



## ESTUDIOS MOLECULARES DE LA LIPASA DE *Bacillus thermoleovorans* CCR11

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

*Palabra clave:* extremófilos, *Bacillus thermoleovorans*, lipasas

**Introducción.** Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas (E.C.3.1.1.3) que catalizan reacciones de hidrólisis y de síntesis de cadenas de acilglicéridos) tienen actualmente amplia aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica (1). De especial interés científico e industrial son las lipasas producidas por microorganismos extremófilos, ya que son capaces de funcionar óptimamente en condiciones extremas de reacción y presentan alta resistencia a la presencia de solventes orgánicos (2). En el Instituto Tecnológico de Veracruz se aisló a la bacteria termófila *Bacillus thermoleovorans* CCR11, y se ha purificado y caracterizado parcialmente a la lipasa termoalcalófila que produce.

El objetivo del presente trabajo es la caracterización molecular de la lipasa producida por *Bacillus thermoleovorans* CCR11.

**Metodología.** A partir del DNA total de *B. thermoleovorans* CCR11 se amplificó por PCR el gen que codifica para una lipasa, utilizando dos juegos de oligonucleótidos: uno diseñado en base a lo reportado por Bell *et al.*, (1999) (3) (LIP1FB y LIP1RB), y otro diseñado a partir de secuencias reportadas para lipasas termoalcalinas (Lip1F y Lip1R). Los productos de PCR fueron purificados con columnas de purificación Wizard PCR Clean Up System (Promega), y secuenciados utilizando el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing en el Instituto de Biotecnología, UNAM. La expresión de los productos de PCR se realizó utilizando un vector de expresión PinPoint Xa<sup>TM</sup>, que genera una proteína de fusión, y se utilizó a *E. coli* JM109 como célula hospedera. La determinación de la actividad lipolítica en las células de *E. coli* JM109 se realizó en placas de agar conteniendo caldo nutritivo suplementado con aceite de oliva 2.5%, cloruro de sodio 4 g/l, ampicilina 0.1 mg/ml, IPTG 100  $\mu$ M, biotina 2  $\mu$ M, y Rodamina B 0.001%. El análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se realizó utilizando el programa Blast de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/>). Para la predicción de la estructura de la lipasa se utilizó la base de datos de PredictProtein structure prediction (<http://cubic.bioc.columbia.edu/pp/>).

**Resultados y discusión.** Utilizando los oligonucleótidos LIP1FB y LIP1RB se obtuvieron dos bandas de 1.5 y 1.3 kb, y utilizando los oligonucleótidos Lip1F y Lip1R se obtuvo una banda de 1.4 kb. La secuencia de nucleótidos de las bandas de 1.5 kb y 1.4 kb mostró un homología mayor al 89% con secuencias de genes de lipasas reportadas para *Bacillus* termófilos. El fragmento de 1.5 kb fue clonado y expresado, obteniéndose dos colonias de *E. coli* JM109 que mostraron actividad lipolítica (halos de hidrólisis cuando fueron expuestas a luz ultravioleta, como lo muestra la figura 1).



Fig. 1. Crecimiento de *E. coli* JM109 en medio de cultivo con Rodamina B bajo luz UV. Las cepas 3 y 6 muestran actividad lipolítica.

La secuencia de aminoácidos predicha para el fragmento de 1.5 kb mostró tener un 89-97% de semejanza con otras lipasas de microorganismos termófilos, así como contar con las regiones conservadas: el pentapéptido GlyXSerXGly y los residuos aminoácidos de His, Ser y Asp que forman a la triada catalítica. La probable estructura de la lipasa de *Bacillus thermoleovorans* CCR11 posee un 95% de similitud con la lipasa de *Bacillus stearothermophilus* P1(4), encontrándose el residuo de Ser entre la hoja  $\beta$ 5 y la hélice  $\alpha$ 4, el residuo de His entre la hoja  $\beta$ 9 y la hélice  $\alpha$ 13, y el residuo ácido entre la hoja  $\beta$ 8 y la hélice  $\alpha$ 12.

**Conclusiones.** Por medio de PCR fue posible obtener un gen que codifica para una lipasa de *Bacillus thermoleovorans* CCR11 que muestra una alta homología con otros genes de lipasas de *Bacillus* termófilos. Utilizando el vector de expresión PinPoint Xa<sup>TM</sup> y *E. coli* JM109 fue posible expresar el gen de la lipasa, obteniéndose una proteína con actividad lipolítica. Sin embargo, el gen amplificado parece codificar para una lipasa de mayor tamaño a la producida y caracterizada en *B. thermoleovorans* CCR11 por Castro L. (2003) (5), por lo que resta el análisis bioquímico de la lipasa recombinante.

### Bibliografía.

- Gupta R, Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol Biotechnol* 64 (5):763-781
- Gomes, J, Steiner W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4):223-235.
- Bell P, Nevalainen H, Morgan H. (1999). Rapid cloning of thermoalcalophilic lipases from *Bacillus* spp. using PCR. *Biotechnol. Letters.* 21 (9):1003:1006
- Tyndall J, Sinchaikul S, Taylor P, Walkinshaw M. (2002). Crystal Structure of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J. Mol. Biol.* 323, 859-869
- Sinchaikul S, Sookkheo B, Pan F, Chen S. (2001). Optimization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, purification and characterization. *Prot Expr and Pur.* 22, 388-398