

ESTUDIO DE β -1,3-GLUCANASAS DE *EUGLENA GRACILIS*

Geambeau, Fatima ¹

¹ Instituto de Agrobiotecnología del Litoral UNL-CONICET

Director: Sergio, A., Guerrero

Co-Director: Rodrigo, D., Calloni

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Glicosil Hidrolasas, Expresión Recombinante, Caracterización.

INTRODUCCIÓN

El uso en biotecnología de organismos euglenoides es consecuencia del origen evolutivo de estos organismos. El origen evolutivo de *Euglena gracilis* hace que pueda crecer en forma autótrofa (realizando fotosíntesis), heterótrofa (en oscuridad, usando una fuente carbonada orgánica) o mixta (en presencia de luz y con una fuente de carbono orgánico). Cada condición de crecimiento da lugar a variantes en las rutas metabólicas principales y en la producción de distintas formas de acumulación del carbono. *E. gracilis* en particular tiene la característica de acumular el carbono en la forma de un β -1,3-glucano, el paramilón.

El paramilón es un polímero de unidades glucosa unidas por enlaces β -1,3 glucosídicos. La degradación de los compuestos de reserva de carbono en *E. gracilis*, particularmente el paramilón, es llevada a cabo por un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos a través de un patrón de acción del tipo endo o exo. Las endo- β -1,3-glucanasas, hidrolizan enlaces internos del polímero generando oligosacáridos, mientras que las exo- β -1,3-glucanasas hidrolizan desde los extremos de los oligosacáridos.

En el presente proyecto trabajaremos en la caracterización cinética y fisicoquímica de una posible exo- β -1,3 glucanasa (*EgrGH55*) y una endo- β -1,3 glucanasa (*EgrGH17*). Estas son enzimas que constituyen el escenario metabólico de degradación del paramilón, de relevancia en la producción de bioetanol.

OBJETIVOS

Expresar de forma heteróloga β -1,3-glucanasas de *Euglena gracilis* y purificarlas.

Caracterizar cinéticamente las enzimas.

Título del proyecto: ESTUDIO DE β -1,3-GLUCANASAS DE *EUGLENA GRACILIS*

Instrumento: Cientibeca

Año convocatoria: 2022

Organismo financiador: UNL-CONICET

Director/a: Sergio A. Guerrero

Co-Director: Rodrigo D. Calloni



METODOLOGÍA

Clonado de la *EgrGH17*

A partir de la secuencia que se encuentra disponible en la base de datos del NCBI, Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés National Center for Biotechnology Information), bajo el código BAR45479.1, se procedió al diseño del gen para síntesis de novo con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *HindIII*, estos sitios fueron utilizados para el subclonado del gen en el vector de expresión pET28c el cual, permite la obtención de la proteína recombinante fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, que facilita la posterior purificación mediante IMAC.

Expresión recombinante de la *EgrGH17*

Con la construcción [pET28c/*EgrGH17*], se transformaron, mediante el método de CaCl₂, células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) que permiten la expresión recombinante de la enzima. Las células transformantes se crecieron en medio LB suplementado con kanamicina, se incubaron en agitación a 37 °C hasta su saturación. El cultivo anterior se utilizó para inocular medio de cultivo LB. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀~0,8, momento en el cual se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0,5 mM. En primer lugar se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala, en búsqueda de condiciones óptimas de expresión. Posteriormente se procedió al escalado del cultivo en 1 L de medio LB y se indujo con 0,5 mM de IPTG a 28°C ON. Las células se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y se conservaron a -20°C hasta su uso.

Clonado de la *EgrGH55*

A partir de la identificación de un transcripto que codifica para un miembro de la familia GH55, disponible en el estudio de transcriptómica realizado en *E. gracilis* (O'Neill, Trick et al. 2015) se procedió al diseño del gen para síntesis de novo con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *PstI*, estos sitios fueron utilizados para el subclonado del gen en el vector de expresión pQE30 el cual permite la obtención de la proteína recombinante fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, que facilita la posterior purificación mediante IMAC.

Expresión recombinante de la *EgrGH55*

Con la construcción [pQE30/*EgrGH55*], se transformaron células competentes de *E. coli* M15 que permiten la expresión recombinante de la enzima. Las células transformantes se crecerán en medio LB suplementado con ampicilina y kanamicina y se utilizarán en primer lugar para realizar ensayos de expresión a pequeña escala, en búsqueda de condiciones óptimas de expresión. Con esta información será posible proceder al escalado del cultivo en medio LB. La expresión de la proteína se inducirá con 0,5 mM de IPTG a 28°C ON.





Encuentro
de Jóvenes
Investigadores

Purificación de las proteínas recombinantes

Ambas proteínas recombinantes se expresan fusionadas a una etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal de las mismas. La etiqueta de poli-histidinas permite la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). En cada caso, las células se resuspenden en una cantidad adecuada de buffer y se someten a lisis con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell™ VCX 130 (Sonics). La suspensión resultante se centrifuga a 15000 rpm durante 15 min a 4 °C para separar la fracción soluble de los detritos celulares y el resto de los componentes insolubles. La fracción soluble se siembra en una columna de IDA-Ni²⁺ previamente equilibrada con el mismo buffer. Las proteínas retenidas son eluidas mediante un gradiente de concentración de imidazol. Las fracciones eluidas que resultan activas y puras se juntan en un pool el cual se suplementa con glicerol 25% (v/v) y se almacena a -80 °C para su posterior utilización.

Medida de actividad enzimática para β -1,3-glucanasas

La actividad β -1,3-glucanasa se llevará a cabo mediante la cuantificación de azúcares reductores utilizando la técnica de Somogyi-Nelson. La medida de actividad se hará en volumen final de 50 μ l en las que se utilizará una dilución adecuada de enzima, junto con buffer HAc/Ac 100 mM pH 4,5 y como sustrato se usará laminarina (polímero β -1,3-glucosa con algunas ramificaciones β -1,6) el cual es soluble en soluciones acuosas. Los valores obtenidos de azúcares reductores por la técnica de Somogyi-Nelson serán comparados con una curva de calibrado de glucosa.

Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos V_{max} y $S_{0,5}$ (siendo este último la concentración de sustrato a la que se alcanza el 50% de la velocidad máxima) serán determinados mediante ensayos donde se hace variar la concentración de laminarina. Los datos cinéticos obtenidos se grafican como velocidad inicial en U.mg⁻¹, versus la concentración del sustrato variable en mg.ml⁻¹.

RESULTADOS

Se ha expresado exitosamente *EgrGH17* en *E. coli*, obteniéndose en forma soluble y activa. Además se han determinado los parámetros cinéticos ($S_{0,5}$, V_{max}) de la *EgrGH17* recombinante en estudio a partir de las curvas de saturación utilizando laminarina como sustrato.

Se está trabajando en la obtención de la *EgrGH55* soluble y activa.

CONCLUSIONES

Para la obtención de bioenergía (bioetanol), es necesario transformar el paramilón en unidades de glucosa fácilmente fermentables para obtener el biocombustible, siendo la degradación del paramilón un proceso clave en este proyecto. Es así que resulta relevante



conocer las herramientas moleculares que permitan optimizar la obtención de azúcares fermentables. Este trabajo constituye un aporte al conocimiento básico de las propiedades fisicoquímicas, estructurales y cinéticas de enzimas del metabolismo de degradación del paramilón, pero también genera herramientas moleculares de hidrólisis de β -1,3-glucanos que vamos a estudiar en su utilidad no solo para generar mostos enriquecidos en azúcares fermentables, sino también para degradar glucanos de pared fúngica.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Takeda, T., Nakano, Y., Takahashi, M., Konno, N., Sakamoto, Y., Arashida, R., Suzuki, K. (2015). Identification and Enzymatic Characterization of an Endo-1,3- β -glucanase From *Euglena gracilis*. *Phytochemistry*, 116, 21–27.

Ishida, T., Fushinobu, S., Kawai, R., Kitaoka, M., Igarashi, K., & Samejima, M. (2009). Crystal Structure of Glycoside Hydrolase Family 55 β -1,3-Glucanase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 10100– 10109.

Kawai, R., Igarashi, K., & Samejima, M. (2006). Gene Cloning and Heterologous Expression of Glycoside Hydrolase Family 55 β -1,3-glucanase from the Basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, 28(6), 365–371.

Muchut, R. J., Calloni, R. D., Arias, D. G., Arce, A. L., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2021). Elucidating Carbohydrate Metabolism in *Euglena gracilis*: Reverse Genetics-Based Evaluation Of Genes Coding For Enzymes Linked To Paramylon Accumulation. *Biochimie*, 184, 125–131.

O'Neill, E. C., Trick, M., Hill, L., Rejzek, M., Dusi, R. G., Hamilton, C. J. Field, R. A. (2015). The transcriptome of *Euglena gracilis* Reveals Unexpected Metabolic Capabilities for Carbohydrate and Natural Product biochemistry. *Molecular BioSystems*, 11(10), 2808–2820.

Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T., & Arakawa, K. (2016). De Novo Assembly and Comparative Transcriptome Analysis of *Euglena gracilis* in Response to Anaerobic Conditions. *BMC Genomics*, 17(1).