



PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE FORMATO DESHIDROGENASA

Elizalde Hilén

*Departamento de Física- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas -UNL
Director: González, Pablo J.*

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se vienen realizando considerables esfuerzos a nivel global para desarrollar tecnologías de producción sustentable de combustibles alternativos para soportar las actividades de la población mundial. El uso masivo de combustibles fósiles sumado a la deforestación llevó al aumento del CO₂ atmosférico, causando calentamiento global y la alteración y/o destrucción de los ecosistemas más sensibles. Esto a su vez va en detrimento de factores ambientales y sociales. Es entonces que se necesitan desarrollar nuevas tecnologías de producción sustentable de combustibles para soportar las actividades de la población mundial, y desarrollar procesos de captura de CO₂ atmosférico. En la actualidad se busca cómo convertir CO_{2(g)} en productos de valor agregado como el metanol, metano o ácido fórmico. La conversión electroquímica de CO₂ en compuestos de carbono con menor estado de oxidación es una de las alternativas más investigadas (Ayers, WM. 1994). Sin embargo, el principal obstáculo para desarrollar un proceso rentable es que no se puede controlar totalmente el producto obtenido, o sea, el producto final es una mezcla de compuestos de C. En otras palabras, la electro-reducción del CO₂ depende del catalizador, solvente, pH y potencial aplicado, pudiéndose generar compuestos como el oxalato, ácido fórmico, monóxido de carbono, formaldehído, metanol o metano (Oloman C., Li H. 2008). De estos, sólo metanol, metano y ácido fórmico (HCOOH) pueden ser utilizados directamente como combustibles alternativos. Este último posee ventajas sobre el metano y metanol ya que es menos tóxico (Reutemann W. *et al*, 2002), menos volátil, y no es inflamable a concentraciones menores a 85%. Esto se traduce en costos de manipulación y transporte inferiores y ofrece ventajas incluso sobre combustibles convencionales y alternativos como el H_{2(g)}.

Los organismos vivos han desarrollado a través de millones de años de evolución sistemas de captura y transformación de CO₂. La fotosíntesis es seguramente el proceso más ubicuo, y es realizado por cianobacterias, algas y plantas con la participación de fotosistemas complejos. Existen al menos otras cinco vías metabólicas a través de las cuales los organismos vivos convierten CO₂ en compuestos de C reducidos. Sin embargo, todas estas vías dependen de sistemas de enzimas muy complejos que generan compuestos que no pueden ser usados como combustibles. Por esto, en este trabajo de investigación se busca usar como "biocatalizador" una

1

Título del proyecto: Electro reducción de dióxido de carbono a ácido fórmico: desarrollo de un catalizador electro-enzimático para la producción de combustibles alternativos.

Instrumento: PIP 369

Año convocatoria: 2014

Organismo financiador: CONICET

Director: Dr. Pablo Javier González





formato deshidrogenasa (Fdh), la cual es una enzima capaz de convertir $\text{CO}_2(\text{g})$ directamente en ácido fórmico. La función fisiológica de las Fdhs es catalizar la oxidación de $\text{HCOOH} \rightarrow \text{CO}_2$ para obtener equivalentes de reducción. Sin embargo, también son capaces de catalizar la reacción inversa cuando son sometidas a sobrepotenciales reductores. En este trabajo, se aisló y caracterizó la Fdh de *Thiobacillus sp.* (Tsp-Fdh) tolerante a $\text{O}_2(\text{g})$, la cual es una Fdh monomérica de 45 kDa dependiente de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD).

OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto donde se enmarca este trabajo es desarrollar un catalizador electro-enzimático capaz de transformar CO_2 en ácido fórmico. Para ello, lo que se busca es modificar la superficie de un electrodo hecho de un material inerte (e.g. grafito) inmovilizando la Fdh en cuestión, para así generar un cátodo específico para la reducción de $\text{CO}_2(\text{aq})$.

En base a lo mencionado anteriormente, los objetivos específicos de este trabajo son:

- Optimizar la expresión de Tsp-Fdh.
- Purificar la enzima mediante técnicas de cromatografía líquida (FPLC).
- Caracterizar la cinética de oxido-reducción $\text{HCOOH} \leftrightarrow \text{CO}_2$ usando métodos de cinética enzimática de estado-estacionario y electroquímicos.

METODOLOGÍA

Clon y producción recombinante: El gen de Tsp-Fdh clonado (sitios NdeI y HindIII, con His-Tag) en el vector pet29b(+) fue adquirido de Genscript (USA). Células competentes de *E.coli* BL21(DE3) fueron transformadas con este plásmido de acuerdo a protocolos estándares. La expresión de Tsp-Fdh se llevó a cabo cultivando células transformadas a 37°C en medio LB + kanamicina (25 mg/mL) hasta obtener una $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.4-0.6$, tiempo en el que se agregó 0.5 mM IPTG. El tiempo de inducción fue de 3-4 horas a 20°C .

Recolección de células, preparación de extracto soluble, y purificación: Las células fueron recolectadas por centrifugación (15 min, $5000\times g$, 4°C). El pellet se resuspendió en solución de lisis (5 mM KPB pH 7 + 1 mM PMSF) y la suspensión resultante fue tratada con un sonicador de punta. El extracto bruto obtenido fue centrifugado (60 min, $15000\times g$, 4°C) y el sobrenadante conteniendo la enzima de interés fue guardado. La purificación se realizó por cromatografía líquida usando una columna His-Trap (GE-Healthcare). El extracto soluble se inyectó en la columna equilibrada con Buffer A (20 mM KPB pH 7.0 + 500 mM NaCl). Se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna (VC) y posteriormente Tsp-Fdh se eluyó con un gradiente lineal de 20 VC utilizando como eluyente buffer B (20 mM KPB pH 7.0 + 500 mM NaCl + 300 mM Imidazol). Las fracciones con Tsp-Fdh fueron identificadas por SDS-PAGE, y posteriormente unificadas para ser dializadas (para eliminar el imidazol) y concentradas por ultrafiltración.

Ensayos cinéticos: La cinética de oxidación de formato se midió siguiendo la reducción del NAD^+ a 340 nm en condiciones aeróbicas. La mezcla de reacción estaba compuesta por 100mM KPB pH 7.0, 40 $\mu\text{g/mL}$ de Tsp-Fdh, y cantidades variables de NAD^+ (0.03 - 2 mM). La reacción se inició tras la adición de cantidades variables de formato de sodio (0.5-50 mM). La cinética de reducción

de CO₂ se midió siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm en condiciones anaeróbicas. Los ensayos se realizaron de forma similar, pero en 100 mM KPB pH 6.5, 1.5 mg/mL de Tsp-Fdh, y la reacción se inició tras la adición de cantidades variables de bicarbonato de sodio (25-100 mM).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Purificación: El uso de IMAC para la purificación de Tsp-Fdh resultó ventajoso ya que después de un único paso cromatográfico se consiguió purificar la enzima a grado electroforético (Fig. 1). Es de destacar que la banda observada en el gel se encuentra ligeramente arriba de lo esperado para una proteína de ca. 46 kDa. Sin embargo, esto puede deberse a que la técnica de SDS-PAGE proporciona masas moleculares aparentes, por lo que muchas proteínas se comportan de forma atípica, por ejemplo, uniendo más o menos moléculas de SDS por unidad de área, generando una relación masa/carga inhomogénea. Asimismo, proteínas hidrofóbicas y neutras (como la Tsp-Fdh), suelen migrar más lento de lo normal que proteínas básicas o ácidas.

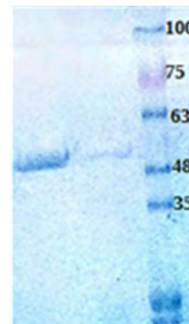


Fig.1: SDS-PAGE de Tsp-Fdh pura.

Cinética enzimática: en una primera fase se evaluó las propiedades cinéticas de Tsp-Fdh en cuanto a la oxidación de formato (reacción directa). Para ello se realizaron ensayos de actividad variando tanto la concentración de NAD⁺ como la de formato. Las gráficas de Hanes-Woolf ([formato]/V y [NAD]/V frente a diferentes concentraciones constantes de NAD y formato, respectivamente) se obtienen patrones donde las rectas se intersectan (Fig. 2). Esto indica que Tsp-Fdh no sigue un mecanismo tipo ping-pong (*substituted*), sino que se ajusta mejor a un modelo secuencial. Anteriormente, otros autores también concluyeron esto, y además

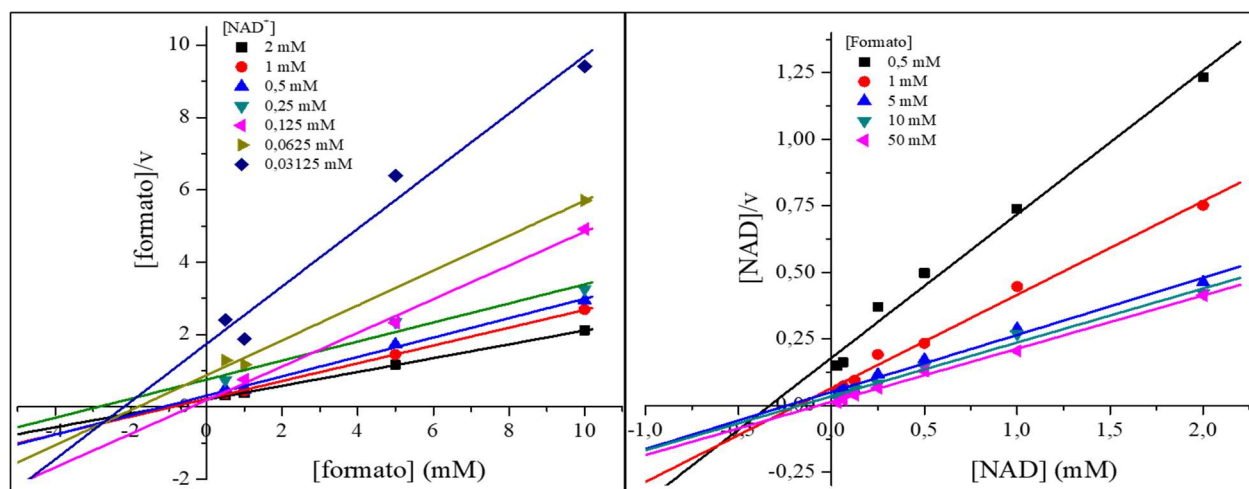


Fig 2. Gráficas de Hanes-Woolf de la cinética de oxidación de formato. Izquierda: formato como sustrato variable. Derecha: NAD⁺ como sustrato variable.

encontraron a través de ensayos de inhibición que las Fdh NAD-dependientes de plantas siguen un mecanismo secuencial ordenado (*compulsory order*) sin acumulación de complejos ternarios (Theorell-Chance), mientras que aquellas aisladas de procariotas siguen un mecanismo

secuencial aleatorio (*random*) con equilibrio rápido (Tishkov VI., Popov VO. 2004), o sea que el segundo sustrato posee afinidad aumentada por los complejos secundarios Fdh-NAD (EA) o Fdh-formato (EB) respecto de la enzima libre (E). Estos resultados están de acuerdo con nuestros estudios sobre el efecto isotópico del H-alfa del formato, donde observamos que cuando se reemplaza el formato con abundancia isotópica natural con formato marcado isotópicamente con deuterio, la V_{max} disminuye ~10 veces (Fig. 3). Nuestros resultados indican que Tsp-Fdh sigue un mecanismo secuencial con acumulación de complejo ternario EAB, y que el paso limitante de la reacción global es la ruptura del enlace C-H del formato, el cual ocurre para transferir de manera concertada un hidruro (H⁻) hacia el C4 de la función nicotinamida de la molécula de NAD⁺.

Una vez caracterizados los parámetros cinéticos de oxidación de formato, se estudió la capacidad

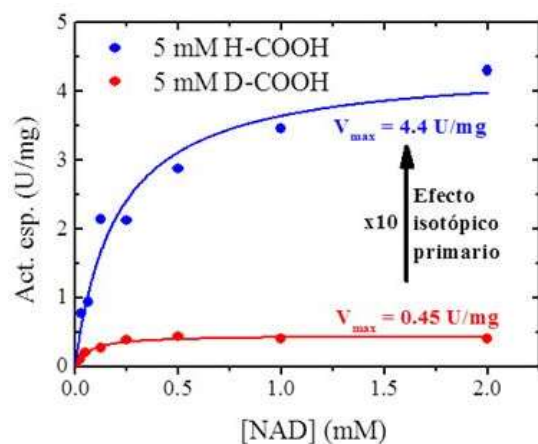


Fig 3. Gráfica de Michaelis-Menten donde se muestra el efecto isotópico primario del H-alfa del formato.

de Tsp-Fdh para catalizar la reducción de CO_{2(aq)} hacia formato usando NADH como donador de electrones. Utilizando bicarbonato de sodio (50 mM) como sustrato se pudo detectar la oxidación del NADH a concentraciones elevadas de Tsp-Fdh (~33 μM). Debido a esto último, no fue posible determinar parámetros cinéticos de acuerdo a un modelo tipo Michaelis-Menten. La máxima actividad específica obtenida al presente es de 10 mU/mg de Fdh, la cual es grande en comparación con otras Fdh dependientes de NAD, pero muy inferior a los valores obtenidos con Fdh dependientes de metales de transición (Mo o W y centros FeS).

En la actualidad estamos trabajando en inmovilizar la Tsp-Fdh en electrodos de grafito modificados.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Ayers WM**, 1994. Carbon dioxide chemistry: environmental issues. RSC, London, p.365.
- Choe H, Joo J., Cho D., Kim M., Lee SH, et al.**, 2014. Efficient CO-reducing activity of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for formate production from CO₂ gas. PLoS ONE 9(7): e103111.
- Choe H., Jung M., Jeong C., Hyunook K., Hye-Jin Y., Seonghoon K., Sang H., Robert M., Taeg S., Rakwo C., Kwang D., Yong H., Hyung H.**, 2015. Structural insights into the efficient CO₂-reducing activity of an NAD-dependent formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA. Acta Cryst. D71, 313–323.
- Namba H., Takaoka Y., Hasegawa J.**, 2003. Purification and characterization of an α-Haloketone-resistant formate dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. strain KNK65MA, and cloning of the gene, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 67:10, 2145-2153.
- Oloman C., Li H.**, 2008. Electrochemical processing of carbon dioxide. ChemSusChem 1(5), 385-391.
- Reutemann W, Kieczka H.**, 2002. Formic acid. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim.
- Tishkov VI., Popov VO.**, 2004. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. Biochemistry (Mosc.) 69: 1252–1267.