

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Bentivegna, Sofía

Becaria de la Fundación Banco de Santa Fe. Laboratorio de Enzimología Molecular, IAL, UNL-CONICET

Área temática del proyecto: Ciencias biológicas; sub-área: Biotecnología; grupo Y

INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad que se tiene actualmente por reducir el nivel de contaminantes presentes en la atmósfera surge la necesidad de buscar nuevas soluciones que contribuyan al mejoramiento de estos problemas. Los combustibles verdes son una solución energética amigable con el medio ambiente y el mayor uso de éstos brinda la oportunidad de reducir la dependencia con los combustibles fósiles como también de disminuir la contaminación ambiental, debido a que causa un efecto notablemente menor sobre el medio ambiente.

Las hidrogenasas son enzimas que catalizan de modo reversible la oxidación de hidrógeno molecular (H_2) a protones (H^+). En el sentido de oxidación de hidrógeno molecular la reacción está acoplada a la reducción de aceptores de electrones tales como oxígeno molecular, nitrato, sulfato, dióxido de carbono, y fumarato. Por otro lado, en el sentido de la reducción de protones, la reacción está acoplada a la oxidación de los donantes de electrones tales como ferredoxina (vía FNR), y sirve para eliminar un exceso de potadores de equivalentes de reducción en las células (esencial en la fermentación de piruvato). Se pueden distinguir tres tipos de hidrogenasas en función del tipo de grupo prostético bioinorgánico: el primer grupo incluye a aquellas que contienen dos núcleos de Fe en su estructura (Fe-Fe hidrogenasas), el segundo grupo incluye a las que tienen un átomo de Ni y uno de Fe (Ni-Fe hidrogenasas), y finalmente existen un hidrogenasas que poseen un solo átomo de Fe (Fe-hidrogenasas). Desde su descubrimiento, las hidrogenasas han despertado el interés de muchos investigadores desde aspectos básicos del conocimiento hasta su utilización en aplicaciones para la obtención de fuentes biológicas de energía "límpia".

En este proyecto se ha decidido trabajar con unas Fe-hidrogenasas de *Entamoeba histolytica*, ya que es un organismo de estudio del laboratorio donde se desarrolla el proyecto. Esta ameba contiene genes que codifican dos tipos de hidrogenasas, una hidrogenasa más larga (1536 bp, que hemos denominado *EhHyd60*) y otra más corta (1407 bp, que llamamos *EhHyd90*).

OBJETIVOS

En este trabajo se propone estudiar la funcionalidad y utilidad de proteínas con actividad hidrogenasa para la generación de hidrógeno mediante sistemas enzimáticos *in vitro* e *in vivo*.

METODOLOGÍA

Expresión y purificación de HCP: los ORFs codificantes de *EhHyd60* y *EhHyd90* fueron amplificados por PCR mediante el uso de oligonucleótidos específicos. Los productos fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega) y las construcciones se utilizaron para transformar bacterias *Escherichia coli* Top10 F'. Se realizó una minipreparación de ADN plasmídico (kit comercial de Promega) y las construcciones obtenidas se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas para ligar los fragmentos de ADN a los vectores de expresión escogidos. Todas las ligaciones se realizaron usando T4 ADN ligasa durante 16h a 4°C. Las hidrogenasas se expresaron de manera recombinante (con un His-Tag N-terminal) en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado.

Medidas de actividad: todos los ensayos enzimáticos se realizaron de manera espectrofotométrica a 30 °C (en un volumen final de 50 µl) usando un fotómetro Multiskan Ascent (Thermo Electron Co.). Las mediciones de actividad hidrogenasa se realizaron monitoreando la oxidación de NADH a 340 nm. La mezcla de reacción estaba compuesta por NADH 300 µM, NADH-rubredoxina oxidoreductasa 1 µM, rubredoxina 10 µM y concentraciones de *EhHyd90* que iban de 0 a 18 µM. Además, se usó *buffer* fosfato 100 mM pH 7,0. En las mediciones con el sistema acoplado de depleción de O₂ se usó glucosa 10 mM, glucosa oxidasa 50 U/mL, catalasa 400 U/mL y superóxido dismutasa 50 U/mL.

Diseño de los fermentadores: los fermentadores fueron construidos con matraces de tipo erlenmeyers de 100 mL. Para lograr la anaerobiosis, se burbujeó N₂ en el medio a través de uno de tubos metálicos que contenían los tapones con los que se cerraron los fermentadores. Los gases generados en los fermentadores se recolectaron en una bolsa recolectora de gases (bolsas Tedlar®). Los fermentadores se cerraron convenientemente, para impedir el ingreso o egreso de gases.

Evaluación de la producción de hidrógeno a pequeña escala: las bacterias se cultivaron toda la noche en agitación a 37 °C en medio LB. Luego el cultivo fue diluido 1/25 en medio fresco y se incubó en idénticas condiciones hasta alcanzar una D.O. ≈ 1,0. Posteriormente, se indujo la expresión de los genes codificantes para las hidrogenasas (*EhHyd60* y *EhHyd90*) clonados en los vectores pCold-1. Finalizada la inducción, se diluyeron los cultivos con medio de cultivo fresco de modo de normalizar la D.O.. Los cultivos ya diluidos y con la D.O. correspondiente fueron dispensados en los fermentadores previamente descritos. Una vez lograda la anaerobiosis y cerrado el sistema, los erlenmeyers se incubaron durante 3 semanas a 37 °C estáticos.

Cromatografía gaseosa: Todas las muestras colectadas en bolsas Tedlar se analizaron empleando un cromatógrafo de gases (GC-2014, Shimadzu)

RESULTADOS

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes: ambas hidrogenasas fueron expresadas exitosamente de manera recombinante usando el vector de expresión pCold-1 (Takara) en bacterias de *E. coli* BL21(DE3) y se pudieron purificar mediante una IMAC.

Espectroscopía UV-VIS: en el espectro UV-VIS de *EhHyd90* obtenida de manera recombinante (**figura 1**) se puede observar el perfil característico de una Fe-hidrogenasa, con una zona de absorción alrededor de los 360 nm y los 440 nm, correspondiente a la

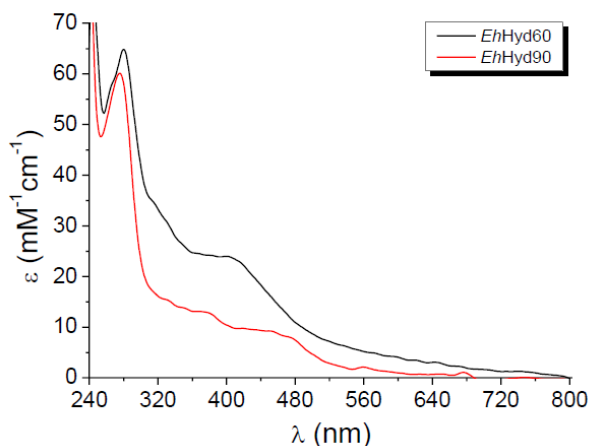


Figura 1: Espectro UV-Vis de *EhHyd60* y *EhHyd90* recombinantes purificadas mediante IMAC.

zona de absorción de los cofactores bioinorgánicos de la proteína. Esto estaría indicando que la proteína recombinante se pudo purificar como holoenzima. De manera análoga, se pueden observar los picos de absorción de la proteína *EhHyd60*. Se observan picos de absorción a los 320 nm y 400 nm. Estos están determinados por los cofactores inorgánicos que presenta la proteína, lo que estaría indicando que la misma ha sido purificada como holoenzima.

Ensayos de funcionalidad *in vitro*: se analizó la funcionalidad *in vitro* de la proteína Hyd90 obtenida de manera recombinante y purificada anteriormente. Se buscó medir actividad hidrogenasa, para lo cual se utilizó un sistema enzimático acoplado *in vitro*. En una primera experiencia, se observó un consumo de NADH que indicaba que existía un flujo de electrones en el sistema utilizado. Como el medio de reacción contenía O₂, ya que las mediciones se realizaron en aerobiosis, se decidió analizar la actividad hidrogenasa adicionando al medio de reacción un sistema enzimático capaz de depletar el oxígeno disuelto en el medio de reacción. Al realizar las mediciones en estas condiciones no se observó un consumo apreciable de NADH, lo que indicaría que en el primer ensayo la Hyd90 estaría actuando como oxidasa en lugar de como hidrogenasa, cediéndole los electrones al O₂ del medio en lugar de a los protones del medio. Una explicación de este resultado es que la proteína podría no estar completamente madura (es decir, que no presente el cluster H químicamente funcional).

Mejoramiento de la expresión recombinante de las hidrogenasas: teniendo en cuenta los problemas relacionados a la expresión y solubilidad de las hidrogenasas encontrados durante el desarrollo del trabajo, y en vista de no haber podido medir actividad hidrogenasa de la Hyd90, se planteó la idea de realizar la expresión de la Hyd90 y la Hyd60 con ayuda de proteínas chaperonas que ayudan al ensamblaje del cluster H de las

Fe-Fe hidrogenasas. El Dr Paul King del *Basic Sciences Center, National Renewable Energy Laboratory* nos cedió gentilmente dos construcciones recombinantes que expresaban chaperonas que ayudan en el ensamblaje del cluster¹. Con estas herramientas se co-transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) de manera de obtener distintas transformantes que contuvieran las construcciones génicas que expresaran las hidrogenasas en estudio y las chaperonas, además de los controles negativos y positivos correspondientes.

Ensayos de producción de hidrógeno *in vivo*: para evaluar la capacidad de producción de hidrógeno de las transformantes anteriormente mencionadas, se realizaron ensayos *in vivo* a pequeña escala, donde se utilizaron pequeños fermentadores construidos con erlenmeyers de 100 mL (**figura 2.a**). Pasado el período de incubación, se inyectó el gas producido por los fermentadores en un cromatógrafo gaseoso y se analizaron los perfiles cromatográficos. Esta tarea fue realizada en colaboración con el Dr. Esteban Sánchez y el Dr. Raúl Comelli (INCAPE - CONICET).

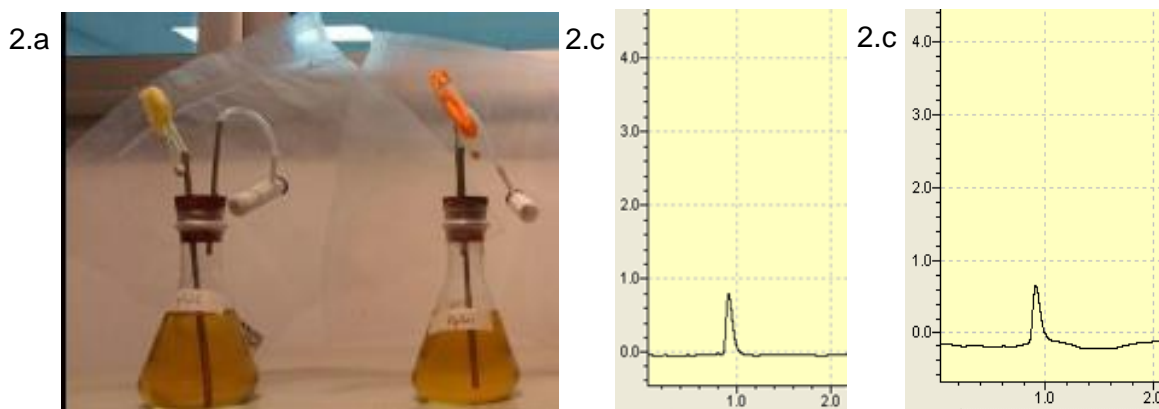


Figura 2.a: pequeños fermentadores para producir hidrógeno a pequeña escala; 2.b: cromatograma del gas producido por la transformante que expresaba la *EhHyd60* y las chaperonas; 2.c: cromatograma del gas producido por la transformante que expresaba la hidrogenasa usada como control positivo.

Los ensayos de fermentaciones usando las bacterias transformantes que contenían las construcciones génicas codificantes para la *EhHyd60* mostraron una producción apreciable de hidrógeno, comparable con la obtenida con una hidrogenasa de *C. acetobutylicum* estudiada anteriormente por otros investigadores (**figuras 2.b y 2.c**). Es importante destacar que son necesarios estudios posteriores sobre las condiciones de fermentación para optimizar la producción del hidrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- King, P. W. *et al.* Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System. *J. Bacteriol.* **188**, 2163–2172 (2006).