

SOBRE EXPRESIÓN Y EFECTO DE UNA MUTACIÓN EN LA REGIÓN DE LA “TAPA” DE UNA LIPASA TERMOALCALÓFILA DE *Geobacillus thermoleovorans* CCR11

Rodolfo Quintana Castro, Gerardo Valerio Alfaro, Hugo Sergio García Galindo, Rosa Maria Oliart Ros (roliaart@itver.edu.mx), Unidad de investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, M. A. de Quevedo 2779, Veracruz, Ver. 91897. México

Palabras clave: *Geobacillus thermoleovorans* CCR11, lipasa, termoalcalófila.

Introducción. Las lipasas constituyen un grupo importante de enzimas en aplicaciones biotecnológicas por su versatilidad para catalizar reacciones de síntesis e hidrólisis de acilglicéridos (1,2). La producción de altos niveles de las lipasas microbianas no solo requiere de eficientes sistemas de expresión sino también del entendimiento de los mecanismos moleculares, que gobiernan su actividad permitiendo entender la relación estructura-función (1).

El objetivo de este trabajo fue expresar el gen de una lipasa termoalcalófila de *G. thermoleovorans* CCR11 y realizarle mutaciones dirigidas en la región de la “tapa” de la lipasa y analizar el efecto de estas mutaciones.

Metodología. Para la recuperación y clonación de lipasa denominada lipACCR11 se diseñaron dos oligonucleótidos a partir de secuencias reportadas para lipasas de *Bacillus* y *Geobacillus*. El producto de PCR fue clonado en un vector denominado pET-lipACCR11 utilizando a *E. coli* BLR(DE3) como hospedadora. Se modificó la región hidrofóbica que cubre al sitio activo y que es denominada la “tapa” en las lipasas a través mutaciones dirigidas, eliminando 9 aminoácidos que forman parte de esta estructura; esta lipasa se denominó lipLidCCR11. El gen mutante fue clonado en el vector pXa-lipLidCCR11 y expresado en *E. coli* JM109(DE3). Las células con actividad lipolítica fueron identificadas en medio de cultivo sólido adicionados con IPTG 0.1 mM, y ampicilina 100 mg/mL para las células con el vector pXa-lipLidCCR11 e IPTG 1.0 mM y kanamicina 50 mg/mL para células con el vector pET-lipACCR11, ambos medios fueron suplementados con rodamina B al 0.001%, las células que poseen actividad lipolítica fluorescen bajo luz ultravioleta a λ de 365 nm. La actividad enzimática se analizó por la técnica descrita por Nawani *et al.* (1998). Se determinó la temperatura, pH óptimo y preferencia de sustrato de cada una de las lipasas recombinantes utilizando *p*-nitrofenilo como sustrato.

Resultados y discusión. Utilizando la reacción de PCR se recuperó un fragmento de aproximadamente 1.2 kpb que al ser clonado mostró actividad lipolítica, Figura 1a, este gen fue mutado y expresado en *E. coli*, mostrando actividad en medios con rodamina B, Figura 1b. La lipasa lipACCR11 mostró un tamaño en geles SDS-PAGE de aproximadamente 47 kDa, mientras que la lipasa lipLidCCR11 mostró un tamaño aproximado de 56 kDa, debido a la presencia de una proteína de fusión de 13

kDa. Las características bioquímicas de cada una de las lipasas recombinantes se muestran en el cuadro 1.

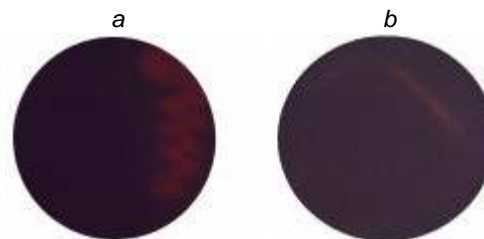


Figura 1. Células de *E. coli* con actividad lipolítica. a) con el vector pET-lipACCR11; b) con el vector pXa-lipLidCCR11.

Cuadro 1. Características bioquímicas de la lipasa nativa y las lipasas recombinantes.

| | Temp. óptima (°C) | pH óptimo | Preferencia de sustrato | Actividad Específica (U/mg) |
|---------------|-------------------|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| lipACCR11 | 40 | 9.0 | C:16 | 201,000 |
| lipLidCCR11 | 40 | 8.0 | C:6-C:8 | 65 |
| Lipasa nativa | 60 | 9.0 | C:10 | 5,500 |

Conclusiones. A partir de reacciones de PCR fue posible amplificar y clonar el gen lipACCR11 de *G. thermoleovorans* CCR11 el cual mostró un aumento de 36 veces más actividad con respecto a la lipasa nativa. Este gen fue mutado en la región de la “tapa” mostrando cambios en la preferencia de sustrato con respecto a lipasa lipACCR11 y la lipasa nativa. Estos cambios pueden relacionarse a modificaciones en los sitios de unión, específicamente en la región de la “tapa”, la cual podría estar actuando como sitio de unión para sustratos de mayor tamaño. De igual manera la actividad enzimática en la lipasa mutante fue disminuida, debido probablemente a la exposición del sitio activo, ya que la “tapa” puede actuar como una barrera que protege el sitio activo. Ambas lipasas recombinantes mostraron disminución en la temperatura óptima debido probablemente a la incapacidad de *E. coli* de plegar correctamente a las lipasas recombinantes.

Agradecimiento. A la DGEST por el apoyo para la realización de este trabajo.

Bibliografía. 1. Jaeger K., Ransac S., Dijkstra B., Colson C. Van Heuvel M. and Missot O., (1994). Bacterial Lipases. FEMS Microbiol. 15: 29-63.
2. Nawani N., Nirpjit S. and Kaur J. (1998). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. Biotech. Lett. 20: 997-1000.