

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UNA ENZIMA LIPOLÍTICA DE *Natronococcus* sp. TC6 en *Haloferax volcanii*

Sergio Eduardo Osorio Antonio, Angélica Yanet Nápoles Medina, Celso Cortes Romero, Jorge Alberto Rodríguez González y Jesús Antonio Córdova López. Dep. de Química. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco 44430. jesuscordovaudg@yahoo.com.mx.

Palabras clave: Clonación, *Natronococcus* sp. y arqueas halófilas.

Introducción. Las enzimas lipolíticas catalizan la hidrólisis y la síntesis de los enlaces éster (1). El requerimiento de condiciones de reacción agresivas en la industria química, ha orientado las investigaciones hacia la búsqueda de enzimas de organismos extremófilos, ya que las enzimas conocidas difícilmente pueden soportar estas condiciones (2). En el caso de las arqueas halófilas, donde se ha observado que la producción de enzimas lipolíticas normalmente es muy baja, una cepa se ha reconocido por su mayor producción de estas enzimas: *Natronococcus* sp. TC6 (3). Una forma de resolver esta situación es a través de la tecnología de DNA recombinante; para el caso de la expresión de lipasas de *Natronococcus* sp. TC6, se ha optado por el uso de un huésped que tenga características similares que la cepa nativa. Previamente se ha intentado, la expresión de genes de halófilos extremos en *E. coli*, sin embargo se ha observado con frecuencia la formación de cuerpos de inclusión, lo que dificulta el análisis de actividad enzimática. Recientemente, se está usando un sistema de clonación diseñado exprofeso para los genes de microorganismos halófilos: el sistema *Haloferax volcanii* (4).

Metodología.

El genoma de *Natronococcus* sp. TC6 fue recientemente secuenciado en nuestro grupo de trabajo (en proceso de publicación) y fue comparado con las secuencias que codifican para enzimas lipolíticas de la base de datos del NCBI. De la búsqueda se encontraron secuencias que putativamente codifican para enzimas de tipo esterasa/lipasa. De éstas, se seleccionó el gene 4086, mismo que fue amplificado por PCR a partir de DNA extraído de *Natronococcus* sp. TC6 e insertado en el vector pTA1392 para posteriormente utilizarlo para transformar células competentes de *H. volcanii*.

Resultados.

Células de *H. volcanii* fueron transformadas con la construcción del vector de expresión (pTA1392:*Lip4086*). La transformación fue corroborada por PCR, las cepas positivas fueron verificadas por la presencia del fragmento esperado (960 pb) (Figura 1a), y por digestión (con las enzimas Pci I y Eco RI) de DNA plasmídico obtenido de las células transformantes a través del Kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep System (Figura 1b).

Tres colonias de *H. volcanii* positivas para la inserción (8, 9 y 10) fueron seleccionadas para la inducción de la proteína recombinante, así como la cepa sin transformar como control. La síntesis de proteína fue inducida con triptófano a las 10 y 16 horas, y el cultivo fue detenido a las 30 hrs. Las células del cultivo fueron recuperadas y lisadas con sonicator de punta a 600w. Posterior a la centrifugación el sobrenadante fue recuperado, fracciones de éstos fueron visualizados en gel de acrilamida. En los tratamientos inducidos se aprecia un fragmento situado entre

31 y 45 kDa que es probable coincida con nuestro producto esperado (35.25 kDa).

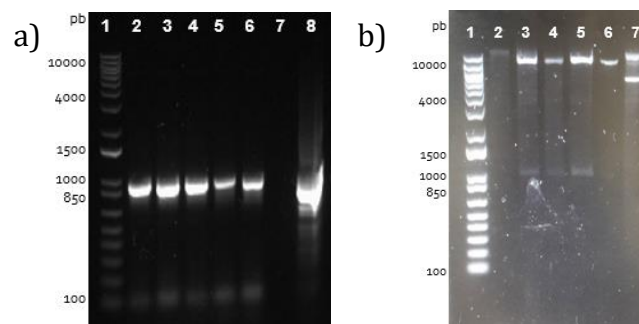


Fig. 1. a) PCR de la construcción de *Hfx. volcanii*, b) Verificación de la construcción en *Hfx. volcanii*.

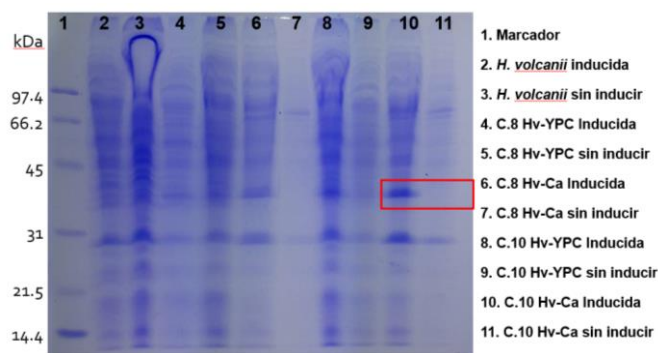


Fig. 2. Verificación de la expresión proteica mediante electroforesis. El peso esperado de la proteína es de 35.25kDa (peso de lipasa/esterasa) la cual se puede observar en el carril 10 de la cepa de *Hfx. volcanii* inducida con triptófano.

Conclusiones. Se comprobó que la cepa de *Haloferax volcanii* fue transformada con la construcción pTA1392::4086 y puede expresar la enzima lipolítica proveniente de *Natronococcus* sp.TC6.

Agradecimientos. Al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (Proy. No. 256926) y a CONACYT por la beca de Maestría.

Bibliografía.

- González-Bacerio J, et al. (2010). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1:124-140.
- Coca J, (2001) *Biotechnol. Apl.* 1:216-220.
- López Barrera A. et al. (2017) *e-Gnosis* 1:1-13
- Allers, T. et al. (2004). *Appl Environ Microbiol* 70: 943-953