

ESTUDIO DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE UNA NUEVA LIPASA DE LA LEVADURA *YARROWIA LIPOLYTICA*

Georgina Sandoval^{a,c}, David Guieysse^a, Laetitia Faure^a, Phillippe Bauchart^a, Jean-Luis Uribebarrea^a, Jean-Marc Nicaud^b, Pierre Monsan^a, Alain Marty^a. ^aDGBA-INSA 135 av Ranguueil, 31077 Toulouse, France. e-mail: marty@insa-tlse.fr. ^bLab. de Génétique Moléculaire et Cellulaire, INRA 78850 Thieyerval-Grignon, France. ^cCIATEJ, av Normalistas 800, 44270 Guadalajara, Jal. México. e-mail: georgina@confluencia.net.

Palabras clave: enantioselectividad, ingeniería de proteínas, producción de lipasa.

Introducción. Una nueva lipasa extracelular de la levadura *Yarrowia lipolytica* ha sido caracterizada recientemente.^[1] Una nueva cepa de *Y. lipolytica* donde el gen de la lipasa se encuentra en aproximadamente 15 copias/genoma bajo el control de un promotor inducible con aceites ha sido construida^[2], lo cual permite una mayor producción de lipasa. Hemos encontrado una nueva aplicación de la lipasa de *Y. lipolytica* en la resolución de mezclas racémicas de 2-bromo fenil y 2-bromo toliil ésteres. Estos compuestos son importantes intermediarios de síntesis de antibióticos, prostanoides y analgésicos.^[3] En este trabajo se presenta el estudio de la enantioselectividad de la lipasa de *Y. lipolytica*, con el objetivo de mejorarla. Adicionalmente se optimizó la producción de esta enzima.

Metodología. Se optimizó la producción de lipasa de *Y. lipolytica* por fermentación fed-batch usando ácido oleico como inductor. El liofilizado del jugo de fermentación se utilizó en la resolución de mezclas racémicas de 2-bromo fenil y 2-bromo toliil ésteres por transesterificación en *n*-octano. Para la comprensión del mecanismo de enantioselectividad de la lipasa de *Y. lipolytica* se tomó como base un modelo propuesto para la lipasa de *B. cepacia*.^[4] Sin embargo, dado que esta nueva lipasa aún no ha sido cristalizada, se tuvo que determinar su estructura tridimensional *in silico* por homología, usando el programa "Modeler (Accelrys)". Basándose en la estructura determinada se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida. Para el análisis de la enantioselectividad de las mutantes fue necesario desarrollar pruebas sensibles y específicas.

Resultados y discusión. Se encontró la composición de un medio mínimo que cubre los requerimientos nutricionales de *Y. lipolytica* y que permitió obtener la cantidad excepcional de 50 000 U lipasa/mL en fermentación fed-batch. La lipasa es la principal proteína excretada en el medio de fermentación. Comparada con la lipasa comercial de *B. cepacia* que es una de las mejores enzimas para la resolución de ésteres 2-halógeno sustituidos^[3], la preparación enzimática de lipasa de *Y. lipolytica* obtenida de la fermentación mostró una elevada actividad y una enantioselectividad complementaria.

De acuerdo la estructura tridimensional de la lipasa de *Y. lipolytica* obtenida por homología con las lipasas de *R. miehei*, *T. lanuginosa* y *Rp. Niveus* se realizaron mutaciones en las valinas alrededor del sitio activo (fig. 1), bajo la hipótesis de que este tipo de aminoácidos con ejes rotatorios encamina el

sustrato hacia la serina catalítica influyendo sobre la enantioselectividad. Una prueba sensible y específica que desarrollamos, permitió cuantificar la enantioselectividad de las mutantes directamente a partir del cultivo en matraz. Algunos ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1. Con el cambio de un solo aminoácido se aumenta hasta cinco veces la enantioselectividad o puede incluso invertirse.

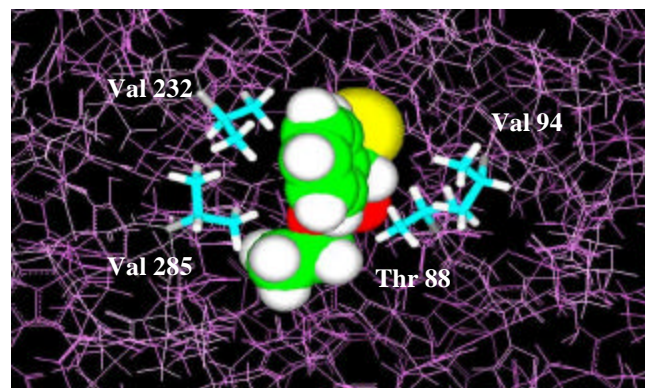


Fig. 1. Representación del 2-bromo-*o*-tolil acetato en el sitio activo de la lipasa de *Y. lipolytica*. Se indican los aminoácidos elegidos como blancos de mutagénesis dirigida.

Cuadro 1. Resultados de mutagénesis dirigida sobre la enantioselectividad hacia 2-bromo-fenil acetato

	Val 232	Val232Ala	Val232Leu
Preferencia	S	S	R
Enantioselectividad	5	25	10

Conclusiones. Los resultados obtenidos demuestran las ventajas de conocer la estructura tridimensional de la enzima para comprender y controlar su selectividad. Así mismo estos resultados nos hacen pensar que la estructura que determinamos *in silico* es globalmente correcta.

Bibliografía.

- Pignede G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud JM. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol.* 182 (10): 2802-2810.
- Pignede G, Wang H, Fudalej F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud JM. (2000). Autoclone and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3283-3289.
- Guieysse D. *Dédoublment enzymatique d'acides ?-halogéno aryl acétique: Approche expérimentale et modélisation moléculaire.* PhD thesis. INSA, Toulouse, France. 233 pp.