

# Optimización de la producción recombinante en *Escherichia coli* de la enzima N-acetil glucosamina oxidasa en un sistema libre de antibióticos

Gerard Guerra-Mas, Yerko Fredes, Iván Dimitri, Óscar Romero, Marina Guillén, Gloria González y Antoni Casablanca  
gerard.guerra@uab.cat

Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España

## INTRODUCCIÓN

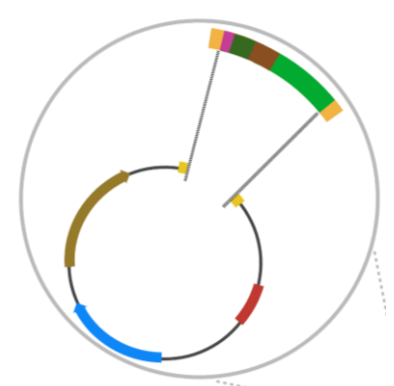
El proyecto OXIPRO tiene como objetivo el diseño de un proceso, desde la mejora computacional de la enzima, la optimización de la expresión de la enzima, hasta la implementación de un sistema enzimático con oxidorreductasas como alternativa sostenible al proceso de tratamiento industrial de fibras de algodón. La enzima de estudio, la N-acetil glucosamina oxidasa L251R es capaz de oxidar los carbohidratos liberados durante el tratamiento del algodón produciendo peróxido de hidrógeno para el tratamiento *in situ* del algodón [1].

Se desarrolla un proceso de producción de la enzima en cultivo de alta densidad celular con la cepa de *Escherichia coli* M15ΔglyA en un sistema libre de antibióticos [2]. Además, se detalla el mecanismo de purificación e inmovilización en un solo paso mediante la fusión de la enzima a *celulose binding module 3* (CBM3) para la inmovilización en celulosa [3]. En este caso de estudio, además, la inmovilización y purificación sobre celulosa presenta mayor especificidad que la purificación por cola de histidinas permitiendo eliminar las catalasas producidas por *E. coli* que son capaces de metabolizar el peróxido de hidrógeno producido.

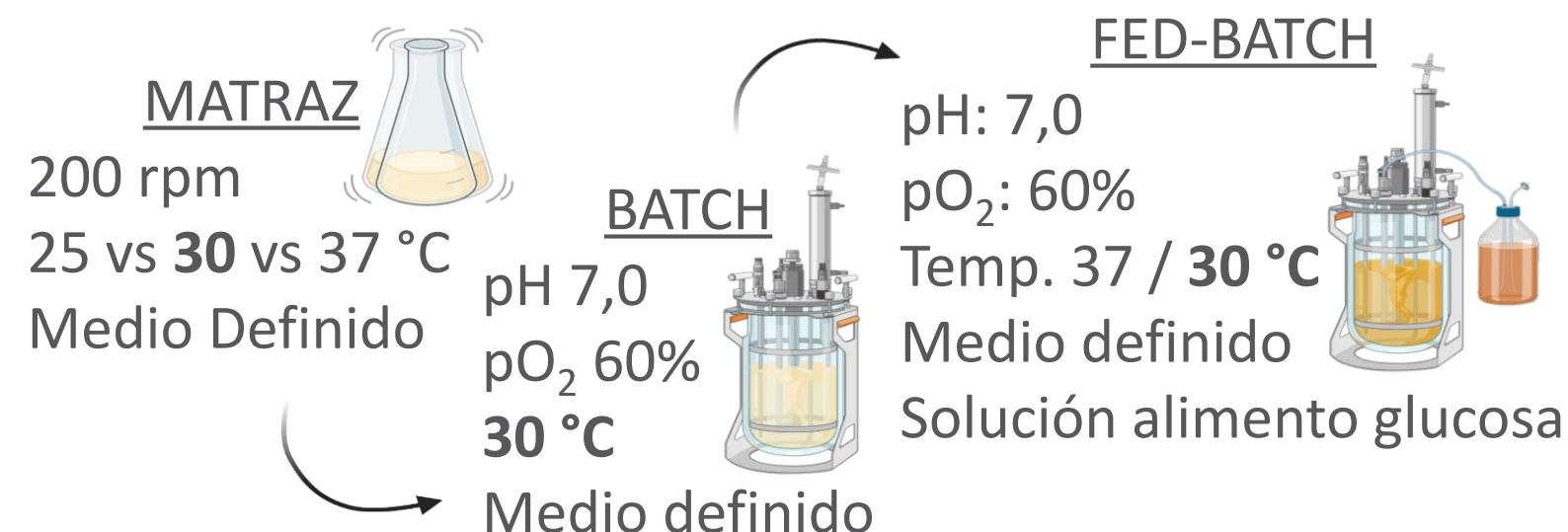
## MATERIALES Y MÉTODOS

### CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

Inserto: His-SUMO-CBM3 / His-SUMO + NagOxL251R  
Cepa: *E. coli* DH5α  
Vector: pVEF:Smal  
Método: SLIC



### PRODUCCIÓN EN DISTINTOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN

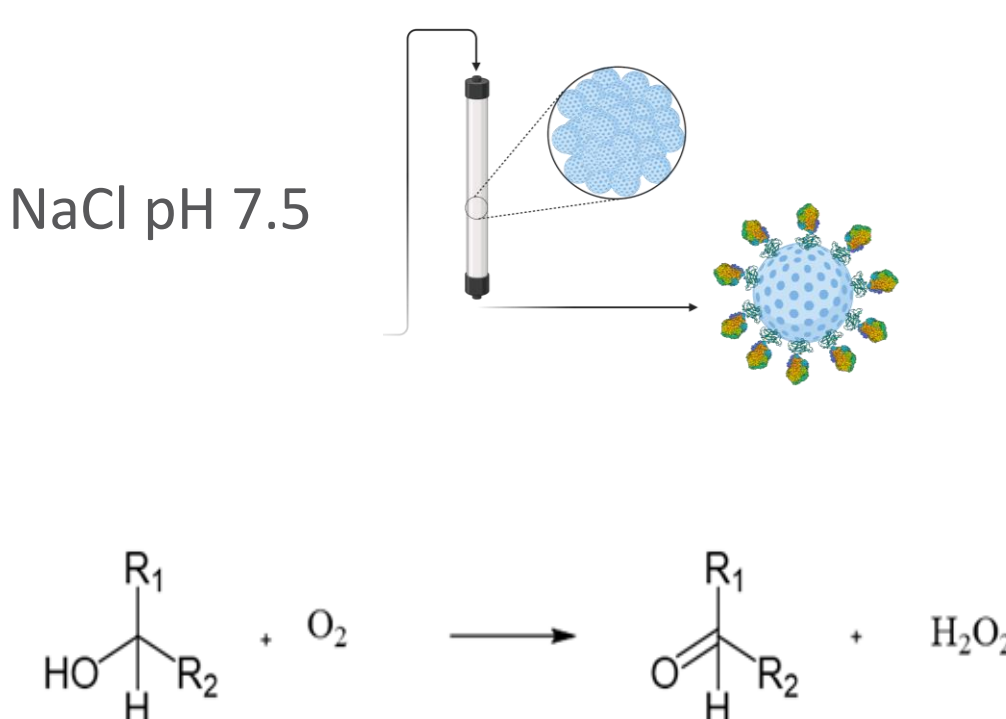


### PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN

Equipo: AKTA FPLC  
Tampón: Lisis 100 mM kPi, 500 mM NaCl pH 7.5  
Relación 1:10 soporte:lisado  
Temperatura: Ambiente

### ANÁLISIS DE ACTIVIDAD

Tampón: 50 mM Britton-Robinson  
Condiciones: pH 8.0 y 50°C  
Sustrato: 50 mM glucosa



## RESULTADOS

### CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN

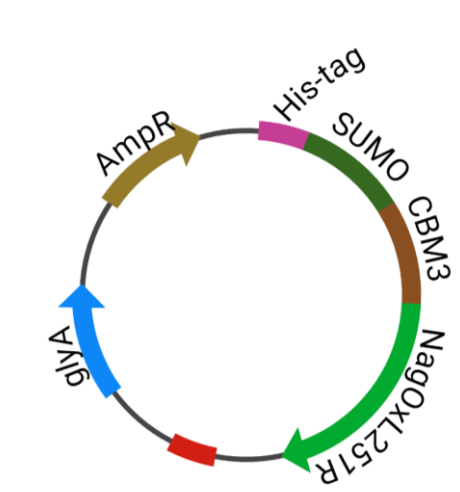


Figura 1: Construcción His-SUMO-CBM3-NagOxL251R insertada en el vector pVEF.

La cepa utilizada en la producción de la enzima es *E. coli* M15 deficiente en el gen *glyA*. Este gen permite la interconversión de la glicina con los aminoácidos L-treonina y serina.

Mediante el método SLIC (*sequence- and ligation-independent cloning*) la construcción His-SUMO-(CBM3)-NagOxL251R es clonada en el plásmido pVEF. Este vector contiene el gen *glyA* permitiendo el mantenimiento del plásmido en un sistema libre de antibióticos.

### PRODUCCIÓN EN DISTINTOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN

La **intensificación** del cultivo se realiza mediante una fase batch a 37°C seguido de una fase en fed-batch a 30°C en un volumen final de 2 L. La temperatura óptima de inducción se establece en matraz y se realiza una producción en batch a la misma temperatura para establecer los datos de actividad de partida.

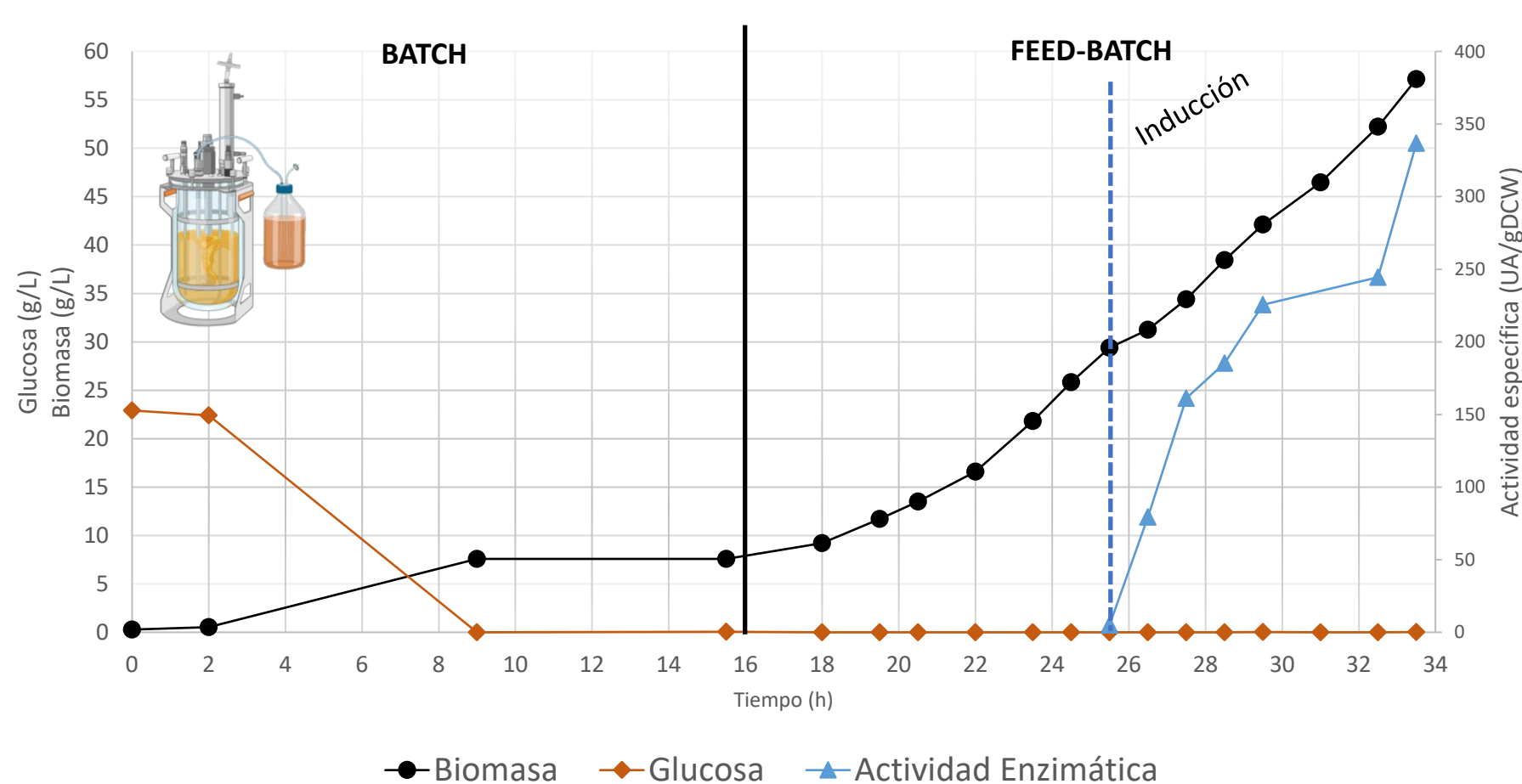


Figura 2: Perfil de la producción de la enzima His-SUMO-CBM3-NagOxL251R en Fed-Batch de *E. coli* M15ΔglyA pVEF a 37 °C durante la fase batch y 30 °C durante la fase fed-batch, 60% pO<sub>2</sub>, pH 7.0.

En los tres sistemas de expresión se alcanzan niveles parecidos de actividad específica, pero el sistema de producción en fed-batch incrementa la actividad volumétrica 12 veces y la productividad se multiplica por 5 (Tabla 1).

Tabla 1: Datos de actividad específica, actividad volumétrica y productividad en los tres sistemas de expresión utilizados: matraz, batch y fed-batch.

ESTRATEGIA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UA/gDCW)	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA (UA/L)	PRODUCTIVIDAD (UA/L·h)
Matraz	322.1	753.4	68.5
Batch	296.5	1594.2	107.1
Fed-Batch	336.9	19250.0	574.6

### PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN

La **purificación** de la enzima no fusionada con CBM3 por afinidad con Sepharosa-Níquel se lleva a cabo a una concentración de imidazol basal de 20 mM durante el lavado y se incrementa a 100 mM en escalón para la elución. El resultado es una mayor actividad catalasa y no se obtiene peróxido de hidrógeno (Figura 4).

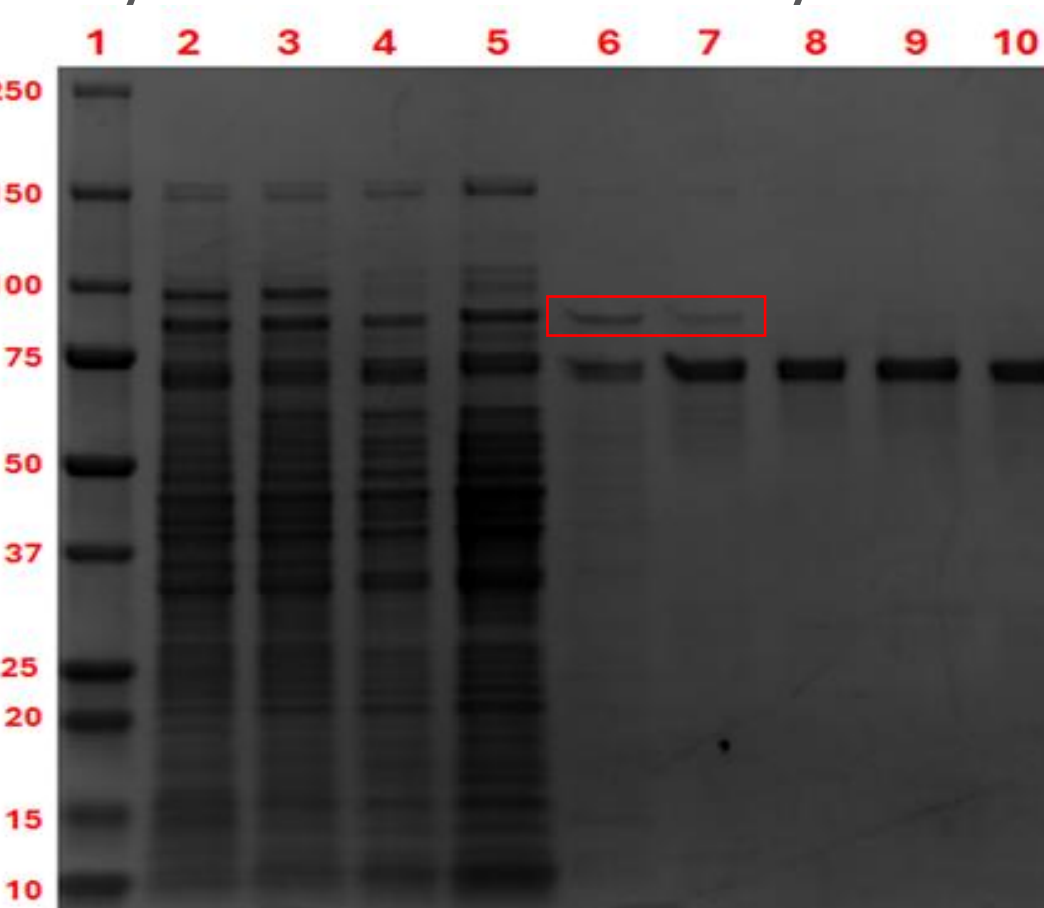
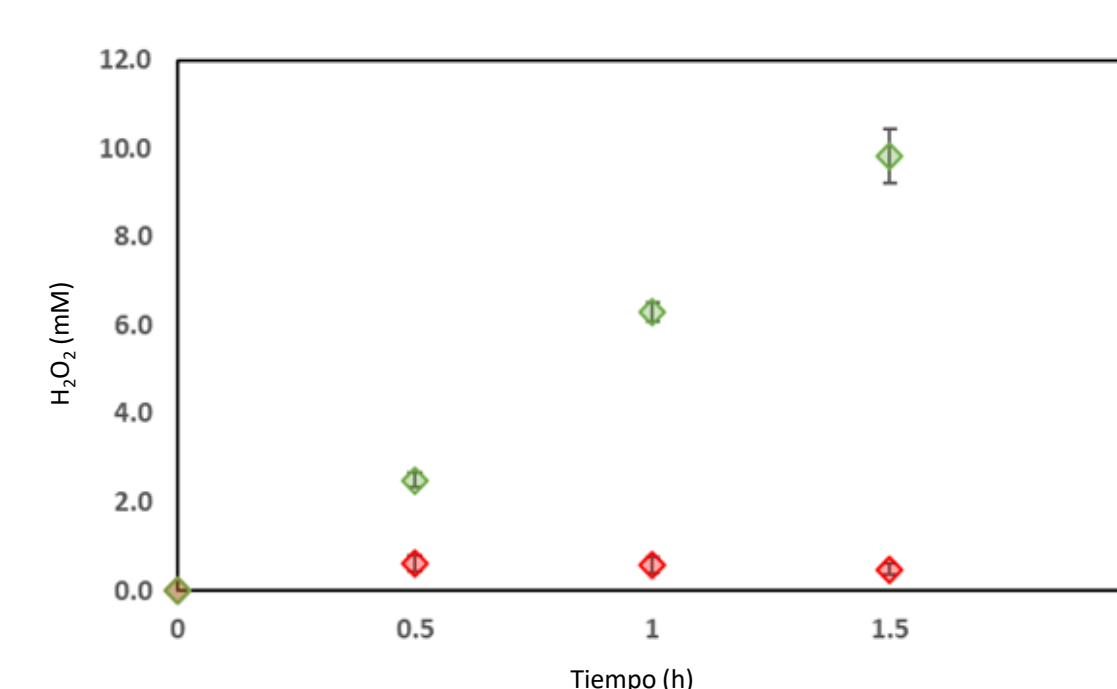


Figura 3: Gel SDS-Page de la His-SUMO-NagOxL251R de las distintas fracciones de purificación en Sepharosa-Níquel. Resaltado en rojo se puede observar la presencia de catalasa HPII de *E. coli* en las fracciones de elución.

La purificación se optimiza mediante un **pretratamiento térmico** (60°C – 15 min.) del lisado (Figura 3 columnas 2) aumentando la proporción de enzima de interés (Figura 3 columna 4). Además, se aumenta la concentración de imidazol durante el lavado a 50mM y el incremento se realiza en **gradiente** favoreciendo la desorción de la catalasa en las primeras etapas de la elución (Figura 3 columnas 6 y 7).

### ANÁLISIS DE ACTIVIDAD

La producción de peróxido de hidrógeno con la enzima His-SUMO-NagOxL251R siguiendo el método no optimizado es prácticamente nula.



La aplicación del nuevo protocolo reduce la ratio actividad catalasa/oxidasa de 2 a 0,1 permitiendo la acumulación de peróxido de hidrógeno (Figura 4).

Figura 4: Producción de peróxido de hidrógeno con His-SUMO-NagOxL251R: (◇) ratio de actividad CAT/OX de 2 y (◊) ratio de actividad CAT/OX de 0,1.

Finalmente, se compara la **inmovilización** de la enzima fusionada a CBM3 en soporte Sepharosa-Níquel y Perloza mostrando que la unión específica solo se da en soporte de celulosa (Tabla 2).

SOPORTE	ACTIVIDAD OXIDATIVA (UA/g <sub>sopORTE</sub> )	ACTIVIDAD CATALASA (UA/g <sub>sopORTE</sub> )
Sepharose – Níquel	5,4	51,3
Perloza® MT100	19,7	0

Tabla 2: Actividad oxidativa y catalasa de la enzima His-SUMO-CBM3-NagOxL251R inmovilizada en Sepharosa-Níquel y Perloza MT100.

## REFERENCIAS

- [1] Boverio A, et al. *Biochemistry*. 2023 Jan 17;62(2):429-436.
- [2] Pasini M, et al. *N Biotechnol*. 2016 Jan 25;33(1):78-90.
- [3] Benito, M. et al. *J Biol Eng* 2022 16, 16.

## CONCLUSIONES

El proceso de intensificación del cultivo mediante una estrategia en fed-batch supone una mejora enorme del proceso en términos de productividad y enzima total producida. El uso de un soporte en celulosa permite en un solo paso la inmovilización y purificación de la enzima de forma altamente específica.

## COORDINACIÓN Y GESTIÓN

Coordinación del proyecto: Dr. Gro Bjerga NORCE (NO) grbj@norceresearch.no  
Gestión del proyecto: Anne Dorthea Maeland (NO) anma@norceresearch.no  
Difusión del proyecto: Lesley Tobin, REDINN (IT) hello@oxipro.eu

## AGRADECIMIENTOS

Este Proyecto recibe financiación del programa de investigación e innovación European Union's Horizon 2020 No 101000607



Este trabajo recibe financiación del programa AGAUR de la Generalitat de Catalunya (2021 SGR 00143)



hello@oxipro.eu www.oxipro.eu

@OXIPRO\_EU  
https://www.linkedin.com/company/oxipro.eu/