

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA LIPASA LipUVBI01 DE *Bacillus licheniformis* UV01 En *E. coli* BL21 DE3.

Deny de Jesús Velasco-Vique¹, María Guadalupe Sánchez-Otero¹, Rosa María Oliart-Ros², Alfonso Alexander-Aguilera¹, Rodolfo Quintana-Castro¹. 1. Universidad Veracruzana, Facultad de Bioanálisis-Veracruz, Iturbide s/n esq. Carmen Serdan Col. Centro, Veracruz, Ver. C. P. 91700, 2. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, 91897 Veracruz, Ver roquintana@uv.mx

Palabras clave: Lipasa, Bacillus licheniformis, Recombinante.

Introducción. Las lipasas son enzimas de naturaleza ubicua por lo que se encuentran presentes prácticamente en todos los organismos¹. Constituyen el grupo de enzimas de mayor importancia en biocatálisis, siendo su función biológica la hidrólisis de triglicéridos, sin embargo, uno de sus principales intereses es la capacidad sintética en medios orgánicos^{2,3}, es por ello por lo que la generación de lipasas recombinantes resulta atractiva con la finalidad de caracterizar y evaluar las capacidades enzimáticas de estas proteínas recombinantes. El objetivo del presente trabajo fue la clonación y expresión de un gen denominado *lipbluv* recuperado de *Bacillus licheniformis* UVAB01 y la determinación de su actividad enzimática de la lipasa LipUVBI01.

Metodología. A partir de DNA cromosómico de *Bacillus licheniformis* UVAB01 se recuperó por PCR el gen *lipbluv* el cual fue insertado en el vector de expresión pET-3b. Células quimio-competentes de *E. coli* BL21 DE3 fueron transformadas con el vector denominado pET-LipBI01, estas células transformadas fueron seleccionadas a partir de medios de cultivo en agar LB suplementado con ampicilina y se confirmó la presencia del vector en la células mediante extracción de vector por miniprep y la amplificación del gen *lipbluv* por PCR. La inducción de la expresión se llevó a cabo a partir de medios de cultivo LB líquidos de 12 h de crecimiento adicionando IPTG a una concentración de 0.4 mM y su posterior incubación por un periodo de 8 h. Posterior a la inducción se recuperaron los paquetes celulares por centrifugación y las células fueron suspendidas en buffer de fosfatos 0.5 M pH 7.0 y lisadas por sonicación para la obtención del extracto crudo. Se realizaron geles de poliácridamida para observar la expresión del gen *lipbluv* en *E. coli* BL21 DE3. La determinación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Nawani *et al.*, 1998 utilizando p-nitrofenil laurato.

Resultados. A partir del DNA cromosómico de *Bacillus licheniformis* UVAB01 se recuperó el gen *lipbluv*, figura 1.

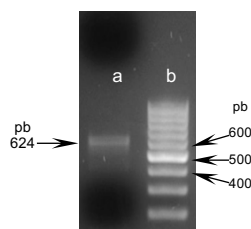


Fig. 1. Recuperación del gen *lipbluv* por PCR. Carril a: gen *lipbluv*; carril b: marcador de 100 pb.

Este gen fue clonado en el vector pET-3B y se generó la construcción denominada pET-LipBI01 el cual se confirmó por extracción y pcr de las cepas transformantes, Figura 2.

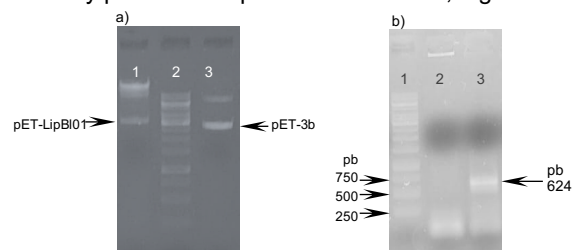


Fig. 2. Geles de agarosa de la construcción del vector y amplicon del gen *lipbluv*. a) gel de la construcción del vector de expresión, carril 1 vector pET-LipBI01, carril 2: marcador de 1kb, carril 3: vector pET-3b, b) carril 1: marcador de 1kb, carril 2 control negativo de *E. coli* BL21 DE3, carril 3 amplicon del gen *lipbluv*.

A partir de las células transformadas se indujo la expresión de la lipasa recombinante y se determinó la actividad lipolítica obteniendo una actividad específica de 11500 U/mg de proteína. la figura 3 muestra el gel de poliácridamida con la banda correspondiente a la expresión de la lipasa LipUVBI01 de aproximadamente 22 KDa.

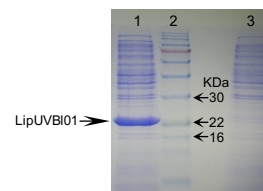


Fig. 3. Gel de poliácridamida con la lipasa LipUVBI01. Carril 1: extracto a partir de *E. coli* BL21 DE3 con el vector pET-LipBI01, carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: Extracto de *E. coli* BL21 DE3 con el vector pET-3b.

Conclusiones. A partir de cepas recombinantes de *E. coli* BL21 DE3 fue posible la sobreexpresión de la lipasa LipUVBI01 la cual mostró un incremento de actividad hidrolítica de mas de 300 veces con respecto a la lipasa nativa de *Bacillus licheniformis* UVAB01

Bibliografía.

1. Casas-Godoy, *et al.*, (2012). Lipases: an overview. In *Lipases and phospholipases*: 3-30.
2. Hasan, F., Shah, A. and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2): 235-251.
3. Jaeger, K. E., and Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4): 390-397.