observa una clara inhibición de la actividad por la adición de  $\text{CuSO}_4$  (1mM) y  $\text{ZnSO}_4$  (1mM).

## Bibliografía

- Adalberto, P. R., Massabni, A. C., Carmona, E. C., Goulart, A. J., Marques, D. P., and Monti, R. (2010). Effect of divalent metal ions on the activity and stability of  $\beta$ -galactosidase isolated from *Kluyveromyces lactis*. *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* 31, 143–150. Available at: [http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/1037/982](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/1037/982) [Accessed May 22, 2019].
- Akcan, N. (2011). High level production of extracellular  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. *African J. Microbiol. Res.* 5, 4615–4621. doi:10.5897/AJMR11.716.
- Arias Factos, J. E. (2016). Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta. 105. Available at: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10618> [Accessed July 18, 2019].
- Bonilla-Rosso, G., Souza, V., and Eguiarte, L. E. (2008). Metagenómica, Genómica Y Ecología Molecular: La Nueva Ecología En El Bicentenario De Darwin. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 11, 41–51. Available at: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=25174> [Accessed July 18, 2019].
- Borralho, T., Chang, Y., Jain, P., Lalani, M., and Parghi, K. (2002). Lactose Induction of the lac operon in *Escherichia coli* B23 and its effect on the o-nitrophenyl  $\beta$ -galactoside Assay. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* 2, 117–123. Available at: [https://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal\\_ungrad/JEM/2/2-117.pdf](https://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEM/2/2-117.pdf).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bzdrenga, J., Hiblot, J., Gotthard, G., Champion, C., Elias, M., Chabriere, E., et



- al. (2014). SacPox from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* is a proficient lactonase. *BMC Res. Notes* 7, 333. doi:10.1186/1756-0500-7-333.
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Zhao, J., Tian, F., and Zhang, H. (2008). Production, Purification, and Characterization of a Potential *Thermostable Galactosidase* for Milk Lactose Hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Dairy Sci.* 91, 1751–1758. doi:10.3168/JDS.2007-617.
- Chitunda Pessela, B. C. (2002). Ingeniería de biocatalizadores y bioprocesos: B-Galactosidasa de *Thermus* sp., cepa T2. doi:654.
- Corral García, J. M. (2005). Clonación, expresión y evolución dirigida de  $\beta$ -galactosidasas de procariotas. Available at: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/11497/1/2137115\\_B1.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/11497/1/2137115_B1.pdf).
- Fujikawa, H., Kai, A., and Morozumi, S. (2004). A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. *Food Microbiol.* 21, 501–509. doi:10.1016/J.FM.2004.01.007.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., et al. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vaccimonitor* 22, 30–39. Available at: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2013000200006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2013000200006) [Accessed July 18, 2019].
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669–685. doi:10.1128/MBR.68.4.669.
- Helene Chautard, Emilio Blas-Galindo, Thierry Menguy, Laure Grand'Moursel, Felipe Cava, J. B. & M. D. (2008). An activity-independent selection system of thermostable protein variants. *Nat. Methods* 4, 168. Available at: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/2027>.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M., and Santoyo, G. (2010). Soil metagenomics: new challenges and biotechnological opportunities. *Int. J. Exp. Bot.* 79, 133–139. Available at: [www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar](http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar) [Accessed July 18, 2019].
- Jacobson, R. H., Zhang, X. J., Dubose, R. F., and Matthews, B. W. (1994). Three-dimensional structure of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli*. *Nature*. doi:10.1038/369761a0.
- Juers, D. H., Matthews, B. W., and Huber, R. E. (2012). LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Soc.* 21, 1792–1807. doi:10.1002/pro.2165.
- Lee, J.-H., Kim, Y.-S., Yeom, S.-J., and Oh, D.-K. (2011). Characterization of a glycoside hydrolase family 42  $\beta$ -galactosidase from *Deinococcus geothermalis*. *Biotechnol. Lett.* 33, 577–583. doi:10.1007/s10529-010-0459-6.
- Li, L., Zhang, M., Jiang, Z., Tang, L., and Cong, Q. (2009). Characterisation of a



- thermostable family 42  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Food Chem.* 112, 844–850. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2008.06.058.
- Mlichová, Z., and Rosenberg, M. (2006). Current trends of beta-galactosidase application in food technology. *J. Food Nutr. Res.* 45, 47–54. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/279548822\\_Current\\_trends\\_of\\_beta-galactosidase\\_application\\_in\\_food\\_technology](https://www.researchgate.net/publication/279548822_Current_trends_of_beta-galactosidase_application_in_food_technology).
- Pessela, B. C. C., Torres, R., Fuentes, M., Mateo, C., Filho, M., Carrascosa, A. V, et al. (2004). A simple strategy for the purification of large thermophilic proteins overexpressed in mesophilic microorganisms: application to multimeric enzymes from *Thermus* sp. strain T2 expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 20, 1507–1511. doi:10.1021/bp049785t.
- Ramírez Matheus, A. O., and Rivas, N. (2003). Production and partial characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* grown in deproteinized whey. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53, 194–201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528611> [Accessed July 18, 2019].
- Raol, G. G., Raol, B. V, Prajapati, V. S., and Patel, K. C. (2015). Kinetic and thermodynamic characterization of a halotolerant  $\beta$ -galactosidase produced by halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1. *J. Basic Microbiol.* 55, 879–889. doi:10.1002/jobm.201400747.
- Rico-Díaz, A., Álvarez-Cao, M.-E., Escuder-Rodríguez, J.-J., González-Siso, M.-I., Cerdán, M. E., and Becerra, M. (2017). Rational mutagenesis by engineering disulphide bonds improves *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase for high-temperature industrial applications. *Sci. Rep.* 7, 45535. doi:10.1038/srep45535.
- Ustok, F. I., Tari, C., and Harsa, S. (2010). Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chem.* 119, 1114–1120. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.022.
- Wang, S., Guo, G., Li, L., Cao, L., Tong, L., Ren, G., et al. (2014). Identification and characterization of an unusual glycosyltransferase-like enzyme with  $\beta$ -galactosidase activity from a soil metagenomic library. *Enzyme Microb. Technol.* 57, 26–35. doi:10.1016/J.ENZMICTEC.2014.01.007.
- Wendorff, W. L., and Amundson, C. H. (1971). CHARACTERIZATION OF BETA-GALACTOSIDASE FROM *SACCHAROMYCES FRAGILIS*. *Milk Food Technol* 34. Available at: <https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0022-2747-34.6.300> [Accessed July 18, 2019].
- Wierzbicka-Woś, A., Bartasun, P., Cieśliński, H., and Kur, J. (2013). Cloning and characterization of a novel cold-active glycoside hydrolase family 1 enzyme with  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -fucosidase and  $\beta$ -galactosidase activities. *BMC Biotechnol.* 13, 22. doi:10.1186/1472-6750-13-22.
- Zavaleta, A. I., Ávila, J., Chávez-Hidalgo, E. L., and Izaguirre, V. (2013). Producción y caracterización parcial de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* propagada en suero de leche desproteinizado. *Cienc. Invest.* 16, 18–23. doi:1609-9044.



Zhang, X., Li, H., Li, C.-J., Ma, T., Li, G., and Liu, Y.-H. (2013). Metagenomic approach for the isolation of a thermostable  $\beta$ -galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of *Turpan Basin*. *BMC Microbiol.* 13, 237. doi:10.1186/1471-2180-13-237.

Zolnere, K., Liepins, J., and Ciprovica, I. (2017). The impact of calcium ions on commercially available  $\beta$ -galactosidase. in *Food Biotechnology*, 27–30. doi:10.22616/foodbalt.2017.017.