



## PURIFICACIÓN DE LA LIPASA CpLIP1 DE *Carica papaya* EXPRESADA EN *P. pastoris*

Ivanna Rivera, Juan Carlos Mateos, Georgina Sandoval.

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).  
Av. Normalistas # 800 Colinas de la Normal. 44270 Guadalajara, Jalisco. México.  
gsandoval@ciatej.mx, gsandoval@confluencia.net

*Palabras clave: Lipasa de Carica papaya, purificación, Cromatografía de afinidad*

### Introducción.

Las triacilglicerol lipasas son una clase de enzimas que están encargadas del rompimiento de los enlaces éster de triglicéridos. Estas enzimas son conocidas por su amplia gama de aplicaciones en diversas industrias. Sin embargo en el caso del látex de *Carica papaya* hasta la fecha solo se ha identificado un miembro de la familia de las lipasas clase 3 [1]. Así mismo, este tipo de enzimas han demostrado ser eficaces en distintas reacciones de interés industrial como producción de lípidos análogos a la leche materna [2] y precursores de antiinflamatorios no esteroideos [3].

Este trabajo de investigación está dedicado a la expresión y purificación de la lipasa CpLip1 de *Carica papaya*, con el propósito de poder llevar a cabo su posterior caracterización bioquímica.

### Metodología.

La clonación de la triacilglicerol lipasa CpLip1 se realizó de acuerdo a [4]. El crecimiento y producción de la enzima se realizó utilizando el medio YPG. La actividad enzimática fue determinada por hidrólisis de aceite de oliva, proteína por el método de Bradford.

Purificación fue realizada mediante cromatografía de afinidad.

### Resultados.

El curso del crecimiento microbiano demuestra un máximo de actividad lipolítica de CpLip1 de  $(3.7 \pm 0.26)$  U/mL empleando aceite de oliva como sustrato alcanzado a las 48h. El cultivo fue centrifugado y filtrado para su posterior purificación.

Posteriormente el extracto fue diafiltrado como último paso de preparación de la muestra para purificación y en un gel de electroforesis la proteína muestra un peso aproximado de 50-55 kDa

Para la purificación de la proteína recombinante se empleo un gradiente de imidazol en el cual la actividad de la proteína fue detectada al principio del gradiente. Alcanzando un total de 25 U/mg de proteína de actividad específica como se muestra en la tabla1.

Tabla 1. Purificación de Clip1

	Extracto concentrado	Cromatografía de afinidad
Actividad lipolítica total (U)	87	55
Proteína Total (mg)	25	2.2
Actividad Específica U/mg proteína	3.48	25
Índice de purificación	1	7.18
%Recuperación	100	70

Posteriormente se determinó la preferencia por tamaño de cadena en hidrólisis de triglicérido de diferente largo de cadena, resultando preferencial por aceite de oliva y un extracto parcialmente puro de  $11 \pm 0.26$  U/mL sobre este sustrato.

### Conclusiones.

CpLip1 fue clonada y expresada por primera vez de forma funcional en *P. pastoris*. Además se obtuvo un extracto parcialmente puro para continuar con ensayos de caracterización bioquímica, dicho extracto presenta una preferencia por triglicéridos de cadena larga en reacción de hidrólisis.

### Agradecimiento.

A CONACYT (Mexico), proyecto CB-2014-01- 237737) y a la Red Temática BIOCATTEM por los apoyos recibidos.

### Bibliografía.

- [1] Dhoub, R., et al., Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics. *Febs Journal*, 2011. 278(1): p. 97-110.
- [2] Tecelao C, Rivera I, Sandoval G, Ferreira-Dias S. 2012. *Carica papaya* latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114(3):266-276.
- [3] Rivera I, Carlos Mateos J, Marty A, Sandoval G, Duquesne S. 2013. Lipase from *Carica papaya* latex presents high enantioselectivity toward the resolution of prodrug (R,S)-2-bromophenylacetic acid octyl ester. *Tetrahedron Letters* 54(40):5523-5526.
- [4] Ferrer, P., et al., Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. *Biochem Eng. J.*, 2009. 46(3): p. 271-27.