

# Optimización de la producción de la enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C para su aplicación en procesos de desgomado enzimático de aceites

**Mariano Genera**

*Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario*

Contacto: *generamariano@gmail.com*

Área: Ciencias Biológicas; Sub-área: Biotecnología

## INTRODUCCIÓN

Los aceites vegetales crudos deben ser refinados para ser aptos para el consumo o para aplicaciones tales como la producción de biodiesel. El desgomado del aceite consiste en la remoción de los fosfolípidos o “gomas”, que constituyen el principal contaminante del aceite crudo, y es el proceso que genera la mayor pérdida asociada al refinamiento del aceite. El desgomado enzimático emplea fosfolipasas para hidrolizar los fosfolípidos, generando productos con una mayor solubilidad en fase acuosa, facilitando de esta forma la remoción de los mismos. Con este proceso se minimiza el uso de productos químicos, y se logra un aumento en el rendimiento del aceite refinado y una reducción del volumen de desecho acuoso generado.

Nuestro grupo ha desarrollado una fosfolipasa de tipo C (PC-PLC) para ser utilizada en el desgomado enzimático de aceite de soja, así como un método para su manufactura. La PC-PLC es capaz de hidrolizar el 100% de los fosfolípidos fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, que constituyen cerca del 70% de los fosfolípidos presentes en el aceite crudo. Sin embargo, el aceite crudo contiene otros fosfolípidos además de los anteriormente mencionados, de los cuales el fosfatidilinositol representa un 24%.

El presente proyecto plantea la optimización de la producción de una segunda fosfolipasa, una fosfatidilinositol fosfolipasa tipo C o PI-PLC. El uso combinado de ambas enzimas (PC-PLC y PI-PLC) logrará una mayor eficiencia en la remoción de fosfolípidos de aceite crudo de soja y por lo tanto permitirá incrementar el rendimiento del proceso y obtener un aceite de mayor calidad. El desarrollo del proyecto contribuye a la obtención de un método de manufactura de esta enzima, para su posterior utilización industrial.

## OBJETIVOS

- Desarrollar las construcciones plasmídicas necesarias para la expresión de PI-PLC recombinante en *Corynebacterium glutamicum*.
- Obtener una cepa transformante de *C. glutamicum* que exprese la enzima PI-PLC de *Lysinibacillus sphaericus*.
- Determinar la capacidad del microorganismo hospedador para expresar PI-PLC de manera secretada.

## METODOLOGÍA

### Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Para la expresión en *C. glutamicum* se empleó la cepa ATCC 13869. Sobre el plásmido base pTGR (Ravasi et al, 2012) se construyeron los vectores pKCN315 y pKCN325, en los cuales se clonó el gen de la enzima PI-PLC de *L. sphaericus* bajo control del promotor  $P_{tac}$ , y como fusión a las secuencias señal de las proteínas CspB y PhoD, que dirigen la secreción por los sistemas Sec y TAT respectivamente. Las cepas obtenidas por transformación con estos plásmidos se denominaron 315 y 325. Las células fueron transformadas por electroporación según descripto (Eggeling et al,

2005). El cultivo se realizó a 30°C y 200 rpm en el medio definido MMC (Eggeling et al, 2005). Para la optimización de la secreción se agregaron al medio MMC casaminoácidos en una concentración final de 0,7% y se ensayaron concentraciones de CaCl<sub>2</sub> de 2,5 y 5 mM.

### Inducción de la expresión

Para inducir la expresión de PI-PLC a partir del promotor P<sub>tac</sub>, se realizó una dilución 1/50 de un cultivo saturado (18 horas, 30°C) de *C. glutamicum* transformante crecido en medio BHIS (infusión cerebro-corazón suplementado con 0,5 M sorbitol) en un volumen de medio MMC. Se incubó durante 4 horas (30°C, 200 rpm) y en ese punto agregó 0,5 mM IPTG, manteniendo luego el cultivo a 30°C durante 72 h.

### Determinación fluorométrica de actividad PI-PLC

Se ensayó la actividad PI-PLC en el sobrenadante de los cultivos utilizando como sustrato de la enzima el compuesto D,L-myo-Inositol-1-n-butilfluoresceinilfosfato (Butil-FLIP), que es hidrolizado por la enzima PI-PLC, liberando inositol fosfato y butilfluoresceína, la cual emite fluorescencia a 510 nm al ser excitada a 480 nm (Keana, 2001). El progreso de la reacción enzimática se siguió fluorométricamente durante 5 minutos en medio conteniendo buffer acetato 50 mM, pH 5,5, 1 µM BSA y 2 µM sustrato. Como blanco se agregó agua a la mezcla de reacción, y como control positivo se utilizó PI-PLC de *L. sphaericus* purificada a partir de cultivos de *E. coli*.

### Disrupción celular y análisis de proteínas

Las células cosechadas fueron resuspendidas en medio conteniendo buffer Tris-HCl 15 mM pH 7,5, 50mM NaCl y 0,2 mM EDTA, y se lisaron por sonicación durante 3 minutos. Luego se separaron las células intactas por centrifugación a 5000 rpm, y se separó la fracción citosólica soluble de la fracción insoluble por centrifugación a 13000 rpm durante 20 minutos. La precipitación de proteínas se realizó por agregado de 15% ácido tricloroacético (TCA). El contenido proteico de las muestras se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

## RESULTADOS

Sobre la base del sistema pTGR se construyó el vector pKCN315 que permite la expresión de PI-PLC como proteína de secreción, empleando la secuencia señal del gen *cspB* (figura 1). Se transformó *C. glutamicum* y se seleccionaron dos colonias al azar para evaluar su capacidad de producir la enzima.

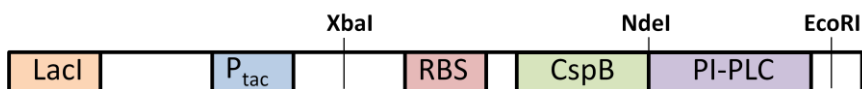
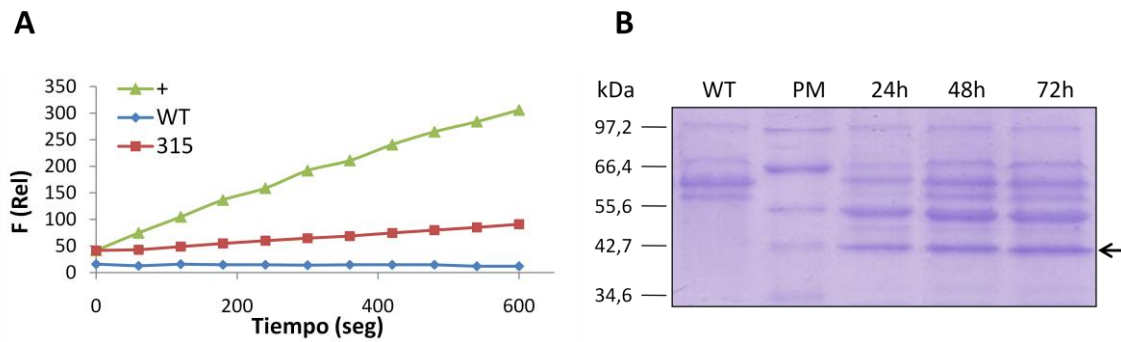


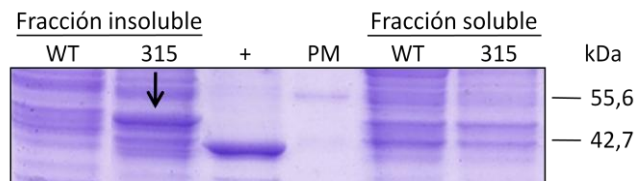
Figura 1: Mapa del plásmido pKCN315.

Los ensayos fluorométricos realizados con muestras de cultivos de la cepa transformante obtenidas a 24, 48 y 72 horas posteriores a la inducción revelaron la existencia de actividad fosfolipasa en el sobrenadante de los mismos (figura 2.A). La presencia de la enzima en el sobrenadante fue confirmada por SDS-PAGE (figura 2.B)



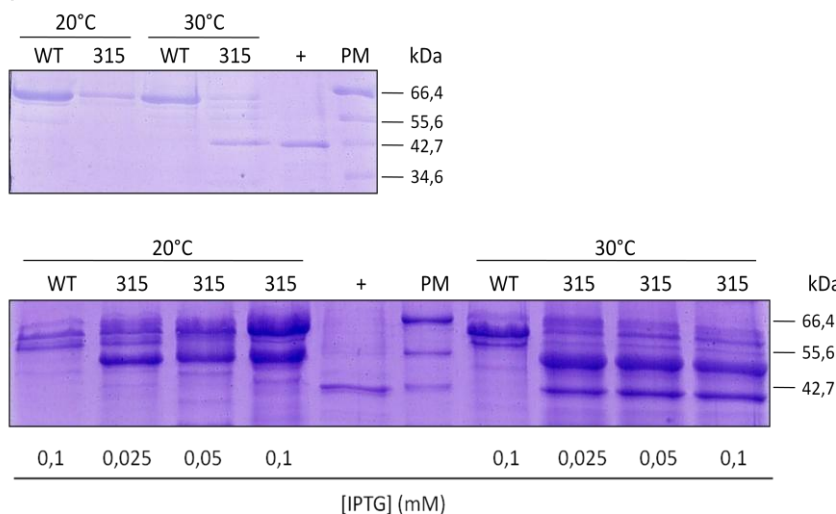
**Figura 2:** Determinación de la presencia de PI-PLC secretada. **(A)** Ensayo fluorométrico de actividad fosfolipasa sobre muestras de 48 horas, representativo de las mediciones a 24, 48 y 72h. **(B)** SDS-PAGE de proteínas del sobrenadante de los cultivos de la cepa 315, precipitadas con TCA. WT, cepa sin transformar; PM, marcador de peso molecular.

Se observaron sin embargo bajas cantidades de PI-PLC, lo que podría deberse a que ésta resulte tóxica para la bacteria y su síntesis sea reprimida, o que existan inconvenientes en la secreción de la enzima, generando una acumulación intracelular de la misma. Para clarificar esto se realizó un lisado de células inducidas durante 72 horas, se separó la fracción citosólica de la fracción insoluble por centrifugación y se analizaron los extractos obtenidos por SDS-PAGE (figura 3). Se encontró que la PI-PLC se encuentra retenida dentro de la célula, en la fracción insoluble, probablemente formando cuerpos de inclusión.



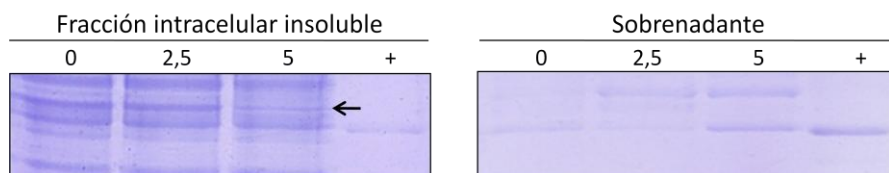
**Figura 3:** SDS-PAGE de proteínas intracelulares correspondientes a las fracciones soluble e insoluble del lisado. Referencias: WT, sin transformar; 315, cepa transformada con el plásmido pKCN315; +, PI-PLC de *L. sphaericus* purificada a partir de *E. coli*; PM, marcador de peso molecular.

Como primer estrategia para mejorar la secreción de la enzima se evaluó el efecto de la disminución de la temperatura de cultivo y de la concentración del inductor (figura 4). Se ensayaron cultivos a 20°C y concentraciones de IPTG de 0.1, 0.05 y 0.025 mM, pero ninguno de los casos arrojó resultados positivos; la enzima no se expresó a 20°C, y la variación de la concentración de inductor no produjo un efecto apreciable.



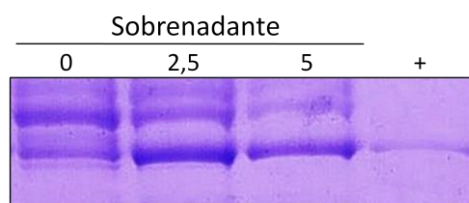
**Figura 4:** Efecto de la temperatura de cultivo y concentración de IPTG. Cultivos realizados a 20°C y 30°C, inducidos por 72 horas. Referencias: WT, cepa sin transformar; 315, pKCN315; +, PI-PLC de *L. sphaericus* purificada; PM, marcador de peso molecular.

Para continuar se ensayó el efecto del agregado de casaminoácidos y de calcio, que pueden favorecer la secreción de algunas proteínas. Se observó que el agregado de calcio al medio de cultivo produjo una disminución en la cantidad de PI-PLC retenida intracelularmente, efecto que se manifestó independientemente de la presencia o ausencia de casaminoácidos. Este hecho se vio reflejado en un aumento en la cantidad de PI-PLC secretada al medio (figura 4).



**Figura 4:** Efecto del agregado de calcio la secreción de PI-PLC. Muestras correspondientes a la fracción insoluble de lisados celulares y al sobrenadante de los cultivos de la cepa 315. Referencias: 0, 2,5 y 5 son concentraciones milimolares de cloruro de calcio; +, PI-PLC de *L. spahericus*; la flecha indica la banda correspondiente a la PI-PLC intracelular (enzima unida a la señal de secreción).

Adicionalmente, se estudió la capacidad de secreción de PI-PLC de la cepa 325, transformada con el vector pKCN325, que es análogo al pKCN315 pero reemplaza la secuencia señal CspB por la secuencia de direccionamiento PhoD para el sistema de secreción TAT. Al igual que en el caso de la cepa 315, se obtuvieron bajas cantidades de enzima secretada. El agregado de calcio al medio de cultivo favoreció la secreción y permitió obtener mayores cantidades de PI-PLC en el sobrenadante (figura 5).



**Figura 5:** Efecto del agregado de calcio sobre la secreción de PI-PLC en la cepa 325. Muestras de proteínas de sobrenadante precipitadas con 15% TCA. 0, 2,5 y 5 son concentraciones milimolares de cloruro de calcio; +, PI-PLC purificada.

## CONCLUSIONES

Se realizaron exitosamente las construcciones plasmídicas necesarias para la expresión de PI-PLC como proteína secretada en *Corynebacterium glutamicum*. Se logró obtener la enzima PI-PLC, secretada al medio de cultivo a través de los sistemas Sec y TAT. Finalmente, se determinaron las condiciones óptimas de cultivo para favorecer la síntesis y secreción de la enzima en este microorganismo, con vistas a continuar con la optimización de este sistema de expresión para poder finalmente evaluar su desempeño al aumentar la escala de cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Eggeling L., Bott M.,** 2005. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Ravasi P., Peiru S., Gramajo H., Menzella HG.,** 2012. Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*, Microbial Cell Factories, 11:147.
- Zaikova T., Rukavishnikov A.V., Birrell G.B., Hayes Griffith O.,Keana J.F.W.,** 2001. Synthesis of Fluorogenic Substrates for Continuous Assay of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C, Bioconjugate Chem, 12:307.