

# CARACTERIZACIÓN DE UNA FERULOIL ESTERASA DE *LACTOBACILLUS FERMENTUM*

Abeijón Mukdsi M.C.<sup>1,2</sup>, Plaza Vinuesa L.<sup>2</sup>, Medina R.<sup>1</sup>, Muñoz R.<sup>2</sup>, de las Rivas B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Tucumán, Argentina. <sup>2</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid.



E-mail: cabeijon@cerela.org.ar



## INTRODUCCIÓN

Las feruloil esterases (FE) son enzimas responsables de la liberación de ácidos hidroxicinámicos (AH), tales como el ácido ferúlico, cafeico, *p*-cumárico y sinápico, a partir de sus formas esterificadas no biodisponibles presentes en la pared celular de cereales, frutas y verduras. Estos ácidos son compuestos fenólicos con demostrada actividad antioxidante. Numerosos estudios relacionan el consumo de alimentos ricos en AH con una menor incidencia de enfermedades asociadas a desequilibrios en el estado oxidativo del organismo, como diabetes tipo 2, obesidad, síndrome metabólico, entre otras.

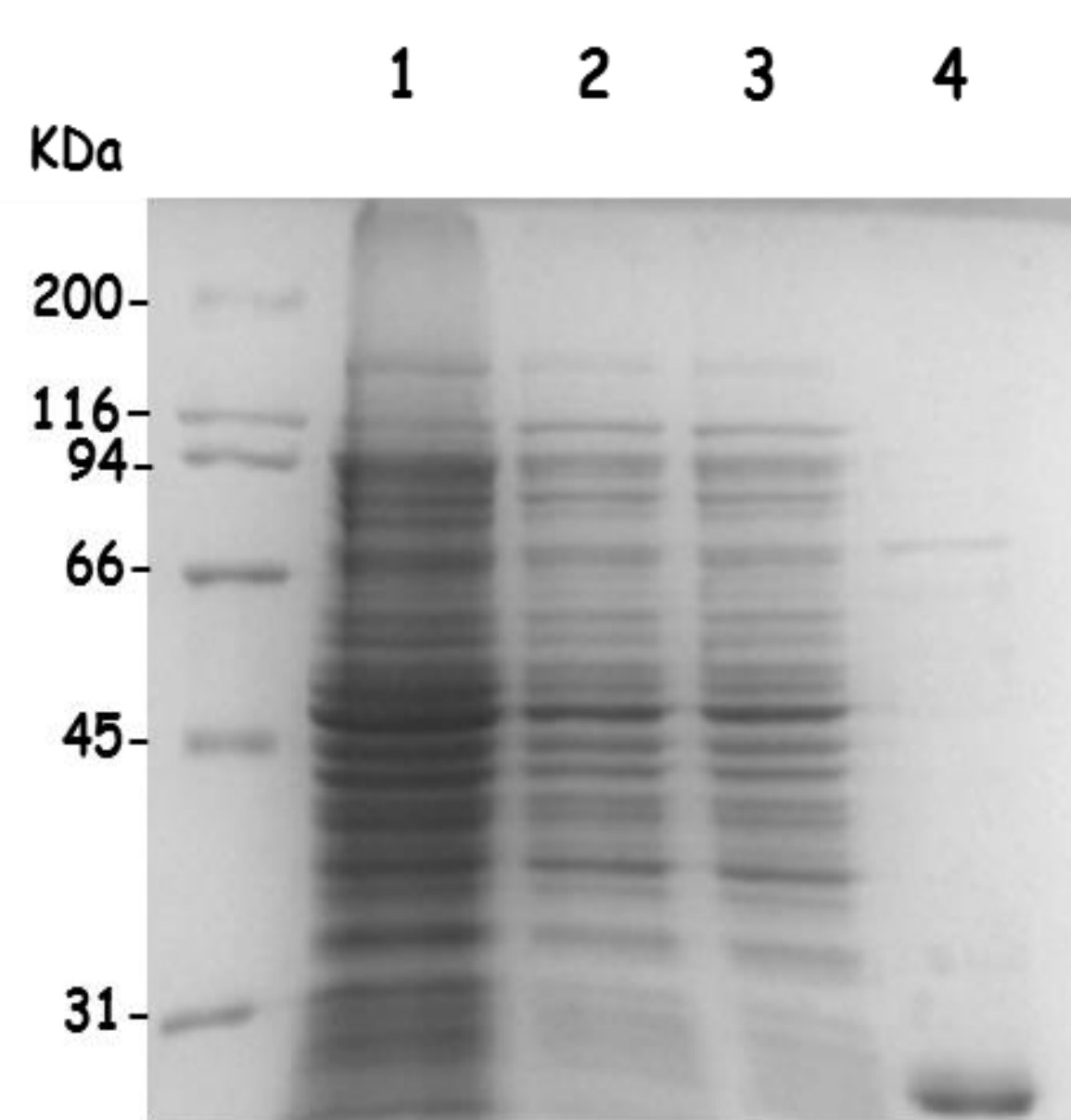
Las FE son producidas por distintos géneros bacterianos presentes en el intestino humano y animal y se han descrito en algunas cepas aisladas de alimentos, principalmente lactobacilos. No obstante, existe muy poca información sobre FE de *L. fermentum*.

Estudios previos evidenciaron que la administración de *L. fermentum* CRL1446, cepa probiótica con actividad FE, mejora el estado oxidativo y metabólico de ratones sometidos a diferentes dietas de malnutrición. Dado que las FE jugarían un rol fundamental en el efecto beneficioso sobre la salud del huésped, resulta de interés caracterizar las mismas.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la enzima responsable de la actividad FE en *L. fermentum* CRL1446

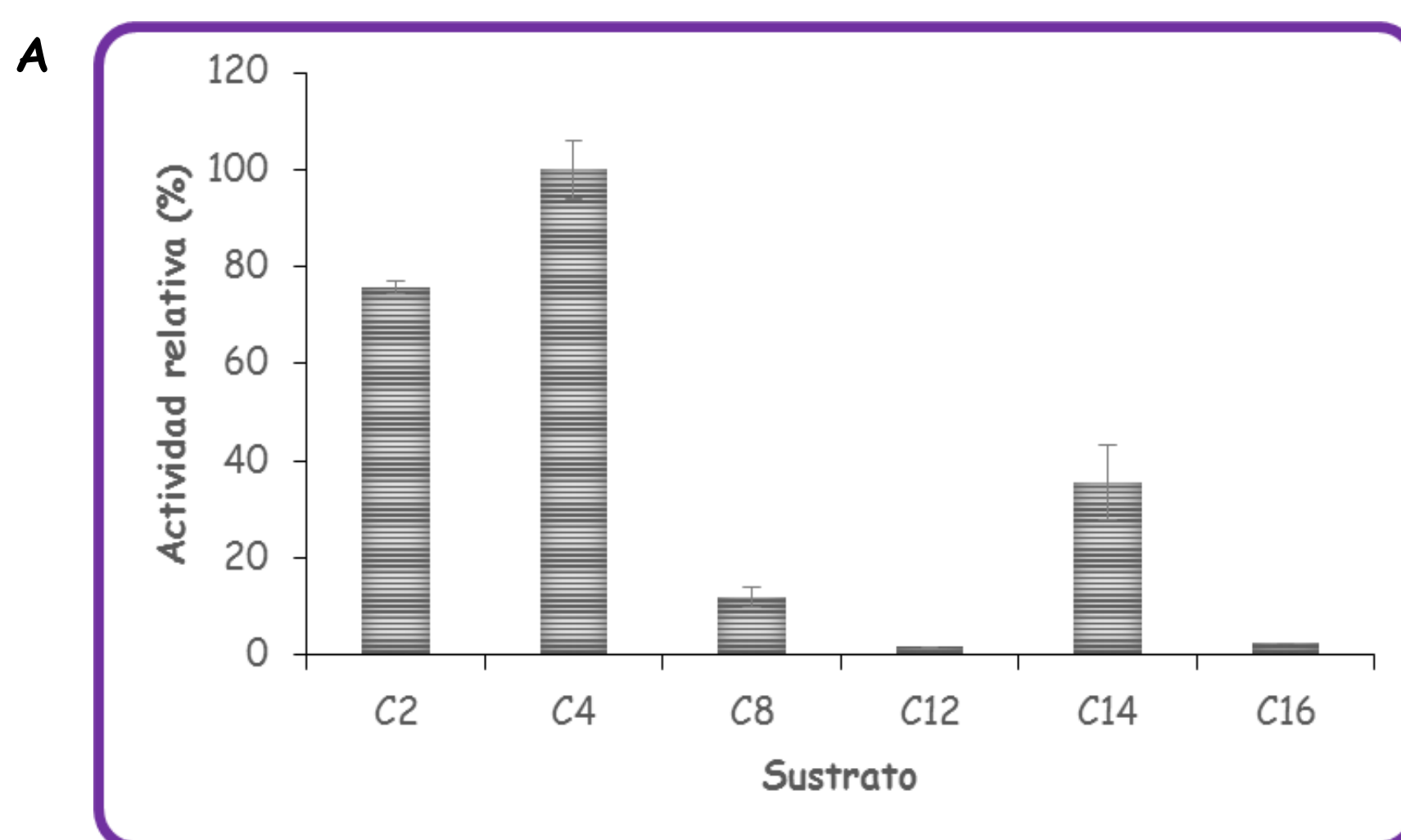
## RESULTADOS



Se logró hiperproducir una proteína de masa molecular aproximada de 27 KDa

FIGURA N° 1: Hiperproducción y purificación de la esterasa recombinante Lf\_1272 de *L. fermentum*

Gel SDS-PAGE al 12,5% de acrilamida. 1: extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG; 2: extracto proteico soluble de células inducidas de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-Lf\_1272); 3: fracción eluida no retenida en la columna de afinidad; 4: proteína purificada.



Lf\_1272 presentó mayor especificidad de sustrato frente a *p*-nitrofenil-derivados de cadena corta (*p*-NP-C4).

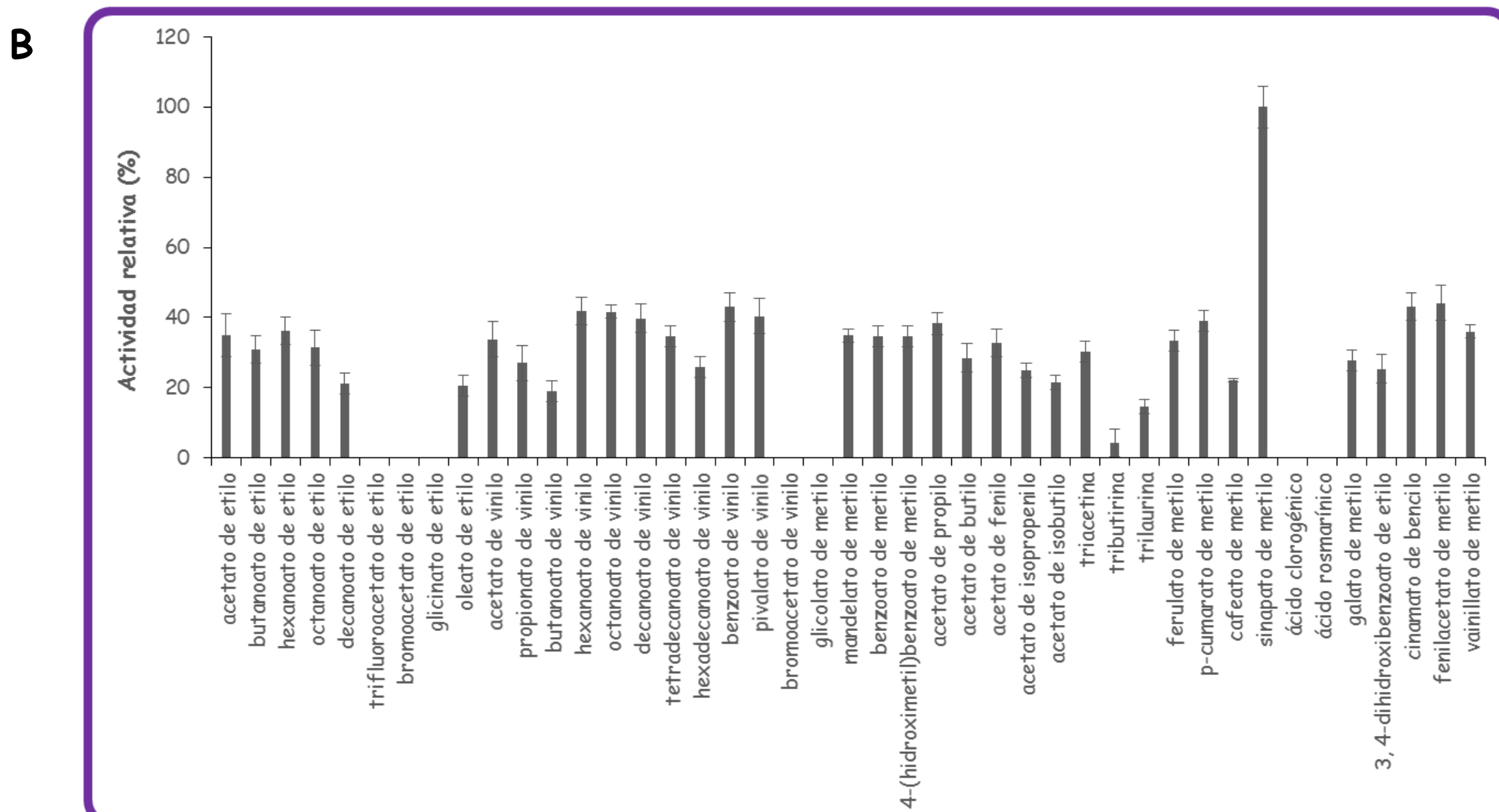


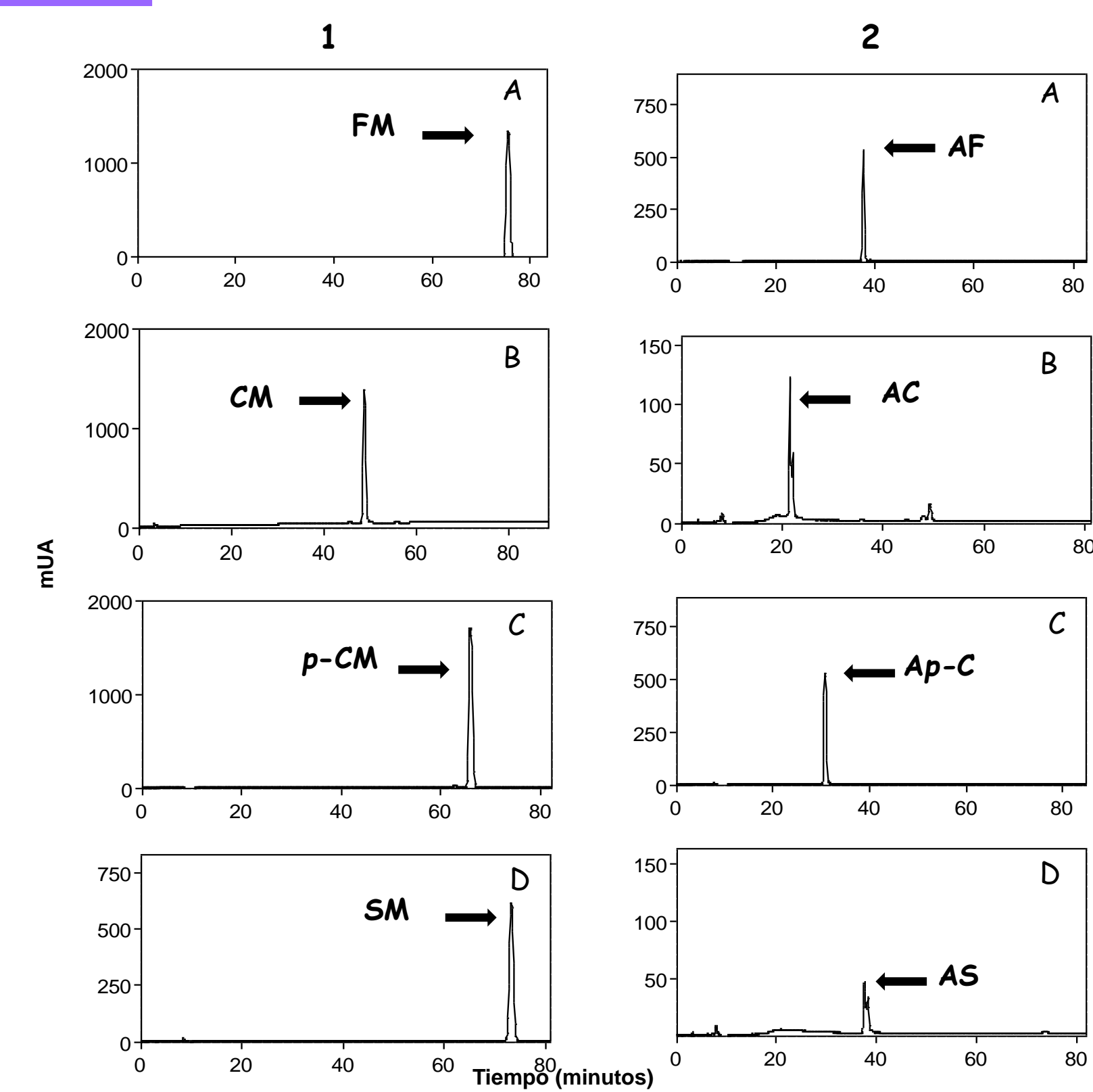
FIGURA N° 2: Especificidad de sustrato de Lf\_1272

(A) frente a sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de cadena acilo (C2, acetato; C4, butirato; C8, caprilato; C12, laurato; C14, miristato; C16: palmitato). (B) frente a una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos (media  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes). La máxima actividad obtenida se definió como el 100%

De los 43 ésteres ensayados en la librería, Lf\_1272 presentó una mayor actividad hidrolítica sobre sinapato de metilo e hidrolizó los demás sustratos modelo de actividad FE (ferulato, cafeato y *p*-cumarato de metilo), evidenciando que es una FE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Microorganismo y condiciones de cultivo:** *Lactobacillus fermentum* CRL1446 (cepa probiótica aislada de queso artesanal de leche de cabra del Noroeste Argentino) fue previamente seleccionada por su capacidad de hidrolizar ésteres hidroxicinámicos *in vitro*. La cepa se cultivó en medio MRS caldo (37°C 16h).
- Amplificación del gen que codifica una posible esterasa:** Se aisló ADN genómico a partir de un cultivo *overnight* mediante lisis alcalina. Se amplificó por PCR el gen que codifica una posible esterasa (GenBank PNV58462.1) empleando cebadores específicos con regiones 5' complementarias a regiones presentes en los vectores de expresión (técnica de clonación independiente de ligación).
- Clonación y sobreexpresión del gen:** La clonación se llevó a cabo en el vector de expresión pURI3-Cter que añade una cola de His a la proteína para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. Para la propagación y sobreexpresión del gen se utilizaron las cepas *Escherichia coli* DH10B y BL21 (DE3), respectivamente. Los clones recombinantes se cultivaron (22°C, 20h, 1400 rpm) en medio LB con ampicilina utilizando isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor de la expresión del gen.
- Purificación de la esterasa recombinante de *L. fermentum*:** Los cultivos inducidos se lisaron empleando una prensa French. A partir del extracto soluble obtenido se purificó la proteína de fusión recombinante (His6-Lf\_1272) por cromatografía de afinidad, utilizando una resina de unión a cobalto (Talon®, Clontech). La pureza de la enzima se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).
- Determinación de la actividad FE de Lf\_1272:** Se evaluó la capacidad de Lf\_1272 (100  $\mu$ g de proteína) para hidrolizar sustratos modelo de actividad FE (metil ferulato, cafeato, cumarato, sinapato; 1mM) tras 16h de incubación a 37°C. Los ácidos hidroxicinámicos liberados se detectaron mediante HPLC (columna C18). Los compuestos se monitorizaron a 280 nm.
- Especificidad de sustrato:** Se determinó mediante un método espectrofotométrico frente a sustratos cromogénicos (*p*-nitrofenil-ésteres de ácidos grasos de C2 a C16, 0,5 mM). Tras 10 min de incubación (10  $\mu$ g proteína) a 37°C las reacciones se detuvieron en hielo y se midió absorbancia a 348 nm. El perfil de sustratos sobre los cuales actúa la enzima se evaluó usando una librería de ésteres y *p*-nitrofenol como indicador de pH para monitorizar la hidrólisis de ésteres colorimétricamente (410 nm).
- Efecto de temperatura, pH y aditivos sobre la actividad esterasa:** La actividad enzimática (10  $\mu$ g proteína) se determinó frente a 1 mM pNP-C4 tras 10 minutos de reacción ( $A_{348\text{nm}}$ ). Ver detalles al pie de la figura 4.



La capacidad de Lf\_1272 de hidrolizar sustratos modelo de actividad FE confirma que esta enzima es una feruloil esterasa.

FIGURA N° 3: Hidrólisis de ésteres de ácidos hidroxicinámicos por la feruloil esterasa Lf\_1272 analizada mediante HPLC.

Panel 1 (izquierda): Controles sin enzima incubados en presencia de A: ferulato de metilo (FM), B: cafeato de metilo (CF), C: *p*-cumarato de metilo (*p*-CM) y D: sinapato de metilo (SM). Panel 2 (derecha): Ácidos hidroxicinámicos liberados por acción de Lf\_1272 incubada en presencia de los ésteres respectivos. A: ácido ferúlico (AF), B: ácido cafeico (AC), C: ácido *p*-cumárico (Ap-C), D: ácido sinápico (AS). mAU: unidades arbitrarias.

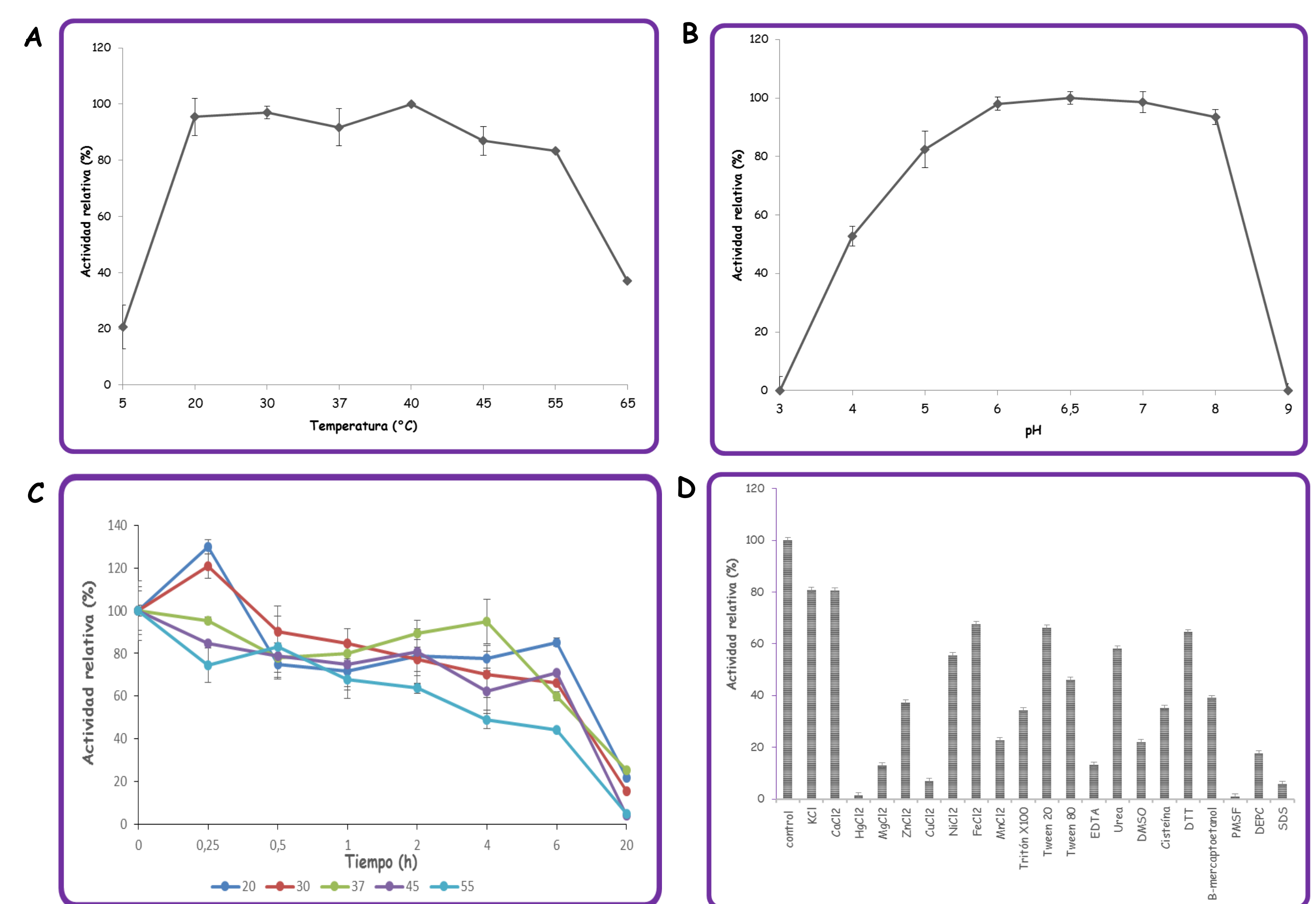


FIGURA N° 4: Características bioquímicas de la feruloil esterasa Lf\_1272

(A) Efecto de la temperatura en la actividad enzimática (reacciones en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 e incubadas entre 5 y 65°C). (B) Efecto del pH en la actividad enzimática (reacciones en buffers de distintos pH entre 3 a 9 e incubadas a 37°C). (C) Estabilidad térmica (la enzima se incubó a 20, 30, 37, 45 y 55°C en tampón fosfato pH 7 y por distintos tiempos previo a determinar su actividad). (D) Efecto de iones metálicos y aditivos en la actividad enzimática (reacciones en tampón fosfato pH 7 adicionado de 1 mM de aditivo e incubado a 37°C). Control= sin aditivo. Se representa media  $\pm$  desviación estándar de 3 ensayos independientes. La máxima actividad observada se definió como el 100%.

Lf\_1272 presentó actividad óptima entre 30-40°C, mostrando a 55°C una actividad residual del 83%. Fue activa en el rango de pH de 5 a 8, presentando máximo de actividad a pH 6-7. Fue termoestable hasta las 6 horas de incubación (50-90% actividad residual). La actividad fue inhibida en presencia de algunos aditivos, mientras que ninguno actuó como activador.

## CONCLUSIÓN

Se logró caracterizar bioquímicamente la feruloil esterasa Lf\_1272 de *Lactobacillus fermentum* CRL1446, lo que permitirá proyectar nuevas aplicaciones biotecnológicas de la misma.