



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA LIPASA CALA-LIKE DEL HUITLACOICHE (*Ustilago maydis*) EN LA LEVADURA *Pichia pastoris*.

Martha Fabiola Martín del Campo Solís¹, Hiram Yave Guerrero Elias¹, M. Angeles Camacho Ruiz¹, Juan Carlos Mateos Díaz¹, Jorge A. Rodríguez González¹

¹Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Guadalajara, Jalisco, México, CP: 44270
email: jrodriguez@ciatej.mx

Palabras clave: lipasas, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*

Introducción. Las lipasas (EC 3.1.1.3), son biocatalizadores ampliamente empleados en la biotecnología. Estas enzimas pueden realizar un sin número de reacciones en medio acuoso y orgánico debido a su versatilidad por aceptar varios tipos de sustratos y a su especificidad. Lipasa A de *Candida antarctica* (CALA), es una enzima termoestable que ha mostrado la más alta especificidad por la posición *sn*-2 de triglicéridos, la cual puede ser empleada en la síntesis de lípidos estructurados. Dentro del genoma de *Ustilago maydis* (521/FGSC 9021), se reporta una secuencia para una enzima (Q4P903) con identidad de secuencia en aminoácidos del 71% respecto a CALA. Esta secuencia de CALA-like de *U. maydis* (582 aminoácidos), fue clonada de forma truncada en *E. coli*, sin embargo fue poco estudiada reportando una topo-selectividad por la hidrólisis de ácidos grasos trans [1] como para CALA [2]. En el presente trabajo se clonó el ADNc de la lipasa CALA like de *U. maydis* para estudiar su expresión en la levadura *P. pastoris* en comparación con CALA.

Metodología. El gen codificante (ADNc) optimizado de la lipasa CALA-like (UMA) en su forma truncada de *U. maydis* conteniendo el péptido señal de CALB, fue sintetizado en pUC57 por Genscript (USA). El gen se insertó en el plásmido pGAPZA empleando los sitios de restricción EcoRI y KpnI (ausentes en la secuencia optimizada del ADNc y presentes en el plásmido). Se realizó una doble digestión con EcoRI y KpnI en Buffer 2 (NEB) para 200 µg del ADNc como del plásmido. 20 ng de plásmido y ADNc fueron ligados con la ligasa T4 (NEB) a 16 °C durante 1 noche y 2 µl de la ligación se usaron para electroporar (MicroPulser™ de Bio-Rad) 60 µl de *E. coli* DH10B que se inocularon en LB agar + zeocina™. La inserción del ADNc se verificó por una doble digestión con los sitios EcoRI y KpnI. Posteriormente, 10 µg de la construcción se linealizaron y electroporaron con 60 µl de la cepa SMD1168H de *P. pastoris* que se inocularon en YPD agar + zeocina™. Se verificó la inserción del ADNc en clones de levadura por PCR y se realizó un cultivo de la mejor clona de UMA por 96 horas (30 °C y 200 rpm) en comparación con CALA expresada en *P. pastoris*. Se midió el crecimiento por absorbancia a 600nm y la actividad enzimática con tributirina (TC4) y trioctanoína (TC8) con el método espectrofotométrico reportado por nuestro laboratorio (3).

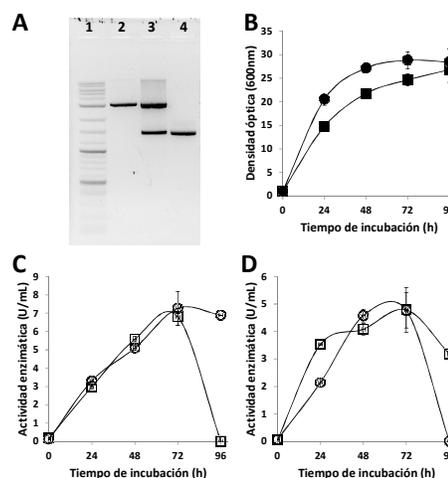


Fig. 1. A. Fotografía invertida de gel de agarosa al 1% en UV. 1: marcadores moleculares (2 log); 2: pGAPZA digestión simple; 3: doble digestión de la construcción UMA en pGAPZA; 4: PCR de la levadura transformada. B. Cinéticas de crecimiento. C. Cinéticas de actividad con TC4. D. Cinéticas de actividad con TC8. UMA (■, □) y CALA (●, ○).

Resultados. En la Fig. 1A se muestra la correcta construcción e inserción del ADNc de UMA en *P. pastoris*. Las cinéticas de crecimiento (Fig.1B) fueron similares para UMA y CALA. La actividad en TC4 (Fig. 1C) y TC8 (Fig. 1D) fueron cercanas para UMA y CALA, con una pérdida total de actividad para UMA a las 96 h.

Conclusiones. Se logró clonar de forma activa la lipasa CALA-Like de *U. maydis* (UMA) en la levadura *P. pastoris* con valores de actividad cercanos a los de CALA en el mismo sistema de expresión.

Agradecimiento. Se agradece el financiamiento otorgado por fondo Ciencia Básica SEP-CONACYT al proyecto 242544-2014. M. Martín del Campo, H. Guerrero y M.A. Camacho agradecen al CONACYT por el financiamiento de su beca de posgrado.

Bibliografía

- Brundiek H., S. Sass, A. Evitt, R. Kourist and U. T. Bornscheuer (2012). *App Microbiol and Biotechnol*, 94: 141-150.
- Dominguez de María P., C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert (2005). *J Mol Cat B: Enz*, 37: 36-46.
- Mateos-Díaz E, Rodríguez JA, Camacho-Ruiz MA, Mateos-Díaz, JC. (2012) High-Throughput screening method for lipases/esterases. En *Lipases and phospholipases: methods and applications*. Sandoval G. Humana Press, Springer Protocols. 89-100.