

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA LIPASA (LipE) DE *USTILAGO MAYDIS*

Ponce Recinos Edith, López-Munguía Canales A. y Olvera Carranza C. Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca. Mor., CP. 62210. Tel. (777) 329 1609, Fax (777) 311 4903, eponce@ibt.unam.mx

Palabras clave: Lipasas, *Ustilago*, *CalB*

Introducción. Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol, aunque también son capaces de catalizar reacciones de esterificación, tiosis, inter y transesterificación entre otras. Estas enzimas son estables en solventes orgánicos y muestran una amplia especificidad hacia diversos sustratos, lo que las hace biocatalizadores interesantes para la industria y la síntesis orgánica. La lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) es la más utilizada a nivel industrial por su estabilidad en solventes orgánicos además de su capacidad para actuar en un amplio rango de temperatura y pH (1). Aunado a esto, CalB no necesita una activación interfacial. Dadas las características de CalB, en nuestro laboratorio ha sido posible desarrollar una amplia gama de reacciones que incluyen la síntesis de éteres de xilitol y ácido oléico y la síntesis e hidrólisis de amidas en particular moléculas análogas a la capsaicina (2,3).

Por todo lo anterior, surge el interés de buscar, aislar, expresar y caracterizar una lipasa estructuralmente análoga a CalB, con el fin de analizar sus propiedades, en particular su eficiencia y espectro de especificidad.

Metodología. Se realizaron búsquedas en bases de datos utilizando a CalB como templado, análisis de modelamiento por homología. Se aisló el cDNA que codifica para la lipasa hipotética LipE de *ustilago maydis* a partir de mRNA mediante la reacción con la transcriptasa reversa y PCR. Se clonó y expresó heterológamente en *E. coli* coexpresando chaperonas, y *Pichia pastoris*. La determinación de la actividad enzimática se realizó siguiendo la cinética e la hidrólisis del paranitrofenil palmitato (pNPP).

Resultados y discusión. Al realizar búsquedas en bases de datos, encontramos un marco de lectura abierto que codifica para una lipasa hipotética "LipE" en el genoma del hongo *ustilago maydis* mejor conocido como huitlacoche, con un 70% de identidad y un 80% de similitud con CalB. Debido a la similitud consideramos a esta enzima lipolítica como un posible catalizador alternativo a CalB para llevar a cabo reacciones de síntesis orgánica. Los análisis de modelamiento por homología de esta proteína sobre la estructura de CalB mostraron que, a pesar de las diferencias en estructura primaria, tanto los residuos catalíticos como aquellos que le dan estabilidad a los sustratos se encuentran presentes, así como el dominio de tapa abierto característico de esta enzima (figura 1 a y

b). El cDNA de LipE fue clonado y expresado heterológamente en *E. coli* origami DE3, así como CalB (control positivo). LipE no se encuentra soluble en *E. coli*, para contender con este problema, se cointegró la chaperona GroEl para favorecer el correcto plegamiento de la proteína. Con estas condiciones. LipE presenta una actividad de 12.8 mU/L de cultivo utilizando pNPP como sustrato, así mismo, la caracterización bioquímica y cinética de LipE fue realizada. Actualmente se está evaluando el sistema de expresión con *Pichia pastoris*. Este es el primer trabajo en donde se identifica una enzima con características estructurales similares a CalB, por lo que puede ser buen candidato para el desarrollo de un biocatalizador con actividad lipasa.

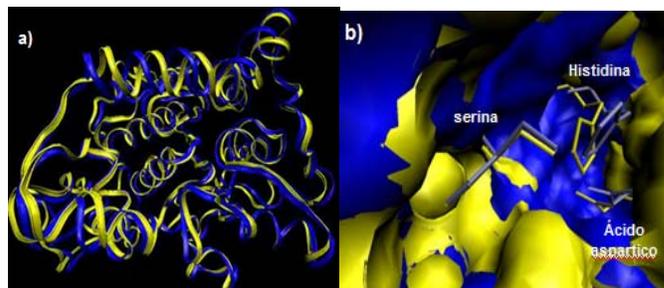


Figura 1. Modelo por homología de LipE sobre CalB a) estructura terciaria, b) Aminoácidos del sitio catalítico

Conclusiones.

Mediante búsquedas en bases de datos, análisis de modelamiento por homología se logró identificar una proteína con características estructurales similares a CalB. El gen de LipE fue aislado del microorganismo *Ustilago maydis*. El gen LipE fue clonado y expresado heterológamente en *E. coli*, en forma soluble cointegrando la chaperona GroEl al sistema. Se logró obtener a la enzima LipE de forma activa (12.8 mU/L) en el sistema de expresión de *E. coli*.

Bibliografía.

- 1.-Gotor-Fernandez V, Busto E, Gotor V. (2006). *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(7-8), 797.
- 2.-Castillo, E. Pezzotti, F. Navarro, A. Lopez-Munguia, A. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach approach. *J Biotechnol* 102 251-259.
- 3.-Castillo, E. Torres-Gavilan, A. Severiano, P. Arturo, N. Lopez-Munguia, A. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. *Food Chemistry* 100 1202-1208.