

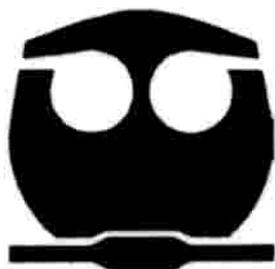


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**USO DE LA LIPASA DE *Bacillus pumilus* GMA1 EN
BIOCATÁLISIS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
KATIA LILIAN RUIZ NORIA



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este momento tan anhelado.

A la Dra. Amelia Farrés por su infinita paciencia y ayuda, por escucharme, tenderme su mano cuando la necesitaba y por la gran oportunidad de estar en su laboratorio bajo su asesoría. La respeto, admiró y quiero mucho.

A la M. en C. Carolina Peña Montes por la asesoría técnica, por los valiosos y acertados comentarios para la mejora de este proyecto, por tu dedicación, paciencia, ayuda incondicional, por darme ánimos y aconsejarme, eres una excelente persona y muy buena amiga.

A la M. en C. Idalia Flores Argüello por sus aportaciones en esta tesis, por tu apoyo, sólo me queda decirte que aunque estés lejos siempre te recordaré, eres una muy buena amiga y confidente, gracias por todos los momentos tan bonitos que vivimos.

Agradezco de manera especial al Dr. Arturo Navarro por su gran colaboración en este proyecto, por sus sabias aportaciones brindadas, por abrirme las puertas de su laboratorio y ayuda incondicional. Y que en estos momentos se encuentra en el extranjero, hasta allá, mis saludos y respetos.

A la Dra. Hilda Calderón por su dedicación y ayuda en el análisis de los productos de reacción.

A mis amigos de la facultad: Elisa, Gaby, Violeta, Daniela, Tere, Poncho, Daniel, Andrés, Karina. Y especialmente a mis queridísimas e inseparables amigas de la carrera: Dariana, Aideé, Alma y Mitzi, gracias por todos los momentos tan divertidos siempre las recordare afectuosamente.

A mis amiguitos y compañeros del laboratorio 312: Aideé, Bele e Israel que hicieron un ambiente de trabajo muy ameno y divertido, gracias por los momentos inolvidables que pasamos tanto dentro del laboratorio como fuera de el y por todo su apoyo. Los quiero mucho colitas grises..

A todos los integrantes del laboratorio 312: Normita, Denise, Caro, Mirna, Cindy, Paloma, Idalia, Gaby, Paty, Roberto, Abraham, al Sr. Rodrigo, Bere, Linda, Dra. Ame, Dra. Maricarmen, Dra. Amanda y a todos los que me faltaron los recordaré por siempre.

A las niñas del laboratorio 321: Claudia, Minerva, Nancy, Karla, y especialmente a Teresita, gracias por toda su ayuda mientras me adoptaron en su laboratorio.

Agradezco a los miembros del jurado por su amabilidad y amistosa disposición para la revisión de esta tesis, así como sus comentarios.

A la máxima casa de estudios la UNAM por abrirme sus puertas y todos los profesores que contribuyeron a mi formación académica.

Gracias a todas esas personas que me han apoyado y siguen creyendo en mí.....

DEDICATORIAS

A mis padres, José Gilberto Ruiz Palma y M. Átala Noria Bastida que estoy muy orgullosa de ustedes, gracias por darme la vida y darme la esencia de lo que soy y seré por siempre, por estar a mi lado en las buenas y en las malas y por ser la luz que guía mi camino, siempre estaré eternamente agradecida por todo lo que me brindan. Este sueño realizado les pertenece a ustedes, los querré y amaré por siempre.

A M. Átala Noria Bastida, por ser el corazón que me despierta todos los días y mi motor para seguir adelante día con día, por todos los esfuerzos que haces, desvelos, sacrificios, que hiciste para que pudiera terminar mi carrera profesional, por todo y más, gracias MAMITA.

A mi hermano Edgar, por tu ejemplo de dedicación y perseverancia que me dieron la energía y fuerzas para concretar este sueño, gracias por los momentos tan maravillosos que hemos pasado y que siempre recordaré y que los llevo en mi corazón. Sé que estás pasando por un momento difícil y amargo en tu vida y lo único que te puedo decir es que: los errores del pasado ya han sido olvidados y los errores del futuro serán perdonados... ¡Te quiero mucho! Gracias por tu gran apoyo y tu amistad.

A mi hermana Oti, tengo muchas cosas que agradecerte, por todas las sabias palabras de aliento que me has brindado cuando más las he necesitado, por tu compañía tan grata, por tu apoyo en las buenas y en las malas, por ser la mejor hermana y amiga que Dios me pudo haber dado. Estoy muy orgullosa de ti hermanita. ¡Te quiero mucho! Eres alguien ejemplar.

A mi amada abuelita Reme, a mis tíos Ángel, Ninfa y Gloria, mis primos Ivan, Alejandro, Alan, Omar, Christy, Yule y Leslie y mi sobrinita Luann, muchas por todo su apoyo en todos los sentidos, gracias por creer siempre en mí. Y aunque hay personas muy queridas que ya no están en este mundo y que de alguna forma comparto este momento, en especial a Ignacio Noria siempre los tengo presentes en mi pensamiento. Los quiero mucho, no pude haber tenido mejor familia que ustedes.

A mi Chiquinina por acompañarme siempre en mis desvelos, por cuidarme y ser tan fiel.

Índice de Protocolo de Investigación

Portada

Índice general

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

Resumen

Introducción

Marco teórico

Antecedentes

Objetivos

Material y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

Recomendaciones y Perspectivas

Bibliografía

Apéndice

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Estructura de las α/β hidrolasas	6
Figura 3.2 Mecanismo catalítico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas	10
Figura 3.3 Reacción de transesterificación	12
Figura 3.4 Reacción de acidólisis	12
Figura 3.5 Reacción de alcoholólisis	13
Figura 4.1 Estructura básica de los ácidos fenólicos	19
Figura 4.2 Ácido cumárico	20
Figura 4.3 Ácido ferúlico	20
Figura 4.4 β -Amirina	21
Figura 4.5 Colesterol	21
Figura 4.6 Estructura general de los flavonoides	22
Figura 4.7 Ácido kójico	23
Figura 4.8 Ácido linoleico conjugado	24
Figura 6.1 Sistema para equilibrar a un a_w determinado	36
Figura 7.1 Foto de la tinción Gram de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 a 100x	41
Figura 7.2 Formación de endosporas de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	41
Figura 7.3 Observación del halo lipolítico, indicador de la actividad lipolítica	42
Figura 7.4 Curva de crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 a 37°C	45
Figura 7.5 Curva de crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 a 50°C	46
Figura 7.6 Perfil proteico del extracto enzimático de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en gel TSDS-PAGE al 12 %	48
Figura 7.7 Zimograma de la enzima responsable de la actividad en gel SDS-PAGE al 12%	48
Figura 7.8 Zimograma de la enzima responsable de la actividad en gel nativo al 12%	48

Figura 7.9 Visualización del efecto del solvente en la reacción de síntesis por CCF	49
Figura 7.10 Efecto del a_w en la reacción de síntesis por CCF	50
Figura 7.11 CCF reacción de interesterificación con la lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 y <i>Candida antarctica</i> . Revelador yodo.....	51
Figura 7.12 CCF reacción de interesterificación con la lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 y <i>Candida antarctica</i> . Revelador ácido sulfúrico.....	52
Figura 7.13 CCF productos de hidrólisis enzimática del ácido ferúlico acetilado..	56
Figura 7.14 CCF productos de hidrólisis enzimática del ácido cumárico acetilado	57
Figura 7.15 CCF productos de hidrólisis enzimática de la amirina acetilada.....	58
Figura 7.16 CCF productos de hidrólisis enzimática del colesterol acetilado	58
Figura 7.17 CCF productos de hidrólisis enzimática de la hidroxiquinona acetilada	59
Figura 7.18 CCF productos de hidrólisis enzimática del TBHQ	60
Figura 7.19 CCF productos de hidrólisis enzimática del difenil etil acetato	60
Figura 7.20 CCF productos de hidrólisis enzimática del α -Naftil acetato.....	61
Figura 7.21 CCF productos de hidrólisis enzimática de la quercetina acetilada ...	62
Figura 7.22 CCF productos de hidrólisis enzimática de la catequina acetilada	63
Figura 7.23 CCF productos de hidrólisis enzimática de la epicatequina acetilada	64
Figura 7.24 CCF productos de hidrólisis enzimática de la hesperetina acetilada .	64
Figura 7.25 CCF productos de hidrólisis enzimática del ácido kójico acetilado	65
Figura 7.26 CCF productos de hidrólisis enzimática del dilaurato de ácido kójico acetilado	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Aplicaciones industriales de las lipasas microbianas	9
Tabla 3.2 Estrategias para mantener una baja actividad de agua	14
Tabla 4.1 Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género <i>Bacillus</i>	17
Tabla 4.2 Resultados de la caracterización bioquímica de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	18
Tabla 4.3 Compuestos bioactivos contenidos en alimentos	18
Tabla 6.1 Ensayos de actividad lipolítica	30
Tabla 6.2 Valores definidos de a_w	36
Tabla 6.3 Preparación de reacciones de hidrólisis	38
Tabla 6.4 Método para correr el ácido ferúlico	40
Tabla 6.5 Método para correr los flavonoides	40
Tabla 7.1 Identificación bioquímica de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	42
Tabla 7.2 Solubilidad de diferentes <i>p</i> -Nitrofenol ésteres en una concentración de 5 mM	43
Tabla 7.3 Resultados obtenidos en el ensayo de cuantificación de actividad lipolítica	44

ABREVIATURAS

BHI	Infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion)
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CLA	Ácido linoleico conjugado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
DPPH	Difenil picrilhidracilo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
kDa	Kilodaltones
MM	Marcadores de peso molecular
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBHQ	<i>butil</i> -Hidroquinona terciaria
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
TSDS-PAGE	Tris-Tricina-SDS-PAGE

1. RESUMEN

Las lipasas microbianas tienen un campo de aplicación amplio en la industria de alimentos, catalizan reacciones de hidrólisis o de síntesis dependiendo de las condiciones en las que se tengan en el medio de reacción. Dentro del grupo de trabajo se logró aislar de aguas termales mexicanas una bacteria lipolítica la cual se clasificó como *Bacillus pumilus* GMA1. Este microorganismo produce una lipasa que presenta características poco comunes e interesantes ya que muestra actividad lipolítica a valores elevados de temperatura, a un pH alcalino (50°C y pH 10.5) y además es activa en solventes orgánicos. El objetivo del presente trabajo es evaluar el uso de esta lipasa para llevar a cabo reacciones de hidrólisis y síntesis. La actividad de esta lipasa se comparó con una enzima comercial de *Candida antarctica* en ambos casos.

En las reacciones de hidrólisis se emplearon diferentes compuestos fenólicos bioactivos acetilados, lo que impide que ejerzan su poder antioxidante. Esta capacidad se recupera al eliminar el grupo acetilo por la ruptura del enlace éster con una lipasa, de manera que se recupera la actividad biológica.

En la reacción de síntesis (interesterificación) se modificó un triacilglicerol con ácido linoleico conjugado para la obtención de un lípido funcional en alimentos.

La primera etapa consistió en la reactivación de la cepa y la verificación de su identidad, a continuación se obtuvo enzima suficiente para llevar a cabo las reacciones. Se evaluaron las condiciones de crecimiento y producción, así como la mejor manera de determinar actividad lipolítica. La máxima producción se obtuvo cultivando el microorganismo a 50°C a 100 rpm y a las 24 h de crecimiento. El sobrenadante se concentró para su empleo en biocatálisis. Para la medición de actividad lipolítica se seleccionó el *p*-Nitrofenol acetato, a temperatura ambiente, solubilizado con Triton X-100 y amortiguador de fosfatos, pH 7.2.

En la reacción de síntesis se estudiaron las condiciones de reacción para sintetizar el producto de interés. La reacción ocurrió tanto a un a_w de 0.7 como de 0.5, aunque el producto es más puro en el segundo caso. El solvente seleccionado fue el hexano.

Entre los sustratos evaluados para hidrólisis se obtuvieron resultados positivos con el ácido ferúlico, ácido cumárico, hidroxiquinona, TBHQ, difenil etil, α -Naftil, quercetina, catequina y dilaurato de ácido kójico. En este último caso, así como con flavonoides,

los resultados fueron diferentes que los obtenidos con el control de *Candida antarctica*. Esto indica el potencial que presenta esta enzima en aplicaciones de biocatálisis.

2. INTRODUCCIÓN

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se presentan en animales, plantas y microorganismos, y son estas últimas las más importantes comercialmente. Las lipasas tienen muchas aplicaciones especialmente en la síntesis orgánica, hidrólisis de grasas y aceites, modificación de grasas y mejora del sabor en el procesamiento de alimentos (Masse, 2001). Las enzimas microbianas son útiles para llevar a cabo catálisis en medios no convencionales, así como en la de reacciones de interesterificación y síntesis estereoespecífica de ésteres, alcoholisis de compuestos polihidroxilados como fenoles, flavonoides, con un alto nivel de regio-, quimio-, y enantioselectividad. (Weete, 2002).

La tendencia actual en los consumidores de alimentos es la preocupación por obtener un beneficio a la salud, además del efecto nutritivo, y la industria ha generado así los alimentos funcionales (Huesca, 2005). Entre los productos importantes se encuentran los lípidos con alto contenido de ácido linoleico conjugado, CLA, al que se le han atribuido propiedades como agente cancerígeno, estimulante del sistema inmune, protege contra la aterosclerosis, antiaterogénico y capacidad de disminuir el contenido de grasa corporal, entre otras funciones biológicas (Kim, 2001). Para su obtención se requiere el empleo de lipasas que puedan catalizar reacciones de transesterificación

Por otra parte, estas mismas enzimas se emplean para acetilar y desacetilar compuestos fenólicos. Estos se encuentran en las frutas y verduras frescas, así como en granos de cereales y son considerados constituyentes biológicamente activos porque presentan propiedades como antioxidantes, reducen la peroxidación de lípidos, antitrombóticas, antialérgicas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, inmunoestimulantes, reguladores de la

presión arterial y de la glucemia, propiedades de filtro de UV e inhibición del crecimiento de células cancerosas (Silva, 2000, Fragopoulou, 2007). Los compuestos fenólicos son relativamente poco solubles en medios apróticos, por lo cual su aplicación como antioxidantes naturales en productos a base de aceite es limitada. Sin embargo, la hidrofobicidad de estos compuestos puede mejorarse por métodos químico-enzimáticos, esterificando el ácido carboxílico en función del alcohol graso, su hidrofobicidad de esta manera aumenta y se obtiene una molécula anfifílica (lipofilización), manteniendo sus propiedades biológicas. La importancia de encontrar enzimas que lleven a cabo la desacetilación de compuestos radica en la aplicación de la lipofilización regioselectiva y reacciones inversas (Figueroa, 2005). Son pocas las enzimas que se han reportado que llevan a cabo reacciones de acetilación o desacetilación de compuestos fenólicos bioactivos, en su mayoría de flavonoides (Lambusta, 2003).

Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas lipasas que lleven a cabo las reacciones antes mencionadas. En este trabajo se evaluó la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, que presenta actividad lipolítica en intervalos interesantes de pH y temperatura para aplicación en procesos biotecnológicos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Lipasas

3.1.1 Generalidades

Las lipasas (triacilglicerol ester hidrolasas E.C.3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis reversible de triacilgliceroles, y cuando la hidrólisis es total se producen ácidos grasos y glicerol. Dependiendo el grado de hidrólisis pueden ser los productos de estas reacciones: ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles y glicerol.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos y son extremadamente versátiles ya que también pueden catalizar reacciones de interesterificación y síntesis estereoespecífica de ésteres, así como actuar sobre un amplio rango de sustratos (Weete, 2002). La diferencia entre lipasas y estererasas es que estas últimas actúan solo en sustratos solubles en agua. Los triacilgliceroles de cadena larga son los sustratos naturales de las lipasas, son insolubles en agua y forman agregados o emulsiones en medio acuoso. Las lipasas tienen una alta afinidad por superficies hidrofóbicas y puede ser completamente adsorbidas en soluciones acuosas por cadenas largas de triacilgliceroles emulsificados (Willis, 2002).

3.1.2 Estructura

El patrón común de plegamiento de las α/β hidrolasas es una estructura α/β , que consiste en una estructura central β con 8 hojas paralelas, excepto la segunda, que es antiparalela. Las secciones β_3 a β_8 están conectadas con α hélices, las cuales están unidas a cada lado de la hoja β central. De acuerdo a estudios realizados por cristalografía de rayos X, se sabe que el sitio catalítico se localiza en el carboxilo terminal de la hoja central, el cual consiste en tres residuos catalíticos: un residuo nucleófilo (serina, cisteína o aspartato), un residuo ácido (aspartato o glutamato), y un residuo de histidina, siempre en este orden de secuencia de aminoácidos. En las lipasas invariablemente se ha encontrado que el nucleófilo es el residuo de serina, mientras que en la región catalítica tiene un residuo ácido (aspartato o glutamato).

El residuo de serina está localizado en un pentapéptido altamente conservado (Gly-X-Ser-X-Gly) y tiene una conformación ϵ ($\psi = 62^\circ$, $\phi = -121^\circ$), que consiste en una cadena β seguida de un giro rígido que contiene al residuo de serina y, en seguida un α hélice. A este arreglo se le conoce como β - ϵ Ser- α . Este posiciona al residuo libre nucleofílico en la superficie del sitio activo y permite acceder fácilmente por un lado al residuo de histidina y por el otro al sustrato. La histidina, que es el tercer residuo catalítico, se localiza en una vuelta después de la hoja $\beta 8$ de la estructura central (Derewenda, 1991).

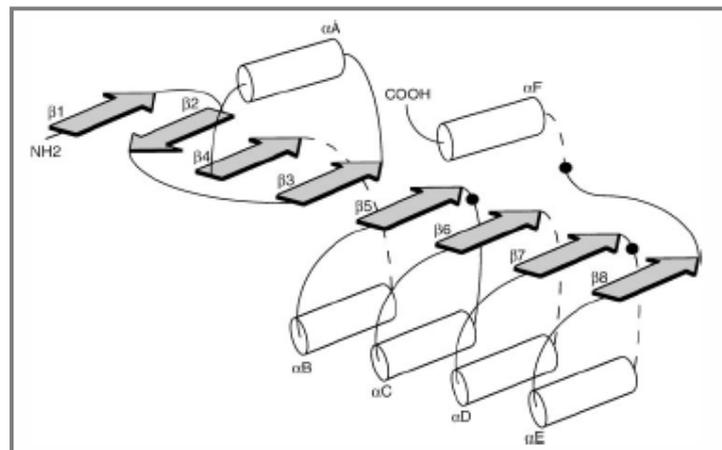


Figura 3.1. Estructura de las α/β hidrolasa (Jaeger, 1999).

3.1.3 Activación interfacial

La activación interfacial es un fenómeno que presentan algunas enzimas lipolíticas, que consiste en un incremento dramático de su actividad cuando se encuentran en una interfase lípido-agua. Las lipasas se caracterizan por presentar este fenómeno. En ausencia de dicha interfase, en estas enzimas el sitio activo está cubierto por una cadena superficial que consiste en una hélice corta antipática, o bien dos hélices o una región de horquilla. Sin embargo, en presencia de sustancias hidrofóbicas, esta "tapa o cubierta" se retira, provocando que los residuos catalíticos queden accesibles al sustrato y se expone una gran superficie hidrofóbica en la que participan principalmente 12 aminoácidos (Ile85, Trp88, Ile89, Leu92, Phe94, Val205, Leu208, Phe213, Val254, Leu255, Leu258 y Leu267), la que se presume interactúa con la interfase lipídica (Wong, 2001).

Actualmente se sabe que la presencia de una "tapa o cubierta" en la estructura de las lipasas no necesariamente está correlacionada con la activación interfacial. Lipasas como la de *P. aeruginosa*, *B. glumae* y *C. antarctica* no se activan



interfacialmente y en su estructura cuentan con una tapa anfipática que cubre sus sitios catalíticos (Jaeger, 1998). Por otro lado, algunas ni siquiera presentan esta tapa como la lipasa de 19 kDa de *B. subtilis*, la cutinasa de *F. solani* y la esterasa de *P. purpurogenum* (Pouderoyen, 2001).

3.1.4 Clasificación

Una clasificación de lipasas fue establecida en el período de 1994 a 1998. Se identificaron 47 lipasas bacterianas, las cuales fueron agrupadas en seis familias basadas en similitud de su secuencia de aminoácidos (Arpigny 1999):

- **Familia I:** Comprende a 22 miembros que están divididos en 6 subfamilias:
 - Subfamilia I.1 y I.2: lipasas secretadas por la vía tipo II (para su secreción requieren de un transportador externo) y el peso molecular es aproximadamente de 30 a 32 kDa.
 - Subfamilia I.3: La ruta de secreción es de tipo I (se autotransportan) y el peso molecular es de 50 a 65 kDa.
 - Subfamilia I.4: Trabajan en rangos de pH alcalino y presentan preferencia hacia los triacilgliceroles de cadena corta como substratos, el peso molecular es de 19 a 21 kDa son las lipasas de menor tamaño.
 - Subfamilia I.5: Tienen características de fosfolipasas y el peso molecular es de 43 kDa.
 - Subfamilia I.6: Comprende a lipasas de los géneros *Propionibacterium* y *Streptomyces*.
- **Familia II:** Comprenden a las nuevas lipasas con funciones desconocidas.
- **Familia III:** Se agrupan las lipasas extracelulares de *Streptomyces* spp. y las cepas psicrófilas de *Moraxella* sp.
- **Familia IV:** Pertenecen las lipasas adaptadas al frío que muestran similitud con lipasas de mamíferos sensibles a hormonas o HSL.
- **Familia V:** Estas lipasas muestran similitudes estructurales con deshalogenasas, haloperoxidasas y epoxi-hidrolasas, que presumiblemente exhiben el plegamiento α/β -hidrolasa característico de su estructura terciaria.
- **Familia VI:** Incluye esterasas que han sido parcialmente identificadas de las secuencias del genoma. Estas esterasas son pequeñas proteínas localizadas en el citoplasma bacteriano con similitud a las lisofosfolipasas de mamíferos, tienen un peso molecular de 23 a 26 kDa.

De acuerdo a su especificidad de sustrato, las lipasas pueden clasificarse en 3 grupos, (Jaeger, 1999):

- ✓ Lipasas específicas: hidrolizan uniones ésteres complejas en la primera o tercera posición de triacilgliceroles y producen 2,3-diacilgliceroles y 2-monoacilgliceroles. Al cabo de un largo período de hidrólisis el residuo de ácido graso en el 2-monogliceroles migra a la posición 1 y genera 1-monoglicérido que es mucho más fácil de hidrolizar. Ejemplos de estas enzimas son las provenientes de *Arpegillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa* y *Mucor miehei* (Orozco, 1993).
- ✓ Lipasas inespecíficas: no distinguen los enlaces éster de ninguna de las tres posiciones en el triacilglicérido sin importar la saturación ni la longitud de la cadena. Estas enzimas pueden hidrolizar totalmente el sustrato. Algunos ejemplos de estas lipasas son las que provienen de *Penicillium cyclopium*, *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Lipasas que discriminan en base a la longitud de la cadena y saturación del ácido graso: Como es el caso de la lipasa de *Arpegillus niger* que tiene especificidad para el ácido esteárico (Davranov, 1994).

3.1.5 Fuentes de obtención

Las lipasas se pueden encontrar en todos los sistemas biológicos como (Akoh, 2002):

- * *Lipasas de origen animal*: son lipasas que provienen de mamíferos (bovinos y porcinos) se localizan en órganos y tejidos como páncreas, corazón, cerebro, tejido adiposo y sangre.
- * *Las lipasas de origen vegetal*: estas lipasas provienen de semillas oleaginosas. Son relativamente específicos para los triacilgliceroles nativos de las especies que se aislaron. No han tenido el mismo impacto que las provenientes de otras fuentes.
- * *Microbianas*: son las lipasas que tienen gran interés por su uso biotecnológico, ambiental, farmacéutico y sus aplicaciones industriales, provienen de bacterias, levaduras y hongos, estas varían en especificidad, actividad específica, estabilidad a diferentes rangos de temperatura y otras propiedades. En general son más termoestables que las provenientes de animales y vegetales.

3.1.6 Aplicación de las lipasas:

Las lipasas presentan una amplia gama de aplicaciones en las diferentes industrias como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Aplicaciones industriales de lipasas microbianas (Goldfresen 1990, Vulfson, 1994)

INDUSTRIA	EFEECTO	APLICACIÓN O PRODUCTO
Alimentos lácteos	Enriquece el sabor	Agentes saborizantes
	Aceleración de la maduración	Queso
	Lipólisis de la grasa de la leche y crema	Mantequilla
Panadería	Mejora el sabor y prolonga la vida media	Panadería
Bebidas	Mejora el aroma	Bebidas
Condimentos	Mejora la calidad	Mayonesas
		Condimentos
Cárnicos	Desarrollo de sabor y remoción de grasa	Cárnicos
Grasas y aceites	Transesterificación Hidrólisis	Mantequilla de cacao
		Margarina
		Ácidos grasos
Farmacéutica	Síntesis estereoquímica de ésteres.	Intermediarios de medicamentos
Cosméticos	Síntesis de emulsificantes y agentes humectantes	Emulsificadores
		Agentes humectantes
Limpieza	Hidrólisis, como aditivos en limpiadores y agentes surfactantes.	Agentes surfactantes
		Removedores de suciedad
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Eliminación de manchas de grasa de las telas
Cuero	Hidrólisis	Productos de cuero

Las lipasas ofrecen además prometedoras aplicaciones en los procesos de química orgánica, formulaciones de detergentes, síntesis de biosurfactantes, industria petroquímica, industria de productos de uso cotidiano, industria agroquímica, manufactura de papel, nutrición, cosméticos y procesos farmacéuticos. El desarrollo de tecnologías basadas en el uso de lipasas para la síntesis de nuevos compuestos se ha expandido rápidamente. Un factor limitante es la escasez de enzimas que tengan las características requeridas en los procesos, ya sea en biotransformaciones o síntesis (Liese, 2000).

3.2 Reacción de hidrólisis

En la presencia de un exceso de agua las lipasas catalizan la hidrólisis de los triacilglicerolos de cadena larga y actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilglicerolos para liberar ácidos grasos y glicerol. La hidrólisis del sustrato



comienza con el ataque del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo del residuo nucleofílico de serina, sobre el carbonilo del enlace éster del lípido (Figura 3.2,1).

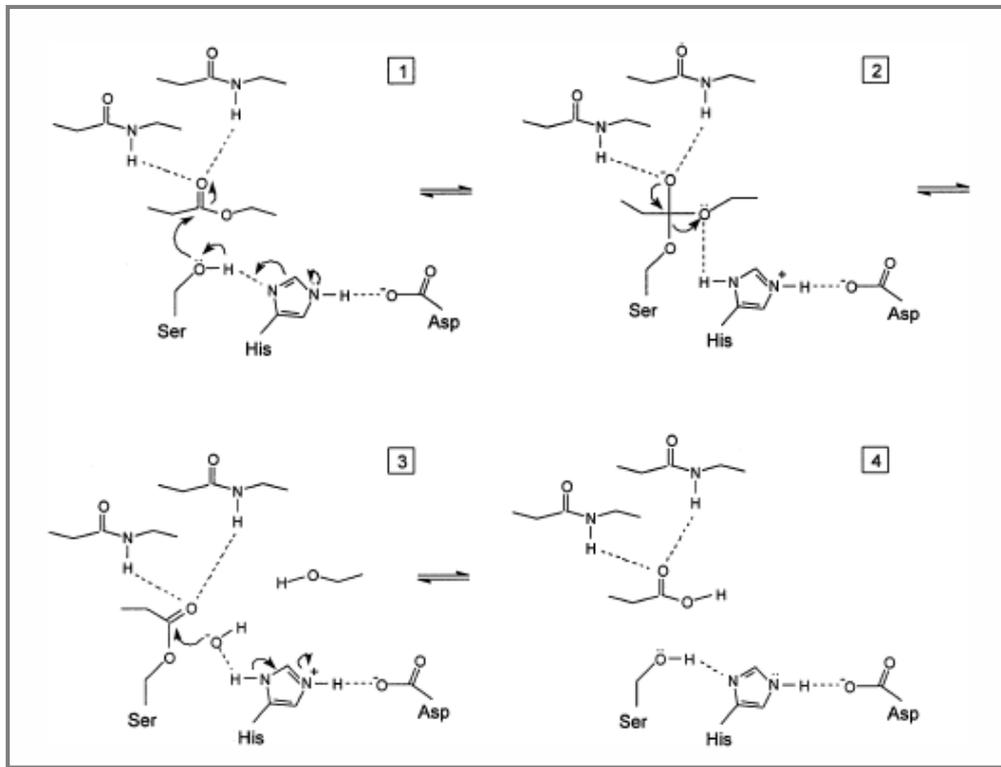


Figura 3.2. Mecanismo catalítico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas. 3.2,1.- Activación del residuo nucleofílico de Ser. 3.2,2.- Formación del intermediario tetraédrico. 3. 2,3.- Intermediario covalente acil-enzima. 3.2,4.- Hidrólisis del intermediario covalente y regeneración de la enzima (Jaeger, 1999).

Esto produce la formación de un intermediario tetraédrico, que se caracteriza por tener una carga negativa en el oxígeno, que es estabilizado por interacciones con un macrodipolo producido por la α -hélice α C y puentes de hidrógeno con dos grupos NH, a lo que se le conoce como "cavidad oxianiónica" (Figura 3.2,2). Uno de los grupos NH proviene de un residuo que se encuentra detrás de la serina nucleofílica y el otro del residuo final de la hoja β 3. El ataque nucleofílico de la serina es incrementado por una histidina catalítica, a la que se transfiere el protón del grupo hidroxilo de la serina. Esta transferencia es facilitada por la presencia de un ácido, que orienta el anillo imidazol de la histidina y neutraliza parcialmente la carga generada en él (Figura 3.2,3).

A continuación, este protón es donado al oxígeno del enlace éster para formar un alcohol. En este entorno, el componente ácido del sustrato es esterificado por la

serina nucleofílica (intermediario unido covalentemente), mientras se libera el alcohol.

El mecanismo continúa con un paso de desacilación, en el cual una molécula de agua hidroliza el intermediario covalente. El sitio activo de la histidina, activa a esta molécula de agua quitándole un protón. El ión OH^- resultante ataca al carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la serina. Posteriormente la histidina dona un protón al oxígeno del residuo activo de serina, el cual libera a su vez el componente acilo, formando un ácido carboxílico. Después de la difusión de este ácido carboxílico, la enzima está disponible para otro ciclo catalítico (Figura 3.2,4) (Jaeger, 1998).

3.3 Reacción de síntesis (Interesterificación)

Bajo condiciones limitantes de agua las lipasas pueden llevar a cabo la reacción reversible, síntesis de ésteres. Los sistemas de interesterificación enzimática están compuestos de una fase continua de agua inmiscible, que contiene el sustrato lípido, y de una fase acuosa, que contiene la lipasa. Esta reacción ha sido extensamente estudiada usando solventes orgánicos (Willis, 2002).

El desarrollo de métodos para mejorar el valor nutricional y las propiedades funcionales de grasas y aceites es de gran interés en la industria de alimentos.

Los componentes mayoritarios de las grasas y aceites son los triacilgliceroles, formados por una molécula de glicerol esterificada a tres cadenas de ácidos grasos; la composición de estos ácidos grasos depende del origen de cada aceite o grasa. Las propiedades físicas de los aceites y grasas son diferentes según la estructura y distribución de los ácidos grasos en el triacilglicerol. Estos triacilgliceroles pueden modificarse por reacciones conocidas como interesterificación, ya que los grupos acilos del triacilglicerol son redistribuidos primero intramolecularmente y después intermolecularmente (Willis, 2002).

La interesterificación enzimática permite tener un mejor control en la composición del producto final y pueden obtenerse mezclas de glicéridos que no se pueden obtener mediante interesterificación química, dado que ésta conduce a una distribución aleatoria del grupo acilo. La modificación en estructura y distribución de ácidos grasos conduce a cambios en la estructura del cristal, en el contenido de grasa sólida y en el punto de fusión de la grasa. Los resultados pueden variar de

acuerdo al tipo de lipasa empleada, puesto que la especificidad de las mismas varía según la fuente de obtención (Willis, 2002).

Las reacciones de interesterificación se dividen en:

- *Transesterificación*

Es el intercambio de grupos acilos entre dos ésteres, como pueden ser de diferentes triacilgliceroles (Figura 3.3). La transesterificación es usada principalmente para cambiar las propiedades físicas de grasas y aceites de mezclas de aceites-grasa por alteración de la distribución posicional de los ácidos grasos en los triacilgliceroles (Willis, 2002).

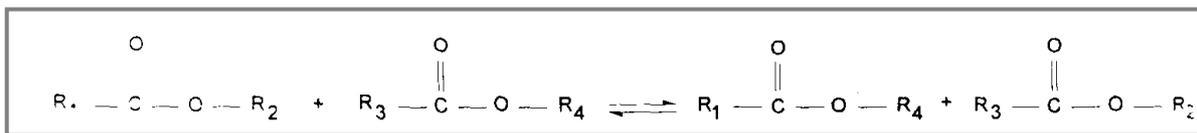


Figura 3.3. Reacción de transesterificación (Willis, 2002)

- *Acidólisis*

La transferencia de un grupo acilo entre un ácido y un éster es un medio de incorporación efectivo de ácidos grasos libres en triacilgliceroles (Figura 3.4). La acidólisis ha sido usada para incorporar ácidos libres del ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) en vegetales y aceites de pescado para mejorar sus propiedades nutricionales (Willis, 2002).

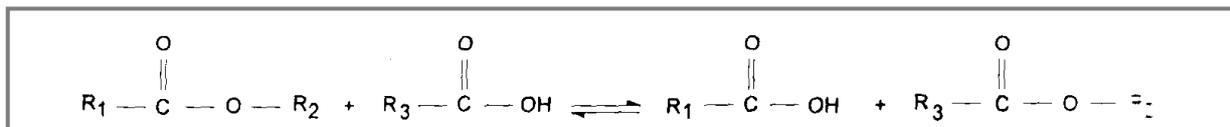


Figura 3.4. Reacción de acidólisis (Willis, 2002).

- *Alcohólisis*

Es la reacción de esterificación entre un alcohol y un éster (Figura 3.5).

La alcohólisis ha sido usada en la producción de ésteres metílicos por la esterificación de triacilgliceroles y metanol con un rendimiento mayor al 53% (Willis, 2002).

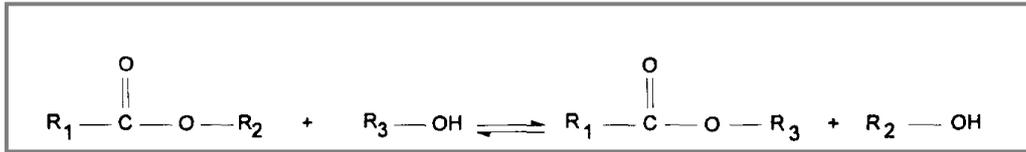


Figura 3.5. Reacción de alcoholisis (Willis, 2002).

Las grasas modificadas enzimáticamente tienen un mayor valor nutritivo, ya que a partir de materias primas baratas, que carecen de propiedades de interés, como el aceite de palma, se pueden obtener productos con composición semejante a la grasa de cacao y de esta manera tener sustitutos de mantequilla de cacao y grasa de confitería. Esta reacción es usada en la manufactura de materia grasa y margarinas para mejorar sus propiedades de textura, haciéndola más untable y modificar el comportamiento de su punto de fusión, aumentando la estabilidad de las grasas y aceites (Willis, 2002).

3.4 Condiciones de reacción de síntesis

Las reacciones de síntesis se enfocan principalmente a la síntesis de nuevos productos que difícilmente se sintetizan en fase acuosa. Para que las lipasas puedan llevar a cabo reacciones de síntesis se necesitan condiciones limitantes de agua, por ello se han implementado diversas estrategias (Tabla 3.2), todas ellas con el objetivo principal de proveer un medio de reacción de baja actividad de agua, en el que se favorezca la síntesis (Rendón, 2001).

Trabajar en términos de a_w ofrece varias ventajas, en primer lugar por definición. Es igual en todas las fases al equilibrio, y por otro lado describe el efecto de la acción del agua en cualquier equilibrio termodinámico. Para cualquier reacción hay un óptimo de actividad enzimática a un valor específico de a_w , actividad que disminuye conforme aumenta o disminuye la actividad de agua. La influencia del agua no depende de la concentración total de ésta, sino de las interacciones entre el agua y todos los componentes de la reacción, de manera que la forma más conveniente de caracterizar la relación de agua en estos sistemas es la actividad termodinámica del agua (a_w).

Tabla 3.2. Estrategias para mantener una baja actividad de agua (Rendón, 2001).

MÉTODO	PRINCIPIO	REFERENCIA
Tamiz molecular	Absorber el agua presente en el sistema	Kuan, 1998 Yamaguchi, 1991
Preevaporación	Remoción de agua por adsorción o permeación selectiva a una membrana	Kwon, 1995
Presiones reducidas	Remoción del agua de sistema	Linfield, 1984
Soluciones saturadas con sales	Equilibrio de sistema a un a_w determinado	Halling, 1992 Yang, 1993

Se sabe que las lipasas conservan su actividad en medios orgánicos, ya que se establecen interacciones entre el medio orgánico y la región hidrofóbica de la enzima, así como entre sus residuos hidrofílicos y el agua, lo que permite a las lipasas mantener una forma tridimensional estable y activa (Miller, 1991).

El descubrimiento de lipasas que son capaces de actuar en solventes orgánicos tienen un rango de aplicación muy amplio en biocatálisis. Estas enzimas poseen alta capacidad de reconocimiento molecular y, por tanto, pueden ser utilizadas en las modificaciones selectivas de compuestos polihidroxilados y sustratos alifáticos (Lambusta, 2003)

2. ANTECEDENTES

4.1 Lipasas como biocatalizadores

El uso de lipasas en síntesis orgánica tiene un impacto cada vez más grande. Las lipasas son utilizadas para catalizar una amplia variedad de transformaciones quimio-, regio-, y estereoselectivas (Rubin, 1997; Kazlauskas, 1998; Berglund, 2000). La mayoría de las lipasas empleadas en catálisis de química orgánica son de origen microbiano. Estas enzimas trabajan en interfase ya sea hidrofílica o lipofílica y toleran los solventes orgánicos en la mezcla de reacción.

Las lipasas en medios orgánicos libres de fase acuosa pueden tener propiedades insólitas, por lo cual estas enzimas son empleadas para síntesis y biotransformaciones. (Klibanov, 1997). Las lipasas han sido ampliamente investigadas en varias biotransformaciones libre de fases acuosas (Therisod, 1987; Klibanov, 1989; Tsai, 1996; Ducret, 1998; Dong, 1999).

La cantidad de agua o a_w en la mezcla de reacción puede determinar la dirección de la reacción catalizada por lipasas. Cuando el a_w es pequeño o nulo sólo la transesterificación y la esterificación es favorecida. La reacción de hidrólisis se favorece cuando existe un exceso de agua (Klibanov, 1997). Se ha investigado que las lipasas son capaces de catalizar reacciones en solventes supercríticos (Rantakyla, 1996; Tunner, 2001; King, 2001).

Las lipasas acetilan con alta regioselectividad ciertos esteroides, azúcares y sus derivados. Los azúcares monoacetilados han sido producidos con piridina anhidra, trietil carboxilatos y varios monosacaridos (Therisod, 1987). Chen (1995) utilizó la lipasa de *A. niger* para catalizar la desacetilación regioselectiva del metil β -D-glucopiranosido.

Las lipasas han sido usadas exitosamente en síntesis y catálisis de ésteres. Los ésteres producidos por ácidos grasos de cadena corta tienen aplicación como agentes saborizantes en la industria de alimentos. Los metil y etil ésteres obtenidos por ácidos cadena larga han sido utilizados para enriquecer combustibles (Vulfson, 1994).

Algunas lipasas catalizan la transesterificación de tricaprilina y éster etílico de ácido linoleico conjugado produciendo un triacilglicerol con ácido linoleico conjugado. Se probaron seis lipasas comerciales y siete solventes para esta investigación. La reacción de transesterificación fue llevada a cabo incubando una relación molar de



1:2 de tricaprilina y éster etil de CLA en 3 mL de solvente a 55 °C y los productos fueron analizados por cromatografía de gases. Se observó que tres de las enzimas comerciales utilizadas tenían una alta incorporación de CLA en el triacilglicerol con diferente especificidad (Kim et al, 2001).

La selectividad en la transformación de compuestos multifuncionales es un objetivo muy importante en la síntesis orgánica, por lo tanto investigar nuevos métodos selectivos es de interés, mediante el empleo de enzimas que posean alta especificidad de sustrato, resulta un área de investigación importante. Entre los productos a desarrollar están los que resultan de la modificación selectiva de sustratos alifáticos y compuestos aromáticos polihidroxilados, así como las aplicaciones encaminadas a regio-protoger fenoles y flavonoides (Lambusta, 2003).

4.2 Género *Bacillus*

4.2.1 Características y clasificación

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, que se compone de una gran cantidad de especies ya que sus requisitos taxonómicos consisten en ser un bacilo largo, aerobio, capaces de formar endosporas y son Gram positivos. Las esporas pueden ser termorresistentes y son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos gracias a sus enzimas hidrolíticas (Berkeley, 1984). Esto les permite colonizar distintos ambientes que pueden ser ácidos, alcalinos y/o altas temperaturas. Se ha reconsiderado como un género no patógeno para el humano. Todas estas características hacen del género *Bacillus* una fuente de enzimas con interés biotecnológico, (Harwood, 1992). Una de las especies de género *Bacillus* mas utilizada es *B. subtilis*, aunque tiene la desventaja de que produce al menos siete proteasas extracelulares, lo que puede ocasionar degradación del sustrato así como de las mismas enzimas producidas; para evitarlo se han construido cepas con actividad proteolítica disminuida (Harwood, 1992).

4.3 Generalidades de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

El microorganismo a investigar, *Bacillus pumilus* GMA1, se aisló de aguas termales mexicanas en la región de Los Azufres, Michoacán. Es un bacilo largo, Gram positivo, que presenta diversas actividades hidrolíticas (xilanolítica y proteolítica), además de producir una lipasa extracelular que presenta preferencia por ácidos



grasos de cadena corta como sustrato (Bustos, 1995). Esta presenta características poco comunes e interesantes, ya que muestra actividad a valores elevados de temperatura (50°C), a un pH alcalino (pH 10 a 10.5) y en solventes orgánicos. La lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 es homóloga a la lipasa de *Bacillus subtilis* (Bustos, 1998), ya que ambas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos en sus formas maduras y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa.

Tabla 4.1. Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género *Bacillus*.

MICROORGANISMO DE PROCEDENCIA	pH DE MÁXIMA ACTIVIDAD	TEMPERATURA DE MÁXIMA ACTIVIDAD (°C)	PESO MOLECULAR (kDa)
<i>B. pumilus</i> DSM5776	9.5	30	19.3
<i>B. pumilus</i> B26	8.5	35	19.2
<i>B. subtilis</i> 168 Lip A	10.0	37	19.3
<i>B. pumilus</i> GMA	10.5	50	19.5
<i>B. lichenniformis</i>	10.0-11.5	50-60	19.2
<i>Bacillus</i> sp.	6.4	60	22.0

En la actualidad más de 20 enzimas lipolíticas de la familia I.4 han sido identificadas y caracterizadas a partir del género *Bacillus*. Estas incluyen lipasas y esterases de microorganismos mesófilos o termófilos. Entre algunas de ellas se encuentran las enzimas de *B. pumilus* B26 (Kim, 1998), *B. pumilus* DSM5776 (Moller, 1991), *B. subtilis* 168 LipA (Sugihara, 1991), *B. licheniformis* (Nthangeni, 2001), *Bacillus* sp. (Dharmstithi, 1996), entre otras. En la Tabla 4.1 se muestran algunas propiedades bioquímicas de estas enzimas. Se aprecia que la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 es 10-15 °C más termoactiva con respecto a otras de la misma especie, ya que su temperatura de actividad máxima es de 13°C más en comparación con la de *B. subtilis* 168. Es interesante el dato ya que con esta última hay una identidad del 74% a nivel de proteína y hasta 83% si se hacen consideraciones funcionales con respecto a la naturaleza de los aminoácidos que la componen.

El microorganismo aislado fue caracterizado bioquímicamente por Bustos (1995), con los siguientes resultados:

Tabla 4.2. Resultados de la caracterización bioquímica de *Bacillus pumilus* GMA1 (Bustos, 1995)

<i>Prueba / Resultado</i>	<i>Prueba / Resultado</i>	<i>Prueba / Resultado</i>	<i>Prueba / Resultado</i>
Glicerol (+)	Eritritol (-)	D-Arabinosa (-)	L-arabinosa (+)
Ribosa (+)	D-Xilosa (+)	L-Xilosa (+)	Adonitol (-)
β -Metil-D-Xilósido (-)	Galactosa (-)	Glucosa (+)	Fructosa (+)
Manosa (+)	Sorbosa (-)	Rhamnosa (-)	Dulcitol (-)
Insitol (+)	Manitol (+)	Sorbitol (-)	α -Metil-D-Mannósido (-)
α -Metil-D-Glucósido (+)	N-Acetil-glucosamina (-)	Amigdalina (+)	Arbutina (+)
Esculina (+)	Salicina (+)	Celobiosa (+)	Maltosa (+)
Lactosa (+)	Melibiosa (-)	Sacarosa (+)	Trehalosa (+)
Inulina (-)	Melezitosa (-)	Rafinosa (-)	Almidón (-)
Glucógeno (-)	Xilitol (-)	Gentiobiosa (+)	D-Turanosa (-)
D-Lixosa (-)	D-Tagatosa (+)	D-Fructosa (-)	I-Fructosa (-)
D-Arabitol (-)	L-Arabitol (-)	Gluconato (-)	2-Ceto-gluconato (-)
Arginina dihidrolasa (-)	Producción H ₂ S (-)	Producción de acetoina (+)	Lipasa (+)
5-ceto-gluconato (-)	Tinción de Gram (+)	Lisina descarboxilasa (-)	Ureasa (-)

4.4 Compuestos bioactivos en alimentos

Los alimentos contienen una serie de sustancias que si bien no ejercen un rol nutricional, pueden tener impacto significativo contra la acción nociva de sustancias provenientes de la dieta y del entorno ambiental que afectan la salud de la población. Se les conoce como sustancias bioactivas y se encuentran abundantemente en frutas, verduras, cereales integrales, leguminosas y leche (Andlauer, 2002).

Tabla 4.3. Compuestos bioactivos contenidos en alimentos (Chasquibol, 2003)

Sustancia bioactiva	Propiedad biológica	Fuentes	Usos
Carotenoides	Efectos contra el cáncer de próstata, pulmón y piel	Cítricos, jitomate, cilantro, espinaca, naranja y flores	Colorantes (margarinas, helados, bebidas)
Compuestos fenólicos	Previenen enfermedades cardiovasculares	Arándano, uvas, fresas, granos y cebada	Conservación de color de mariscos Desodorante alimenticio
Flavonoides	Efectos contra células cancerosas, alergias, inflamaciones, úlceras	Frutas cítricas, semillas, cereales, plantas aromáticas	Producción de refrescos y dulces
Ácidos grasos esenciales	Reducen los niveles de colesterol, efecto antioxidante, efecto en el sistema inmune	Aceites vegetales (aceite de maíz, aceite de soya, aceite de girasol) y en la grasa animal (leche)	Suplemento alimenticio regulador metabólico

Entre las sustancias químicas que ejercen esta actividad están compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos grasos esenciales y carotenoides, que se muestran en la Tabla 4.3.

4.4.1 Ácidos fenólicos

Se encuentran distribuidos en el reino vegetal y son constituyentes importantes de la dieta tanto humana como animal. El interés de estos compuestos se ha ido incrementando debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones benéficas en la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedad cardiovascular y otras patologías de carácter inflamatorio (Berlitz, 1997; Hong, 1997).

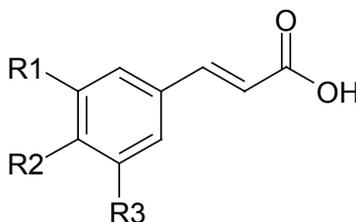


Figura 4.1. Estructura básica de los ácidos fenólicos.

4.4.1.1 Ácidos hidroxicinámicos

Son compuestos fenólicos que contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, los cuales le confieren la propiedad de ser antioxidantes naturales. Se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales y comúnmente se les puede encontrar en el café, cereales y en algunas frutas (Gross, 1999). Los ácidos *p*-hidroxicinámicos más importantes son ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeíco y ácido sinápico. Se encuentran esterificados con un azúcar o algunos ácidos orgánicos.

4.4.1.1.1 Ácido cumárico

El ácido 3-fenil-(4-hidroxi)-2-propenoico es comúnmente conocido como ácido *p*-cumárico y se le puede encontrar en frutas tales como manzana, ciruela, uva y arándano y en vegetales como tomate, brócoli, zanahoria, espinaca y también en algunos granos. Otorga a los alimentos propiedades como estabilidad, color y fragancia (Maldonado, 1998).

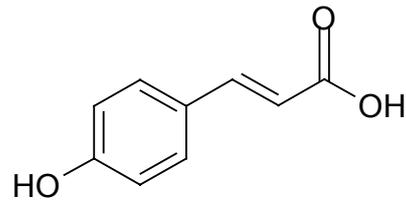


Figura 4.2. Ácido cumárico

4.4.1.1.2 Ácido ferúlico

El ácido 3-fenil-(4-hidroxi-3-metoxi)-2-propenoico, es un compuesto que se encuentra en una amplia variedad de plantas y en mayor cantidad en la cascarilla de maíz, en granos de trigo, cebada, sorgo y avena. Se encuentra en frutas como: ciruela y manzana; en vinos, en café y en la cerveza, donde tiene una participación en el sabor de la misma.

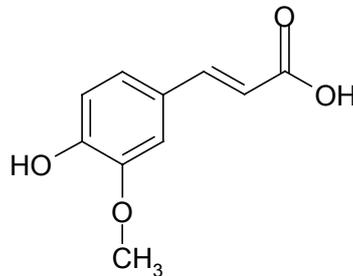


Figura 4.3. Ácido ferúlico

A nivel industrial su importancia radica como inhibidor de sabores amargos, es un ingrediente activo en lociones y cremas que protegen contra rayos UV, presenta actividad antitumoral, hipocolesterolémica y anticancerígena. El ácido ferúlico se encuentra como éster en muchas plantas unido a disacáridos y glicoproteínas (Sefkow, 2001).

4.4.2 Triterpenos:

Son un amplio y estructuralmente diverso grupo de productos naturales, derivados de C_{30} . Son aislados principalmente de productos de soya y granos. Poseen un amplio rango de actividades biológicas; por ejemplo, previenen el cáncer en pulmones, glándulas mamarias, colón, estómago y próstata además de tener propiedades anti-VIH, antibacterianas y se usan en el tratamiento contra aterosclerosis. Ejemplo de estos compuestos son la β -Amirina y el colesterol (Somova, 2004).

4.4.2.1 β -Amirina



Es uno de los triterpenos más comunes e importantes encontrados sobre todo en plantas. A la β -Amirina se le han hecho numerosos estudios de actividad biológica los más relevantes son: actividad anti-inflamatoria y antioxidante. Este compuesto evita la peroxidación de lípidos y el daño a membranas en el sistema biológico, que causan inflamaciones así como el cáncer, es por eso la importancia de buscar productos naturales que protejan a las membranas contra el daño oxidativo e inhiban la formación de radicales libres y especies reactivas. En la medicina tradicional se emplean como tónico laxante, antidiabético y diurético o bien para el tratamiento de hemorroides y problemas vasculares (Takahashi, 1999).

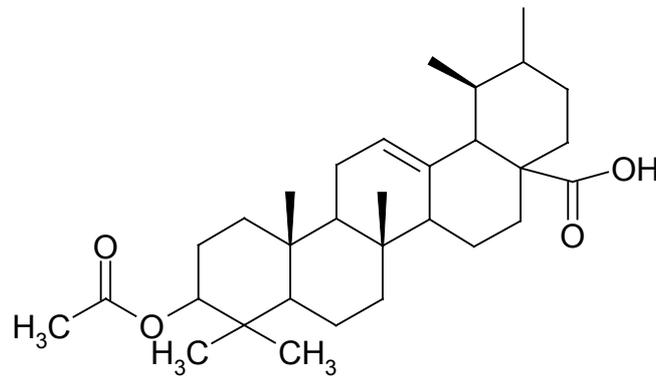


Figura 4.4. β -Amirina

4.4.2.2 Colesterol

El colesterol es imprescindible para la vida por sus numerosas funciones, es un componente muy importante de las membranas plasmáticas de los animales (no existe en los vegetales), precursor de Vitamina D, precursor de las hormonas sexuales, sintetiza la progesterona, los estrógenos y la testosterona y precursor de las sales biliares.

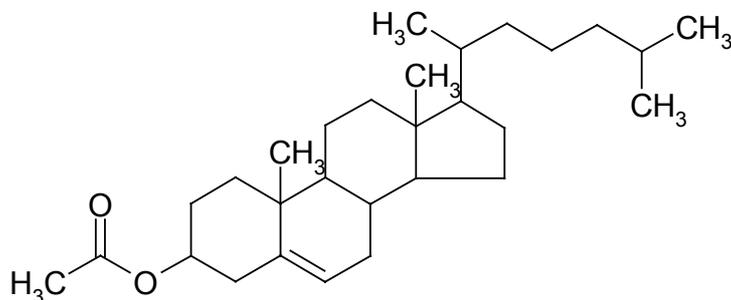


Figura 4.5. Colesterol

4.4.3 Flavonoides

Los flavonoides son una clase secundaria de los metabolitos fenólicos y se encuentran en casi todas las plantas.

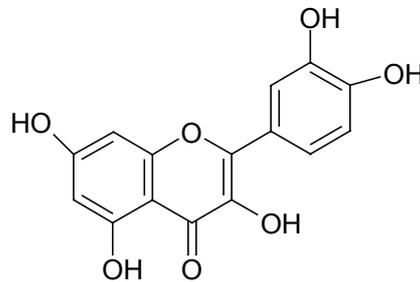


Figura 4.6. Estructura general de flavonoides

Muchos estudios han sugerido que los flavonoides manifiestan actividades biológicas como: antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas. En su mayoría los beneficios de los flavonoides son atribuidos a su capacidad de inhibir la peroxidación de los lípidos y a sus propiedades quelantes. Poseen efectos cardioprotectores únicos en su género (Mellou, 2005).

Algunas de las propiedades de los flavonoides se explican con más detalle a continuación (Mellou, 2005):

Propiedades anticancerígenas: Muchos han demostrado ser muy eficaces en el tratamiento del cáncer, pues inhiben el crecimiento de las células cancerosas y existen pruebas en el caso de cáncer de hígado.

Propiedades cardiotónicas: Tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Este efecto ha sido atribuido fundamentalmente al flavonoide quercetina, aunque también, en menor intensidad a otros, como la genisteína y la luteolina. Estos efectos permiten decir que los flavonoides reducen el riesgo de enfermedades cardíacas.

Fragilidad capilar: Mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.

Propiedades antitrombóticas: La capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.

Disminución del colesterol: Poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triacilgliceroles.

Protección del hígado: Algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado. Fue probado en laboratorio que la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.

Protección del estómago: Ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.

Antiinflamatorios y analgésicos: La hesperidina se ha utilizado por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias y se pueden utilizar en el tratamiento de las hemorroides.

Antimicrobianos: Los flavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

Propiedades antioxidantes: En las plantas los flavonoides actúan como antioxidantes, especialmente las catequinas del té verde. Durante años se ha estudiado su efecto en el hombre y los resultados a la fecha son contradictorios.

4.4.4 Ácido kójico

El ácido kójico es un antibiótico producido por muchas especies de *Aspergillus*, *Acteobacter* y *Penicillum* en procesos aerobios, a partir de un amplio rango de fuentes de carbono. Este compuesto se ha encontrado en diversas fermentaciones comestibles y en bebidas orientales (frijol de soya, sake y jugo de soya). Se emplea comúnmente en la industria alimenticia como aditivo para prevenir el oscurecimiento enzimático y en cosméticos, posee efectos en el blanqueamiento de la piel y previene el bronceado causado por el sol y de la radiación UV (Synytsya, 2007).

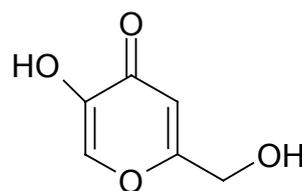


Figura 4.7. Ácido kójico

Sus derivados son compuestos prometedores para el uso en humanos y medicina veterinaria. Además, es un agente quelante de metales catiónicos y organometálicos, lo que permite su uso con propósitos analíticos y contribuye a su actividad antimicrobiana y antifungal (Synytsya, 2007).

4.4.5 Ácido linoleico conjugado:

El incremento del valor nutricional de los lípidos es una necesidad de la industria alimentaria, ya que su consumo ha sido asociado al incremento en enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, se han reportado efectos metabólicos benéficos asociados con el consumo de triacilgliceroles que contienen niveles sustanciales de ácidos grasos específicos. Para ello, se han desarrollado nuevas tecnologías para modificar grasa y aceites que permitan incorporarlos para que los productos lipídicos ofrezcan beneficios a la salud tras su ingesta.

El CLA es lípido que ha atraído la atención de expertos en nutrición y de la industria de alimentos. Después de la incorporación de este ácido graso en un alimento, los productos se pueden comercializar como nutracéuticos. El término CLA se refiere a una mezcla geométrica y posicional de isómeros de ácido linoleico que tiene dobles enlaces conjugados. Las fuentes de obtención de CLA son grasas de animales (especialmente en la leche de vaca) y la carne de animales rumiantes (Torres, 2005).

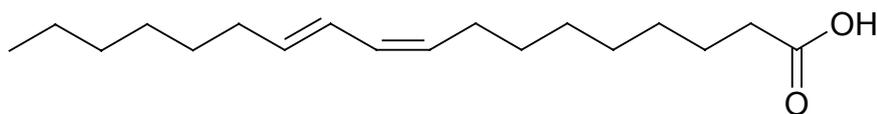


Figura 4.8. Ácido linoleico conjugado

5. OBJETIVOS

5.1 General:

- ✓ Evaluación del uso de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 en reacciones de hidrólisis de compuestos fenólicos acetilados con propiedades bioactivas y en una reacción de síntesis (interesterificación) enzimática con ácido linoleico conjugado para la obtención de un lípido funcional en alimentos.

5.2 Particulares:

- ✓ Obtener las condiciones en las cuales hay mayor producción de la enzima por fermentación de *Bacillus pumilus* GMA1.
- ✓ Determinación las condiciones de la reacción de síntesis, evaluando el efecto de la polaridad del solvente orgánico y la actividad acuosa.
- ✓ Evaluación de la capacidad de modificación de compuestos con capacidad bioactiva.
- ✓ Comparación de las reacciones de biocatálisis contra una enzima comercial

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Reactivo	Marca
Ácido acético glacial	Baker
Ácido cumárico	Sigma
Acetato de etilo grado reactivo y HPLC	Baker
Ácido ferúlico	Sigma
Aceite de olivo	Sigma
Acetona grado reactivo	Baker
Ácido kójico	Sigma
Ácido linoleico conjugado	Sigma
Ácido tricloroacético	Research Organics
Agar bacteriológico	Bacto
Agar nutritivo	Baker
Albúmina sérica bovina	Sigma
Alcohol etílico	Baker
β -Amirina	Sigma
Bicarbonato de sodio	Baker
Caldo BHI	BD Difco
Caldo nutritivo	Bioxon
Carbonato de sodio anhidro	Baker
Catequiza	Sigma
Cloroformo	Baker
Cloruro de sodio	Baker
Deoxicolato de sodio	Bioxon
2',7'- Diclorofluoresceína	Fluka
Diclorometano	Merck
Difeniletíl acetato	Sigma
Dihidrocolesterol	Sigma
Dilaurato de Ácido Kójico	Sigma
DMSO	Baker
DPPH	Sigma
Epicatequina	Sigma
Éter de petróleo	Baker
Fast red TR	Sigma
Fenol-Folin-Ciocalteu	Sigma

Fosfato monobásico de potasio	Baker
Fosfato dibásico de potasio	Merck
Goma arábiga	Sigma
Glicerol anhidro	Baker
Hesperetina	Sigma
Hexano	High Purity
Hidróxido de sodio	Baker
Hidroquinona	Sigma
Lipasa de <i>Candida antarctica</i> fracción B	Novo Nordisk
Marcadores de peso molecular Low range	BioRad
Marcadores de peso molecular Ultra Low range	BioRad
Membrana de límite de extracción de 10,000 (10 PL)	Millipore
Metanol grado reactivo y HPLC	Baker
α -Naftil acetato	Sigma
Nitrato de Magnesio	Mallinckrodt
<i>p</i> -Nitrofenol 10 μ mol/mL (solución estándar)	Sigma
<i>p</i> -Nitrofenol acetato	Sigma
<i>p</i> -Nitrofenol butirato	Sigma
<i>p</i> -Nitrofenol caproato	Sigma
<i>p</i> -Nitrofenol laurato	Sigma
<i>p</i> -Nitrofenol palmitato	Sigma
Placas de aluminio de gel de sílice con un espesor 0.2mm SIL G/UV ₂₅₄	Alugram
1-Propanol	Baker
Proteosa peptona	Difco
Quercetina	Sigma
Reactivos de electroforesis	BioRad
SDS	Sigma
Sulfato de cobre	Baker
Sulfato sérico	Sigma
Tamiz molecular de 4 Å	Sigma
Tartrato de potasio	Mallinkodt
Tira API 50 CHB/E	BioMérieux
Tolueno	Monterrey
Tributirina	Sigma
Tricaprilina	Sigma
Tris-free base (Tris-hidroximetilaminometano)	Research Organic

Triton X-100

Research Organic

Tween 80 (Polioxietilen sorbitan Monoleato)

Sigma

6.2 Microorganismo y conservación

La cepa se conservó a -20°C en caldo nutritivo con glicerol al 15% (Bustos, 1995) por el método de “chaquira” o “glass beads” (Jones, 1991). Para asegurarse que el cultivo mantuviera sus características como extremófilo se creció a 50°C . Se realizaron tinciones Gram antes de preparar las “chaquiras” con el fin de verificar que el material biológico se encontrara en buenas condiciones, tanto de viabilidad como de pureza. La cepa se inoculó en caldo BHI preparado en buffer de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 7.2 a 50°C en forma estática hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, aproximadamente durante 12 h. El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min para obtener el paquete celular, éste último se lavó con agua proteosa peptona al 0.1% (estéril), se volvió a centrifugar a 10,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 6 mL medio de suspensión y conservación, el cual consiste de caldo BHI, preparado como anteriormente se menciona, con 15 % de glicerol (v/v) como crioprotector. Finalmente se distribuyó esta suspensión en viales de plástico estériles con 20 chaquiras o perlas de plástico, previamente lavadas y esterilizadas; la suspensión se adicionó hasta cubrir las chaquiras, el exceso se quitó con ayuda de una pipeta pasteur con la finalidad de eliminar las burbujas de aire en el interior del vial. Los viales se rotularon y almacenaron a -70°C en el ultracongelador marca Nuair para su uso posterior.

6.3 Verificación morfológica y bioquímica de *Bacillus pumilus* GMA1

Para evidenciar las características macroscópicas y microscópicas de *Bacillus pumilus* GMA1 se empleó tanto medio líquido como sólido. El líquido consistió en caldo BHI en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 con aceite de olivo al 1% y Tween 80 al 0.05% y como sólido se emplearon placas de agar nutritivo adicionado con tributirina al 0.5%. Para observar actividad lipolítica a ambos medios antes de esterilizarse en la autoclave Yamato Sterilizer mod 5M300 a 121°C por 15 min, se emulsificaron con un homogenizador marca Ika, mod T25 a una velocidad de 13,500 rpm durante 30 segundos. El medio líquido se incubó a 37° y 50°C en forma estática, el medio sólido se inoculó y se incubó a 37°C , por 24 h.

Se empleó un tira API 50 CHB/E para verificar la caracterización bioquímica del microorganismo, la cual se llevó a cabo con un sistema de identificación rápida para *Bacillus* y microorganismos próximos, Gram (+), así como los bacilos Gram negativos pertenecientes a las *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. Básicamente consta de 49 pruebas estandarizadas, miniaturizadas y una base de datos (V4.0). Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira API 50 CHB/E contiene 49 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados (azúcares). Cada microtubo es una prueba bioquímica distinta.

Los microtubos se inocularon con una suspensión de células de *Bacillus pumilus* GMA1 en solución salina la cual rehidrató los medios. Las tiras se incubaron a 29°C durante 24 h y por efecto del metabolismo bacteriano se produjeron cambios de color o al añadir reactivos adicionales para interpretar la prueba. La lectura de algunas de las reacciones se hicieron a las 18 h y otras a las 24 h, la interpretación de los resultados se hizo mediante comparación con la literatura y con una base de datos Apiweb™.

6.4 Estandarización del método de actividad lipolítica

Para esta determinación se hicieron distintos ensayos con el fin de encontrar una técnica espectrofotométrica adecuada para la cuantificación de la actividad lipolítica, por lo cual se emplearon distintos *p*-Nitrofenol ésteres como sustratos (5 mM) y se variaron temperaturas, solventes y amortiguadores para probar la solubilidad y estabilidad de los sustratos. Los métodos espectrofotométricos se consideran como los métodos más rápidos, sensibles y sencillos para la determinación de la actividad.

<i>p</i>-Nitrofenol éster
Acetato
Butirato
Caproato
Laurato
Palmitato

Solvente
DMSO
Metanol
Acetona
Etanol
Isopropanol

En el caso seleccionado, la lipasa hidroliza y reconoce el sustrato *p*-Nitrofenol éster y se libera *p*-Nitrofenol, el cual es un compuesto colorido, que en medio alcalino absorbe en la región visible a una longitud de onda de 410 nm. Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón (Apéndice II). En la Tabla 6.1 se muestran los diferentes ensayos de actividad realizados para la determinación de las condiciones para esta cuantificación

Tabla 6.1. Ensayos de actividad lipolítica

Sustratos <i>p</i> -Nitrofenol ésteres	Solvente	Amortiguador	Temperatura (°C)/Tiempo de incubación (min)	Referencia
Butirato	Etanol	Fosfatos 0.05 M, pH 7.25	Ambiente (24°) y 60°/ 5	Nawani, 1999
Laurato	Etanol	Fosfatos 0.05 M pH 8.0	Ambiente (24°), 50° y 60°/5	
Palmitato	Etanol	Fosfatos 0.05 M pH 8.0	Ambiente (24°)/5	
Acetato	Acetona	Fosfatos 0.05 M pH 8.0	Ambiente (24°) / 5	
Acetato	Acetona	Fosfatos 0.05 M pH 7.5, Triton X-100	Ambiente (24°)/10	Isobe , 1988
Caproato	Isopropanol	Tris-HCl 0.02 M pH 8.5, 0.1% goma arábica, 0.2% deoxicolato	55°/2	Supachock, 2001
Butirato	Acetonitrilo	Fosfatos 0.05 M pH 7.2, 10% glicerol , NaCl 0.1mM	Ambiente (24°)	Tsujita, 1989
Palmitato	Isopropanol	Fosfatos 0.05 M pH 8.0, 0.1% (p/v) de goma arábica, 0.0% (p/v) deoxicolato de sodio	37°/ 15	Nthangeni, 2001
Palmitato	2-Propanol	Tris -HCl 0.5M pH 8.0, Triton X-100, goma arábica	37°/ 5	Vorderwülbecke , 1992

6.4.1 Determinación cualitativa de actividad de carboxiesterasa

Se emplearon α -Naftil acetato y Fast red TR (Karpushova, 2005) y la actividad se detectó por la aparición de color marrón, de acuerdo al procedimiento mostrado a continuación:

Solución A:

Se pesaron 5 mg de α -Naftil acetato, se disolvieron en 1.25 mL de acetona y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con un buffer de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.5.

Solución B:

Se pesaron 12.5 mg Fast red TR, se disolvieron en 12.5 μ L de Triton X-100 y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.5.

Para el ensayo en microplacas se adicionan 75 μ L del extracto enzimático y 75 μ L de la solución A, se incubó a 37°C durante 15 min y transcurrido este tiempo se agregaron 75 μ L de la solución B. La actividad se detectó por la aparición de color marrón.

6.5 Producción de la enzima

Se evaluó el crecimiento a 37° y 50°C con la finalidad de saber a que temperatura y fase de crecimiento el microorganismo tiene una mayor actividad lipolítica y posteriormente hacer un lote grande (mayor a 1 L) para obtener una mayor cantidad de lipasa.

6.5.1 Curva de crecimiento a 37° y 50°C

Se hizo un preinóculo a partir de una chaquiras de *Bacillus pumilus* GMA1 que se inoculó en 10 mL caldo BHI en un matraz de 50 mL. Se incubó a 50°C en forma estática, durante aproximadamente 12 h hasta obtener una DO_{595nm} de 0.8 a 0.9.

Este preinóculo se adicionó a 37 mL de caldo BHI con aceite de olivo al 1% y Tween 80 al 0.05%, que se incubó a 37°C en forma estática hasta obtener una DO_{595nm} de 0.8 a 0.9. Este inóculo se adicionó a 194 mL de caldo BHI. Se incubó a la temperatura a evaluar (37 ó 50°C) a 100 rpm. Se tomó muestra de esta fermentación a determinados tiempos durante 48 h para poder medir el crecimiento celular, pH, proteína soluble por el método de Lowry-SDS y actividad lipolítica.

6.5.1.1 Crecimiento celular

En cada toma de muestra se tomaron 2 mL de la fermentación, que se colocaron en tubos Eppendorf, se centrifugaron en una Microcentrifuga Eppendorf durante 10 min a 10,000 rpm. Se separó el sobrenadante y se almacenó para las determinaciones posteriores. El paquete celular se lavó dos veces con una solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y se resuspendió en 2 mL de solución salina, igual al volumen de donde provenían las células. Finalmente se leyó la absorbancia referida como DO_{595nm} en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D.

6.5.1.2 Determinación de pH

A cada muestra se le determinó el pH con el potenciómetro Beckman modelo 34 empleando un electrodo de vidrio a temperatura ambiente.

6.5.1.3 Cuantificación de proteína soluble por el método Lowry-SDS

La determinación se realizó a partir del sobrenadante que se obtuvo de centrifugar la muestra en la curva de crecimiento por el método Lowry-SDS (Petterson, 1977), el cual es un método químico que nos permite cuantificar la cantidad de proteína soluble en una solución. Esta técnica se basa en la formación de un complejo (cobre-proteína) en un medio alcalino con la reducción del reactivo Fenol-Folin-Ciocalteu, formando especies reducidas de coloración azul que se pueden cuantificar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina (Apéndice I) y a partir de esta curva y con el dato de absorbancia se calculó la cantidad de proteína en las muestras tomadas en la curva de crecimiento. Las soluciones para esta determinación se muestran a continuación:

- **CTC** (Carbonato de sodio 10%, tartrato de potasio 0.2%, Sulfato de cobre·5H₂O 0.1%)
- **NaOH** 0.8 N
- **Dodecil Sulfato de Sodio** (SDS): 10%

Solución A: Se mezclaron volúmenes iguales de las siguientes soluciones, en ese mismo orden: CTC, NaOH y SDS.

Solución B: Reactivo Folin-Ciocalteu-Fenol. Se hicieron diluciones 1:6.

NOTA: Ambas soluciones se prepararon momentos antes de comenzar la determinación.

El volumen final de la muestra fue de 1 mL, con agitación continua se agregó a cada muestra 1 mL de la solución A y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Se le agregó a cada tubo 0.5mL de la solución B con agitación continua y se dejó desarrollar la reacción durante 30 min. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en el espectro Milton Roy modelo Spectronic 21D.

6.5.1.4 Cuantificación de la actividad lipolítica

Se eligió el *p*-Nitrofenol acetato como la mejor opción para esta determinación. Este sustrato debe de estar a una concentración de 6 μ M disuelto en Tritón X-100 al 0.1% y en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.2. El ensayo se hizo a temperatura ambiente.

A continuación se muestra la metodología seguida para la cuantificación de la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1:

Se disolvieron 6 μ M de *p*-Nitrofenol acetato en 100 μ L de Triton X-100 (0.1%), en un tubo Eppendorf. En un tubo de ensaye se colocó la solución amortiguadora (9.9mL) de fosfatos 0.05 M, pH 7.2. El *p*-Nitrofenol acetato se adicionó al tubo con el buffer y se mezcló perfectamente. Finalmente se colocaron 900 μ L del buffer con el sustrato y se adicionaron 100 μ L del sobrenadante obtenido de la curva de crecimiento. La absorbancia se midió a 410 nm, tomando lectura del tiempo cero y al minuto cinco. Se hizo una diferencia de estas dos absorbancias y a este valor se le resta la autohidrólisis del sustrato (0.093). Con este dato de absorbancia y con ayuda de una curva patrón de *p*-Nitrofenol (Apéndice II) se calculó la cantidad de actividad lipolítica contenido en el extracto enzimático. Se define como una unidad de actividad lipolítica (U) a los μ g de *p*- Nitrofenol liberados en un minuto por mL de muestra.

6.6 Identificación de proteínas y actividad lipolítica “in situ”

6.6.1 Electroforesis

Para corroborar la presencia de la enzima de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, se realizaron geles de electroforesis de TSDS-PAGE (Schägger, 1987). Las



concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida utilizadas fueron de 4% en el gel concentrador y 15% en el gel separador. Se utilizaron marcadores de ultra-bajo peso molecular, cuyo rango se encuentra de 26.6 a 1.06 kDa. En el caso de los geles SDS-PAGE la concentración en el gel concentrador fue al 4% y el gel separador de 12.5%. La cantidad de proteína utilizada fue de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por carril. La electroforesis se corrió a 110 mA durante 4 h en una cámara, Miniprotean II de BioRad y en el caso de los geles TSDS-PAGE en el reservorio superior se puso el buffer del cátodo y en reservorio inferior el buffer del ánodo. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y para determinar el peso de las bandas se utilizó el densitómetro modelo GS 700 Biorad y el programa Quantity-One.

6.6.2 Precipitación de proteínas con TCA

Este procedimiento se utiliza para concentrar las proteínas antes de realizar una electroforesis TSDS-PAGE. Se agregaron 100 μL (1/10 volumen) de TCA al 100% (p/v) a 1 mL de extracto celular y se agitó en vortex por 15 segundos y se dejó reposar en hielo por 10 min, pasado este tiempo se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó 3 veces resuspendiéndolo con 100 μL de acetona y posterior centrifugación a 15,000 rpm por 5 min, tras lo que el sobrenadante se desechó y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 1 h y se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.2.

6.6.3 Zimograma

La actividad de la lipasa fue detectada por medio de un zimograma en geles nativos y geles SDS-PAGE. Después de correr el gel nativo se prepararon las siguientes soluciones para revelarlo:

Solución A: Se pesaron 5 mg de α -Naftil acetato disuelto en 1.25 mL de acetona, que se llevaron a un volumen final de 12.5 mL de buffer de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.2.

Solución B: Se pesaron 12.5 mg de Fast red TR, se adicionó Triton X-100 al 0.1% (12.5 μL) y se llevó a un volumen final de 12.5 mL de de buffer de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.2.

El gel se sumergió en la solución A durante 15 min con agitación constante a 37°C. Transcurrido este tiempo se agregó la solución B. La actividad lipolítica se detectó por la aparición de bandas de color marrón en el gel.

Por otra parte en los geles SDS-PAGE fue necesario remover el SDS pues disminuye significativamente la actividad de la enzima. Para lograrlo, el gel se lavó dos veces con una solución de NaCl 0.15 M adicionada con Triton X-100 al 5% durante 30 min con agitación constante. El tercer lavado se realizó en una solución salina 0.15 M con Triton X-100 al 0.05%. Finalmente se colocó el gel en buffer de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.2 durante toda la noche. El procedimiento para revelar la actividad de los geles nativos es el mismo que el mencionado anteriormente.

6.7 Obtención del extracto enzimático

Se realizó la fermentación en un volumen mayor de 1 L en matraces Fernbach con el fin de tener una cantidad de lipasa suficiente para las siguientes etapas de la investigación. La fermentación se realizó a la temperatura en la cual el microorganismo produjo mayor cantidad de lipasa, de acuerdo a las condiciones de manejo de inóculos reportados anteriormente.

El pre-inóculo se obtuvo en un matraz con 40 mL de caldo BHI, con cuatro chaquiras e incubación a 50°C durante aproximadamente 12 h, en forma estática. Para hacer el inóculo se adicionó la cantidad necesaria del pre-inoculo a 160 mL de caldo BHI se incubó a 50°C por aproximadamente 12 h en forma estática hasta una DO_{595nm} de 0.8 a 0.9. Una vez obtenida esta absorbancia, este inóculo se adicionó a un matraz fernbach con 800 mL de caldo BHI adicionado con aceite de olivo al 1% con Tween 80 al 0.05%, se incubó a 50°C a 100 rpm en la incubadora New Brunswick Scientific durante 12 h. Una vez obtenida la fermentación se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm y 4°C en el rotor JS30 de la centrifuga Beckman J2-MC.

6.7.1 Clarificación del sobrenadante

El paquete celular se eliminó y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman No. 2 para eliminar el aceite, dos veces en frío. El extracto se filtró

con un sistema de Millipore por una membrana de 0.22 μm en frío. Finalmente se concentró 10 veces por medio de una ultrafiltración en Amicon con una membrana de límite de extracción de 10,000 (10 PL).

6.7.2 Eliminación de la grasa

El extracto crudo obtenido se sometió a una extracción con éter (1:3 con respecto al volumen de la muestra). Se eliminó la fase etérea y se colectó la fase acuosa. Para eliminar todo el éter residual en la fase acuosa se pasó a través de un Rotavapor Büchi R-205 a una temperatura de 37°C. Se verificó la actividad lipolítica cuantitativamente con el método estandarizado.

NOTA: A partir de este punto el extracto enzimático se sometió a dos procesos diferentes, en el cual uno corresponde a las reacciones de síntesis y otro a las reacciones de hidrólisis.

6.8 Reacciones de Síntesis

6.8.1 Concentración del extracto enzimático

El extracto enzimático que se obtuvo después de la eliminación de la grasa se liofilizó en una liofilizadora Labconco.

6.8.2 Ajuste del a_w

Para llevar a cabo la reacción de síntesis es necesario equilibrar el sistema a un a_w determinado con soluciones saturadas de sales (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Valores definidos de a_w (Goldberg, 1990, Rendón, 2001)

Sal	a_w
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.33
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	0.53
NaCl	0.75
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.89

En este proyecto se empleó una a_w de 0.53 y 0.75. Las muestras se equilibraron en un desecador, como se muestra en la Figura 6.1, en el cual se colocaron las lipasas (tanto la comercial de *Candida antarctica* y la de *Bacillus*



pumilus GMA1) y los solventes previamente desecados con tamiz molecular 4Å durante 24 h. El sistema se equilibró durante 4 días en refrigeración. Para verificar el a_w se empleó en el equipo Aw Quick, Rotronic Instrument Corp.

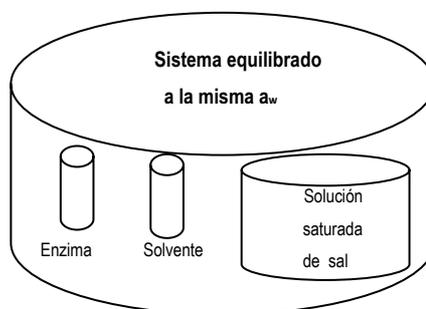


Figura 6.1. Sistema para equilibrar a un a_w determinado

6.8.3 Reacción de interesterificación

La mezcla de reacción consistió de 43.3 mg de tricaprilina, 56.7 mg de CLA (la proporción molar fue de 1:2), 700 mg de enzima liofilizada (con un a_w determinado) y 3 mL de solvente orgánico (Kim, 2001). Se emplearon hexano y tolueno, previamente secados con tamiz molecular. La reacción se llevó a cabo en viales de vidrio con tapón de rosca a 37°C por 72 h con una agitación de 200 rpm, en una incubadora con agitación orbital marca Lab-Line.

Como control positivo se empleó la fracción B de la lipasa de *Candida antarctica* (Novozym 525L) proporcionada por el Dr. Arturo Navarro. La mezcla de reacción fue la misma y se emplearon 10 mg de enzima. Después de la incubación, se añadió 1 mL de éter de petróleo para extraer los productos de la reacción. Los productos se separaron, se evaporó el solvente con un Rotavapor Büchi R-205 a una temperatura de 37°C y se analizaron por CCF y espectrometría de masas.

6.9 Reacciones de hidrólisis

Para estas reacciones se utilizó el extracto enzimático que se obtuvo después de la eliminación de la grasa.

6.9.1 Preparación de sustratos

Se disolvieron de 2 a 3 mg del compuesto fenólico en 3 mL de ácido anhídrido acético y se calentaron a 60°C durante 45 min. La mezcla de reacción se evaporó con N₂ hasta secarla. Una parte de esta mezcla se guardó para las reacciones y con el resto se determinó el punto de fusión y analizaron por, CCF para determinar su pureza.

6.9.2 Procedimiento de la desacetilación enzimática

El sustrato se disolvió en el solvente (acetona o tolueno), se añadieron 400 µL del extracto enzimático y se llevó a un volumen final de 3.5 mL con buffer de fosfatos 0.05 M pH 7. Se realizó un blanco y un control positivo con la lipasa de *Candida antarctica*. El blanco se preparó con buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 en lugar del extracto enzimático. El control positivo se preparó con 5 mg de lipasa y se resuspendió en 400 µL de buffer de fosfatos 0.05 M pH 7 para cada reacción.

En la Tabla 6.3 se muestran como se prepararon las reacciones de hidrólisis que se llevaron a cabo.

Tabla 6.3. Preparación de las reacciones de hidrólisis

Sustrato Acetilado	mg pesados	Solvente (2 mL)	Extracto enzimático (µL)	Buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5 (mL)
Ácido ferúlico	15	Tolueno	400	1.1
Ácido cumárico	50	Tolueno + 2 gotas diclorometano	400	1.1
Amirina	20	Tolueno	400	1.1
Colesterol	20	Tolueno	400	1.1
Hidroxiquinona	15	Tolueno + 2 gotas diclorometano	400	1.1
TBHQ	50	Tolueno + 2 gotas diclorometano	400	1.1
α-Naftil	20	Acetona	400	1.1
Difeniletíl	350µL	Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.5 + 0.035 mg de goma arabica	400	1.1

Quercetina	40	Acetona	400	1.1
Catequina	40	Acetona	400	1.1
Epicatequina	30	Acetona	400	1.1
Hesperetina	20	Acetona	400	1.1
Ácido kójico	50	Acetona	400	1.1
Dilaurato de ácido kójico	50	Acetona	400	1.1

NOTA: Se emplearon diferentes solventes ya que los sustratos tienen diferente solubilidad y las cantidades de dichos sustratos varían por que no se tenía la suficiente cantidad

Las reacciones se llevaron a cabo en viales de vidrio con tapón de rosca a 37°C por 72 h con una agitación de 200 rpm en una incubadora con agitación orbital marca Lab-Line. Después de la incubación, se adicionaron 2 mL de acetato de etilo para extraer los productos de reacción, excepto para las reacciones con colesterol y amirina ya que los productos se extraen con 2 mL de hexano. Los productos se separaron y el solvente se evaporó a 37°C con un Rotavapor Büchi R-205 y se analizaron por CCF, HPLC o CG.

6.10 Identificación de los productos de las reacciones de biocatálisis

6.10.1 CCF

Para evaluar la capacidad de las biotransformaciones se aplicaron las muestras después de incubarlas por 72 h, separar los productos y evaporar el solvente en una cromatoplaça. Antes de revelar las placas, se visualizaron en una lámpara de UV (onda corta de 254 nm y onda larga 365 nm) marca CAMAG. Posteriormente para el desarrollo de color se utilizaron reveladores como 2',7-Diclorofluoresceína y una cámara de yodo para los productos de síntesis y para los productos de hidrólisis: Sulfato cérico, ácido sulfúrico, vainillina y DPPH.

6.10.2 CG

El cromatógrafo de gases empleado fue un Agilent Technologies 6890N Network GC System, Inyector 7683 Agilent Technologies, con un detector de ionización de flama. La columna fue una DB-5MS de una longitud de 30 m, Diámetro interno (D.I.) de 0.25 mm y un recubrimiento de 0.25 µm, en un rango de temperatura de -60 a 325°C.

Una vez separados y concentrados los productos de las reacciones de hidrólisis, se realizó un estudio para verificar la presencia de los compuestos desacetilados de manera cualitativa, por lo cual la preparación de las muestras antes de inyectarlas fue la siguiente:

Los estándares acetilados y desacetilados, y los productos de hidrólisis. Se pesaron (5 mg) y se aforaron a 1 mL con acetato de etilo grado HPLC. Se inyectó 1 μ L de las muestras en el cromatógrafo en forma automática y cada muestra corrió por 35 min.

Para analizar el ácido ferúlico y los flavonoides (quercetina, catequina, epicatequina, hesperetina) se empleó el HPLC, dado que las condiciones en las que se corren las muestras son muy drásticas y se descomponen en el cromatógrafo de gases.

6.10.3 HPLC

El análisis de los sustratos desacetilados se llevó a cabo en un equipo HPLC marca Waters 1525, acoplado a detector de absorción UV Waters 2487 de absorbancia (λ). El sistema HPLC consiste en una Bomba Binaria Waters 1525, un calentador de columna y la forma de inyección es manual. El sistema es controlado mediante el software Breeze. La columna utilizada para la separación fue una de 3.9x155 mm Waters Symetry® C185 μ m. El tiempo de análisis fue de 15 min. Se emplearon dos fases móviles: la fase A consistió en ácido acético al 1%. La fase B consistió de metanol.

Una vez separados y concentrados los productos de las reacciones de hidrólisis. Se pesaron 5 mg de cada uno de los estándares acetilados y desacetilados, y de los productos de hidrólisis, se aforaron a 1 mL con acetato de etilo grado HPLC y se inyectaron 20 μ L de las muestras en el HPLC en forma manual.

El método con el cual se corrieron las reacciones del ácido ferúlico fue el siguiente:

Tabla 6.4. Método para correr el ácido ferúlico

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
--------------	-------------------	----	----

0	1	80	20
5	0.5	70	30
10	1	60	40
15	1	80	20

A una absorbancia $\lambda = 290$ nm a una temperatura de 25°C.

Las condiciones con las que se corrieron las reacciones de los flavonoides fue siguiente manera:

Tabla 6.5. Método para correr los flavonoides

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1	40	60
5	1	35	65
10	1	30	70
15	1	40	60

A una absorbancia $\lambda = 330$ nm a una temperatura ambiente (24°C)

Una vez obtenidos los cromatogramas, el tiempo de retención y el área tanto del HPLC y el cromatógrafo de gases, se realizaron los cálculos del % de eficiencia de desacetilación de los sustratos basándonos en los estándares acetilados.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Verificación morfológica y bioquímica de *Bacillus pumilus* GMA1

Esta caracterización morfológica del microorganismo se realizó en medio líquido y sólido dando los siguientes resultados:

7.1.1 Medio líquido

La Figura 7.1 muestra el aspecto al microscopio de la preparación y se aprecia que es un microorganismo Gram (+) y un bacilo largo.



Figura 7.1. Foto de la tinción Gram de *Bacillus pumilus* GMA1 a 100x. Se observó en un microscopio óptico marca Olympus CX31 con el objetivo 100x y se tomó una foto con una cámara marca Media Cybernetics integrada al microscopio.

Se puede ver también la formación de endosporas terminales y subterminales (Figura 7.2)

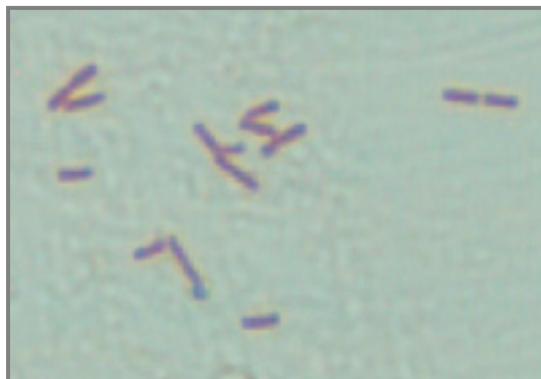


Figura 7.2. Formación de endosporas de *Bacillus pumilus* GMA1.

7.1.2 Medio sólido

En la Figura 7.3 se muestra que alrededor de la colonia existe un halo lipolítico que indica la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* GMA1 sobre la tributirina al 0.5% como sustrato.

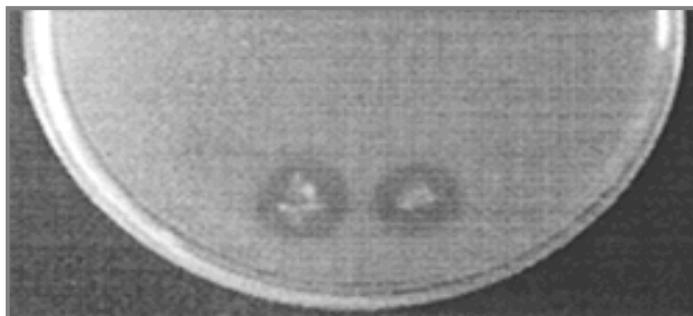


Figura 7.3. Observación del halo lipolítico, indicador de la actividad enzimática.

Además de la formación de halos lipolíticos traslucidos alrededor de la colonia, se observó que el color de la colonia era amarillo claro, de forma redonda, textura lisa y aspecto cremoso.

7.1.3 Pruebas bioquímicas

El perfil bioquímico del microorganismo se obtuvo a partir de una tira API 50 CHB/E, después de incubarla a 29°C durante 18 h y 24 h.

Tabla 7.1. Identificación bioquímica de *Bacillus pumilus* GMA1.

Prueba / Resultado	Prueba / Resultado	Prueba / Resultado	Prueba / Resultado
Glicerol (+)	Eritritol (-)	D-Arabinosa (-)	L-arabinosa (+)
Ribosa (+)	D-Xilosa (+)	L-Xilosa (-)	Adonitol (-)
β -Metil-D-Xilósido (-)	Galactosa (+)	Glucosa (+)	Fructosa (+)
Manosa (+)	Sorbosa (-)	Rhamnosa (-)	Dulcitol (-)
Insitol (-)	Manitol (+)	Sorbitol (-)	α -Metil-D-Mannósido (-)
α -Metil-D-Glucósido (+)	N-Acetil-glucosamina (-)	Amigdalina (+)	Arbutina (-)
Esculina (+)	Salicina (+)	Celobiosa (+)	Maltosa (+)
Lactosa (-)	Melibiosa (-)	Sacarosa (+)	Trehalosa (+)
Inulina (-)	Melezitosa (-)	Rafinosa (-)	Almidón (-)
Glucógeno (-)	Xilitol (-)	Gentiobiosa (-)	D-Turanosa (-)
D-Lixosa (-)	D-Tagatosa (+)	D-Fructosa (-)	l-Fructosa (-)
D-Arabitól (-)	L-Arabitól (-)	Gluconato (-)	2-Ceto-gluconato (-)
5-ceto-gluconato (-)			

Se tomaron las lecturas de los resultados obtenidos en una hoja de resultados, los cuales se compararon con una tabla de identificación y una base de datos Apiweb™. La calidad de la identificación de *Bacillus pumilus* GMA1 fue de un **99%**. Estos resultados corroboran a los obtenidos por Bustos (1995).

7.2 Estandarización del método de determinación de actividad lipolítica

Se probaron diferentes *p*-Nitrofenol ésteres como sustratos con una concentración de 5 mM y se disolvieron en solventes que presentaban diferente polaridad con la finalidad de probar su solubilidad y estabilidad, con el fin de encontrar el método mas adecuado para la cuantificación de la actividad lipolítica del extracto enzimático de *Bacillus pumilus* GMA 1. Los resultados se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Solubilidad de diferentes *p*-Nitrofenol ésteres en concentración 5 mM.

+ Inestable ++ Parcialmente estable +++Estable

<i>p</i> -Nitrofenol éster	DMSO	Metanol	Acetona	Etanol	Isopropanol
Acetato	+++	+++	+++	+++	+++
Butirato	+++	+++	+++	+++	+++
Caproato	++	++	++	++	++
Laurato	+	+	+++	++	++
Palmitato	---	+	+++	++	+++

Los sustratos con mejores resultados fueron el *p*-Nitrofenol acetato y el *p*-Nitrofenol butirato tanto en solubilidad y en estabilidad.

Para continuar con la estandarización del método, con estas condiciones se probaron distintos métodos reportados en la literatura, a los que se realizaron algunas modificaciones. En la Tabla 7.3 se muestran los resultados. Se aprecia que la mejor metodología fue la que emplea como sustrato *p*-Nitrofenol acetato (Isobe, 1999), porque mostró más estabilidad y mayor actividad de la enzima. Este procedimiento se empleó para la caracterización posterior de la actividad lipolítica.

Tabla 7.3. Resultados obtenidos en el ensayo de cuantificación de actividad lipolítica.

Sustratos p-Nitrofenol esteres Concentración	Solvente	Amortiguador	Temperatura (°C)/Tiempo de incubación (min)	Resultado
Butirato 0.01mM	Etanol	Fosfatos 0.05M, pH 7.25	Ambiente (24°) y 60°/ 5	Se hidrolizaba muy rápido con las dos temperaturas.
Laurato 0.01mM	Etanol	Fosfatos 0.05M pH 7.25	Ambiente (24°), 50° y 60°/5	Sistema estable, pero el sustrato esta descontinuado del mercado.
Palmitato 0.01mM	Etanol	Fosfatos 0.05M pH 7.25	Ambiente (24°)/5	No se detectó alguna actividad.
Acetato 0.01mM	Etanol	Fosfatos 0.05 M pH: 7.0 y 7.2	Ambiente (24°)/ 10	Cantidad de etanol ponía muy opaco el sistema.
Acetato 6µM	-----	Fosfatos 0. 05M pH 7.2, Triton X- 100 al 0.1%	Ambiente (24°)/5	Muy estable.
Butirato 50mM	Acetonitrilo	Fosfatos 0.05M pH 07.2, 10% glicerol , NaCl 0.1mM	25°	Se hidrolizaba muy rápido y no se podía leer en el espectro.
Caproato 8 mM	Isopropanol	Tris-HCl 0.02M pH 8.5, 0.1% goma arábica, 0.2% deoxicolato	55°/2	El sistema era muy inestable.
Palmitato 8mM	Isopropanol	Fosfatos 0.05M pH 8.0, 0.1% (p/v) de goma arábica, 0.0% (p/v) deoxicolato de sodio	37°/ 15	El sustrato estaba muy opaco y no se podía leer en el espectrofotómetro y la autohidrólisis era mayor.
Palmitato 0.8mM	Isopropanol	Tris-HCl 0.5M pH 8.0, Triton X-100, goma arábica	37°/ 5	La mezcla con el sustrato y la enzima, era muy opaca y no podía leer en el espectrofotómetro, esto probablemente sucedió por la molaridad del sustrato que es muy alta.

7.3 Cinética de crecimiento a 37° y 50°C.

Con el propósito de identificar las condiciones en las que se obtiene el mayor número de unidades de actividad lipolítica y para tener suficiente cantidad de enzima para su posterior uso, se determinaron las cinéticas de crecimiento y producción enzimática, a 37°C y 50°C respectivamente.

7.3.1 Cinética de crecimiento a 37°C

En la Figura 7.4 se muestra el comportamiento de *Bacillus pumilus* GMA1, en la que se observa el crecimiento celular (DO_{595nm}); su fase exponencial inicia a las 3 h y que tiene un máximo desarrollo a las 24h de fermentación y después de esa hora empieza la fase estacionaria esto puede deberse al agotamiento de nutrientes y por la acumulación de productos tóxicos en el medio. El pH se mantiene casi constante.

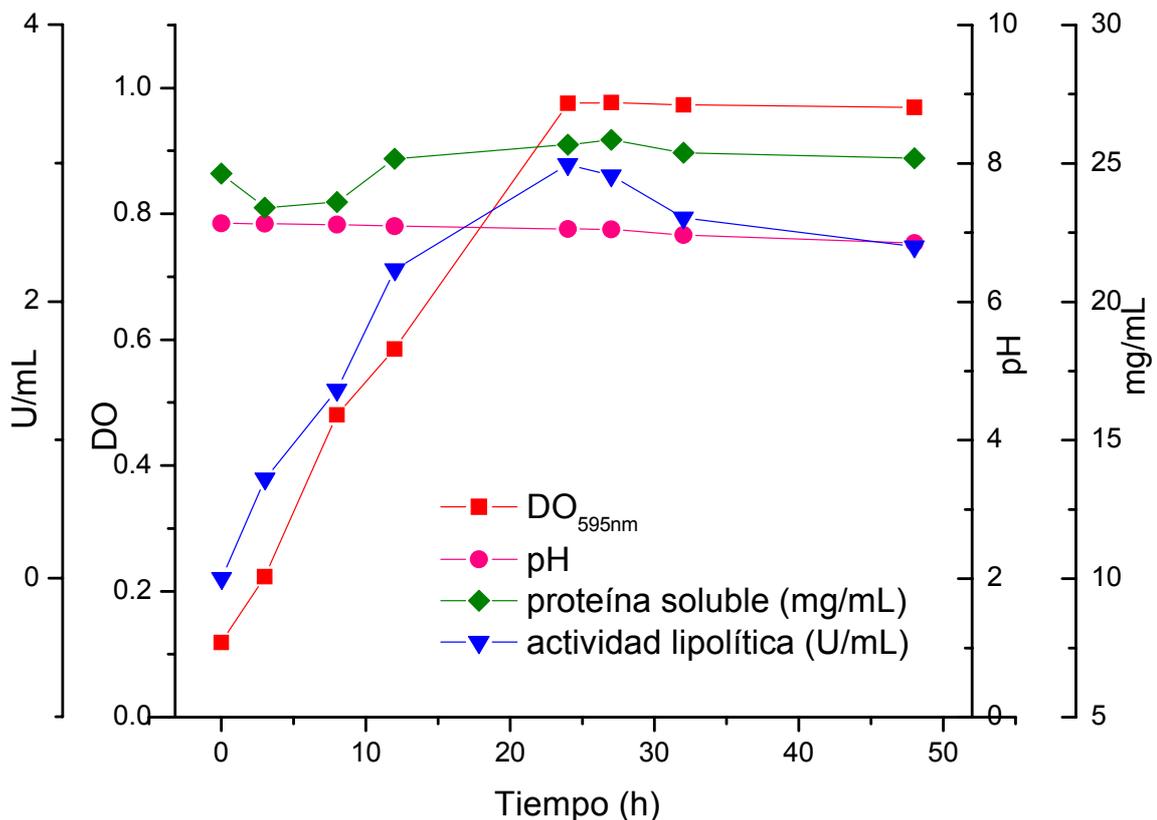


Figura 7.4. Cinética de crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 a 37°C.

El contenido de proteína soluble a lo largo de la fermentación se mantiene constante, y corresponde al contenido de proteína en el medio de cultivo sin células, el cual es de 23.70 mg/mL en el medio BHI.

La actividad lipolítica se manifiesta desde la fase lag, a las 3 horas, lo cual hace suponer que se trata de una enzima asociada al crecimiento. El tiempo en el que se alcanza más actividad lipolítica (2.99U/mL) es a las 24 h de fermentación.

Otra observación que se puede hacer es que cuando empieza la fase estacionaria, la actividad empieza a disminuir, lo que se puede deber a la producción de proteasas durante la fermentación y esta caída inhiba la actividad lipolítica de la cepa.

7.3.2 Cinética de crecimiento a 50°C

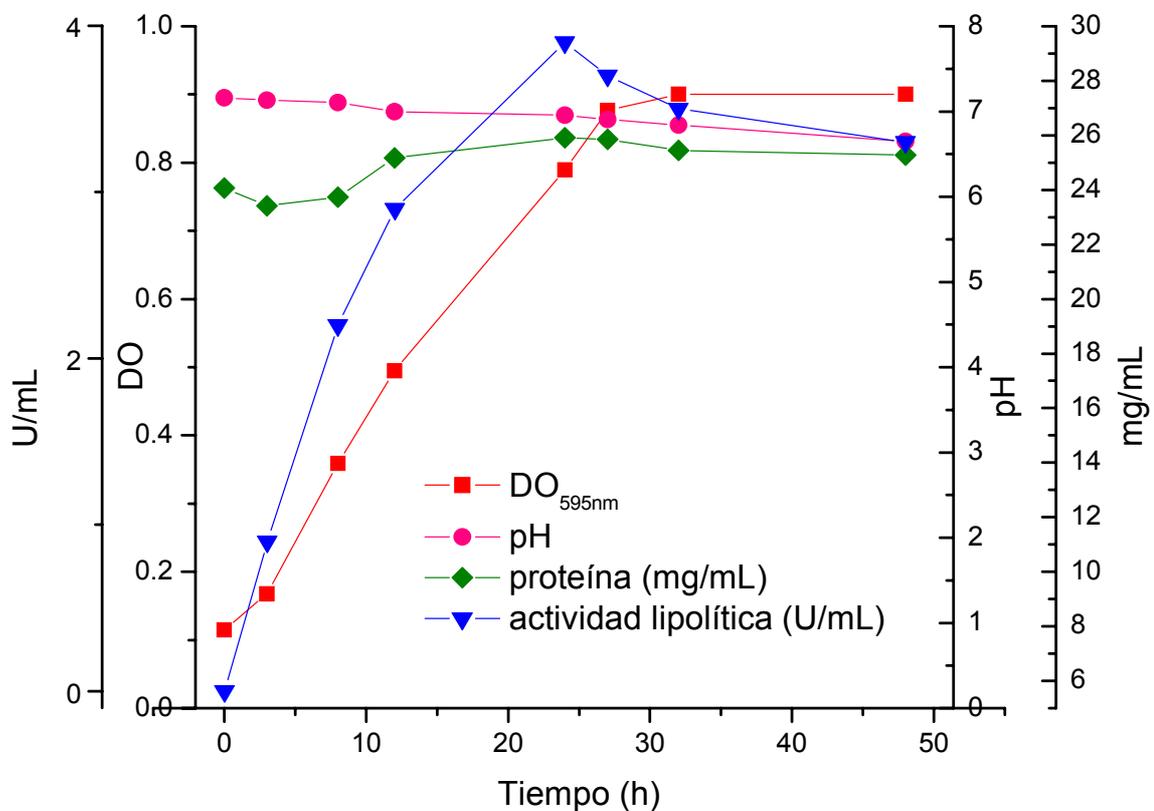


Figura 7.5. Cinética de crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 a 50°C

Los datos de la Figura 7.5 permiten ver que no hay diferencia significativa en el crecimiento a 37° y 50°C. La fase exponencial empieza a las 3 h y tiene un máximo desarrollo a las 27 h de fermentación, después de lo cual inicia la fase estacionaria. Se observa que el pH disminuye poco a poco, lo que puede ser debido a la liberación de ácidos grasos al medio extracelular, lo que indica que probablemente haya una mayor producción de enzima en estas condiciones.

La actividad lipolítica se manifiesta desde la fase lag, a las 3 horas, lo cual hace suponer que se trata de una enzima asociada al crecimiento, como ya se había mencionado en el caso del cultivo a 37°C. El tiempo en donde hay más actividad lipolítica (3.85U/mL) es a las 24 h de crecimiento. El contenido de proteína soluble en la fermentación a 50°C se mantiene constante, como ocurre con el cultivo a 37°C. En ambas condiciones se observó que hay una disminución en la actividad lipolítica después de 24 h de fermentación debido, probablemente, a que, por un lado el microorganismo entra a la fase estacionaria y por otro es que si inicia la producción de proteasas.

A 37°C hay un mayor crecimiento celular a las 24 h de fermentación que a 50°C, pero lo que se observó es que a 50°C hay más actividad lipolítica (3.85U/mL) que a 37°C (2.99 U/mL) por lo que se puede decir que no necesariamente se tiene que tener un mayor número de células para que haya una mayor producción de enzima. Por lo tanto las condiciones óptimas que se tomaron en cuenta para una producción de enzima a mayor escala fueron a 50°C durante 24h con una agitación de 100 rpm.

7.4 Identificación de proteínas y actividad lipolítica “*in situ*”

7.4.1 Electroforesis y zimograma

En la Figura 7.6 se muestra el gel teñido con azul de Coomassie en donde se aprecia el perfil de proteínas del extracto crudo y el extracto precipitado con TCA. Hay una enzima que tiene un peso correspondiente para la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 de 20.5 kDa (Mora, 2007). En el carril 1 está el extracto precipitado con TCA, se puede ver la muestra mucho más limpia de carbohidratos y se ven más definidas las bandas si se comparan con el carril 2, que es el extracto crudo. La electroforesis en geles de TSDS-PAGE se utilizó ya que tiene una mejor resolución que los geles de SDS-PAGE.

Los geles de TSDS separan con más resolución aquellas proteínas de un peso molecular entre 5-70 kDa, lo que corresponde a la proteína de nuestro interés, que tiene un peso molecular entre 19.5-21 kDa, por lo que fue más eficiente utilizar esta técnica.

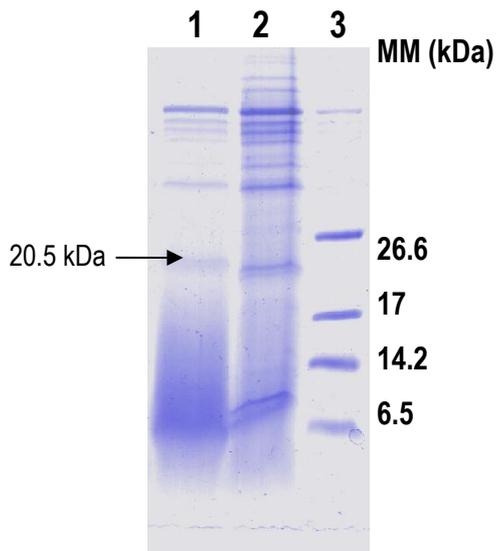


Figura 7.6. Perfil proteico del extracto enzimático de *Bacillus pumilus* GMA1 en gel TSDS-PAGE al 15%. (1), extracto crudo precipitado con TCA ; (2), extracto crudo. (3) MM Ultra-low.

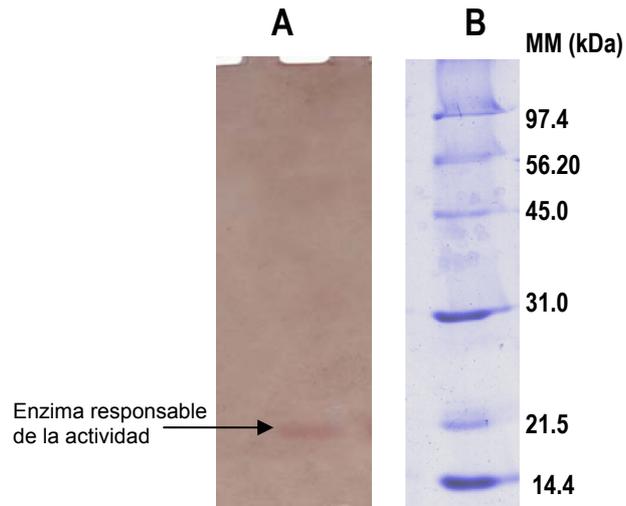


Figura 7.7. Zimograma de la enzima responsable de la actividad en gel SDS-PAGE al 12.5%. (A) Gel renaturalizado y revelado con α -Naftil acetato. (B) Marcadores de peso molecular teñidos con azul de Coomassie.



Figura 7.8. Zimograma de la enzima responsable de la actividad en gel nativo al 12.5%.

El zimograma en el gel SDS-PAGE renaturalizado y revelado con α -Naftil como sustrato se muestra en la Figura 7.7, en el que se ve que la actividad lipolítica está dada por una lipasa que tiene un peso molecular de 20.5 kDa, lo que corresponde al peso esperado. En el gel TSDS-PAGE no se pudo renaturalizar la enzima.

El zimograma en el gel nativo (Figura 7.8) muestra la aparición de una banda en la parte superior del gel mientras que en el gel SDS-PAGE la banda aparece en la parte inferior. Esto puede deberse a que en los geles nativos no se rompen las interacciones que hay entre las proteínas y la enzima forma un agregado de proteínas que por su peso y tamaño no puede correr en el gel y por esta razón se quedo en la parte superior del gel nativo.

7.5 Reacción de interesterificación enzimática

Los triacilglicerolos se aislaron por CCF con éter de petróleo/ éter etílico/ácido acético (90:10:1, v/v/v). Como reveladores se utilizaron: 2',7'-Diclorofluoresceína al 0.2% en etanol, una cámara de yodo y ácido sulfúrico.

7.5.1 Efecto del solvente y la a_w en la síntesis

En esta etapa se analizó qué efecto tenían en la reacción de síntesis diferentes solventes, hexano y tolueno. Los resultados de la CCF se muestran en la Figura 7.9.

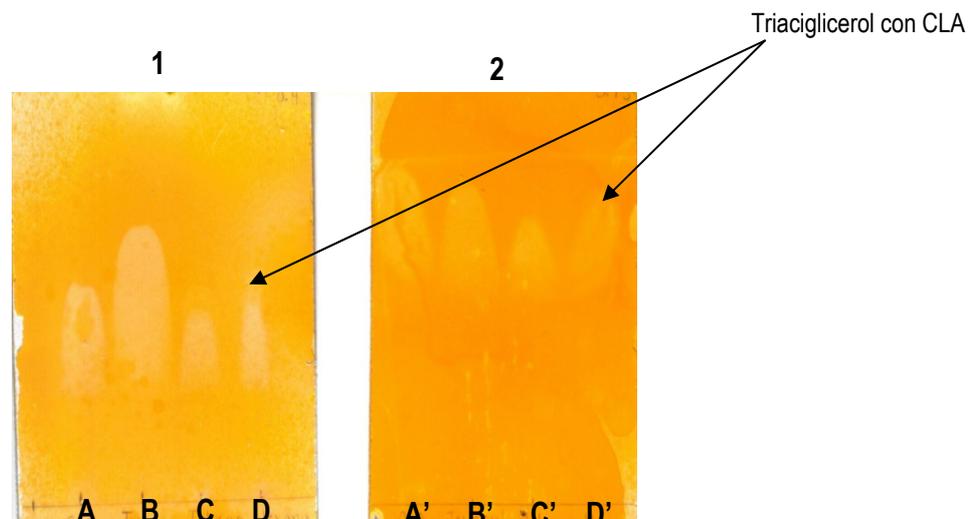


Figura 7.9. Visualización del efecto de solvente en la reacción de síntesis por CCF. Revelador 2',7'-Diclorofluoresceína. (1) **A**: Estándar CLA, $R_f = 0.5$; **B**: Estándar de Tricaprilina, $R_f = 0.66$; **C**: Rxn con tolueno $a_w = 0.5$, $R_f = 0.46$; **D**: Rxn con hexano $a_w = 0.5$, $R_f = 0.5$. (2) **A'**: Estándar CLA, $R_f = 0.95$; **B'**: Estándar de Tricaprilina, $R_f = 0.90$; **C'**: Rxn con tolueno $a_w = 0.7$, $R_f = 0.8$; **D'**: Rxn con hexano $a_w = 0.7$, $R_f = 0.9$.

En la Figura 7.9 se muestran los resultados. El hexano es el solvente más adecuado para realizar la síntesis, ya que permite ver el producto generado en la parte superior con los dos a_w evaluados (R_f 0.5 y 0.9) y se aprecia que el hexano es el mejor medio de reacción ya que la mancha es mas marcada. Esto puede deberse a que el hexano tiene un coeficiente de partición ($\log P$) de 3.5, mientras que el tolueno tiene

un valor de 2.5, (medida de la polaridad del solvente). Los solventes orgánicos con un valor de $\log P < 2.0$ son generalmente considerados no aptos para la biocatálisis (Claon, 1994).

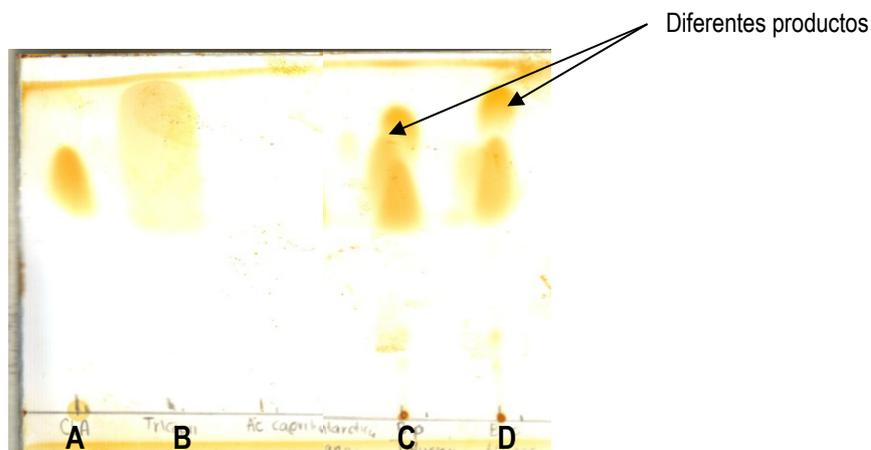


Figura 7.10. Efecto del a_w en la reacción de síntesis por CCF. Revelador Yodo. **A:** Estándar CLA, Rf= 0.78; **B:** Estándar de Tricaprilina, Rf= 0.98; **C:** Rxn con tolueno $a_w= 0.5$, Rf= 0.92; **D:** Rxn con hexano $a_w= 0.7$, Rf= 1.0.

En la Figura 7.10 se aprecia que a una $a_w=0.75$ (en hexano) hay productos diferentes a los que se encuentran cuando el $a_w=0.5$ (en tolueno). Pueden ser triacilglicéridos con CLA incorporado en distintas posiciones y para identificar en qué posiciones se encuentra el CLA dentro del triacilglicerol se debe realizar un análisis de espectrometría de masas.

7.5.2 Comparación con una enzima comercial

La reacción se llevó a cabo para *Bacillus pumilus* GMA1 y *Candida antarctica* en tolueno y hexano en un a_w de 0.7. Los resultados muestran que la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 si lleva a cabo la reacción de interesterificación y sin subproductos mayoritarios, como es el caso de *Candida antarctica* (Figuras 7.11 y 7.12).

Cabe mencionar que Kim y col (2001) observaron que con la lipasa de *Candida antarctica* hay una mayor incorporación de CLA (56.9%) en tricaprilina comparada con otras enzimas y que observaron que el hexano fue en el que tuvo mejores resultados en la biocatálisis.

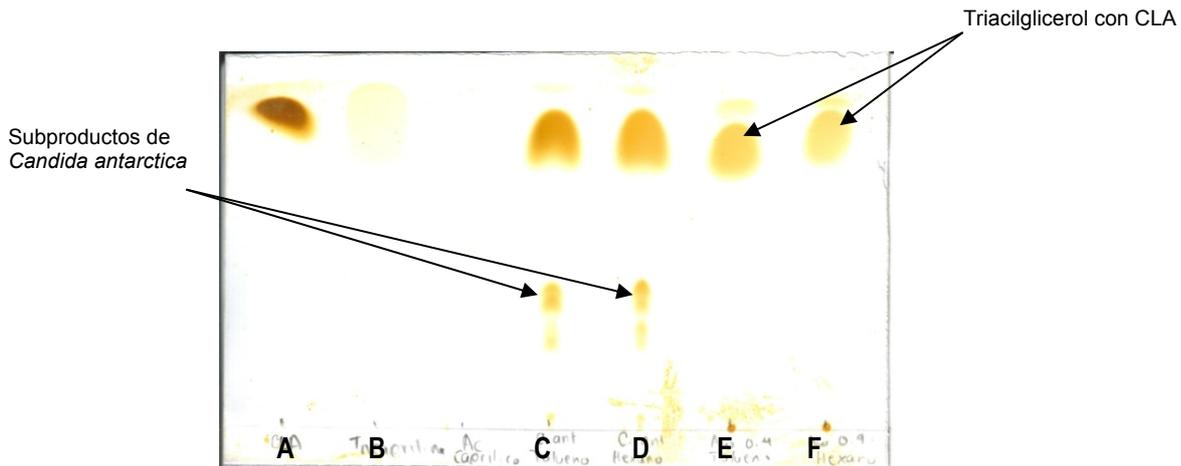


Figura 7.11. CCF reacción de interesterificación con las lipasas de *Bacillus pumilus* GMA1 y la de *Candida antarctica*. Revelador Yodo. **A:** Estándar CLA, $R_f = 0.87$; **B:** Estándar de Tricaprilina, $R_f = 0.96$; **C:** Rxn con la lipasa *Candida antarctica* $a_w = 0.7$, $R_f = 0.83$; **D:** Rxn con la lipasa *Candida antarctica* $a_w = 0.7$, $R_f = 0.87$; **E:** Rxn con la lipasa *Bacillus pumilus* GMA1 $a_w = 0.7$, $R_f = 0.87$; **F:** Rxn con la lipasa *Bacillus pumilus* GMA1 $a_w = 0.7$, $R_f = 0.87$.

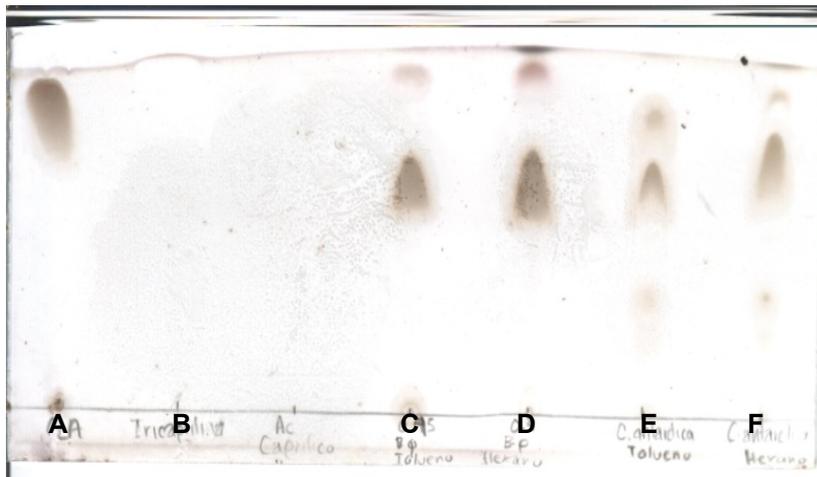


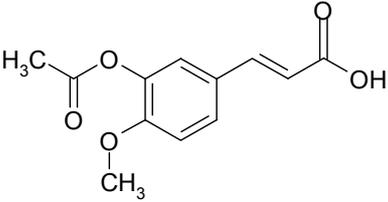
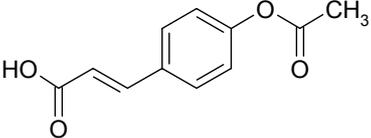
Figura 7.12. CCF reacción de interesterificación con las lipasas de *Bacillus pumilus* GMA1 y *Candida antarctica*. Revelador: ácido sulfúrico. **A:** Estándar CLA, $R_f = 0.83$; **B:** Estándar de Tricaprilina, $R_f = 0.94$; **C:** Rxn con la lipasa *Bacillus pumilus* GMA1, en tolueno, $a_w = 0.7$, $R_f = 0.86$; **D:** Rxn con la lipasa *Bacillus pumilus* GMA1, en hexano, $a_w = 0.7$, $R_f = 0.88$; **E:** Rxn con la lipasa *Candida antarctica*, en tolueno, $a_w = 0.7$, $R_f = 0.94$; **F:** Rxn con la lipasa *Candida antarctica*, en hexano $a_w = 0.7$, $R_f = 0.94$.

7.6 Reacciones de hidrólisis

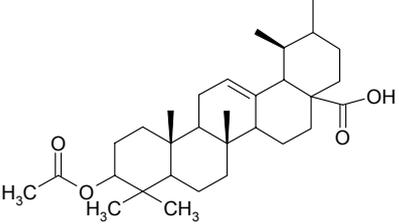
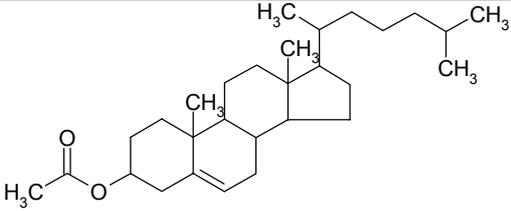
7.6.1 Preparación de sustratos acetilados

Se evaluó la capacidad de modificar sustratos acetilados por parte de la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 y de la lipasa comercial de *Candida antarctica*. Los sustratos se agruparon de acuerdo a su naturaleza química. Una vez acetilados se les determinó el punto de fusión para determinar su pureza. Los resultados se muestran a continuación, junto con las características químicas de cada compuesto.

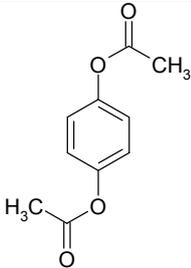
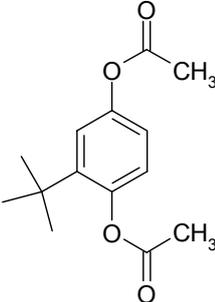
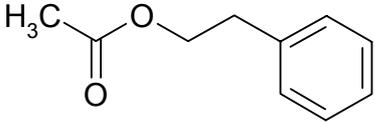
Ácidos Hidroxicinámicos:

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Ácido ferúlico	187	234.24	
Ácido cumárico	198	206.20	

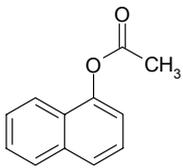
Triterpenos:

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Amirina	220	468	
Colesterol	87	428.70	

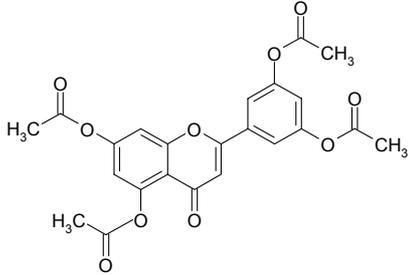
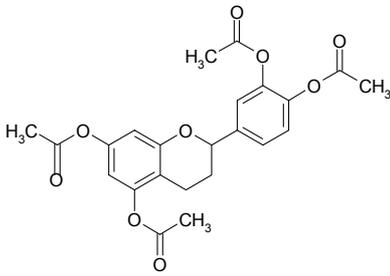
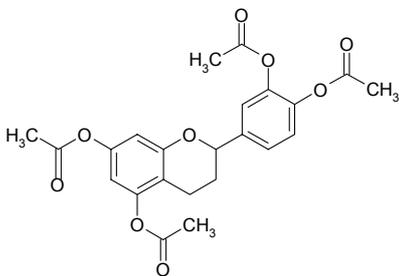
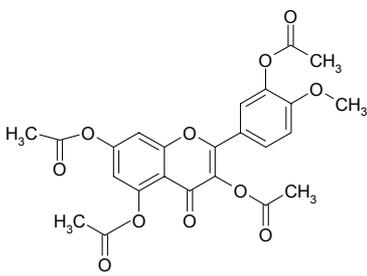
Fenoles:

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Diacetilado de hidroxiquinona	50	194.19	
TBHQ	49	250.30	
Fenil etil acetato	105	164.2	

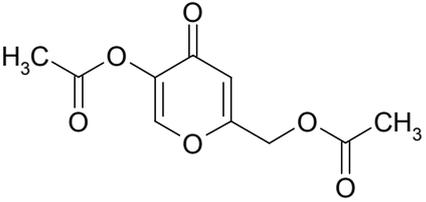
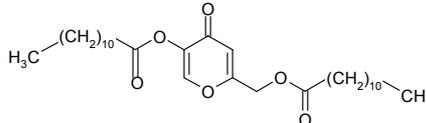
Naftoles:

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
α -Naftilacetato	113	186	

Flavonoides:

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Quercetina	181	412.36	
Catequina	102	498.49	
Epicatequina	135	440.45	
Hesperetina	108	485	

Moléculas pequeñas no aromáticas (Ácido Kójico):

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Ácido kójico	75	226.19	
Dilaurato de ácido kójico	63	518	

7.6.2 Identificación de productos de las reacciones de desacetilación enzimática

A continuación se muestran los resultados de la CCF, CG y HPLC para las reacciones de desacetilación. Los resultados se reportan con base en el estándar acetilado y restando el valor de autohidrólisis (blanco) de cada sustrato.

ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS: La placas se corrieron en la siguiente fase móvil: Cloroformo:Tolueno:Ácido acético (8:0.5:0.5 v/v/v)

Ácido ferúlico:

Los resultados obtenidos en esta reacción son muy interesantes, ya que la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 desacetila el compuesto, lo que es relevante como resultado ya que no existen muchas enzimas reportadas que realicen esta reacción. Otro resultado importante es el obtenido al evaluar la modificación con el revelador DPPH, el cual mide el poder antioxidante de la molécula: si el compuesto se desacetila, la molécula recupera el OH⁻ original que confiere el poder antioxidante y este al reaccionar con el radical libre del DPPH da una coloración de púrpura a amarilla. Como se ve en la Figura 7.13 (1), al eliminar el grupo acetilo se manifiesta la capacidad antioxidante. Sin embargo, el aspecto del carril D indica que hay una fuerte autohidrólisis, posiblemente por el pH de la reacción (7.0).

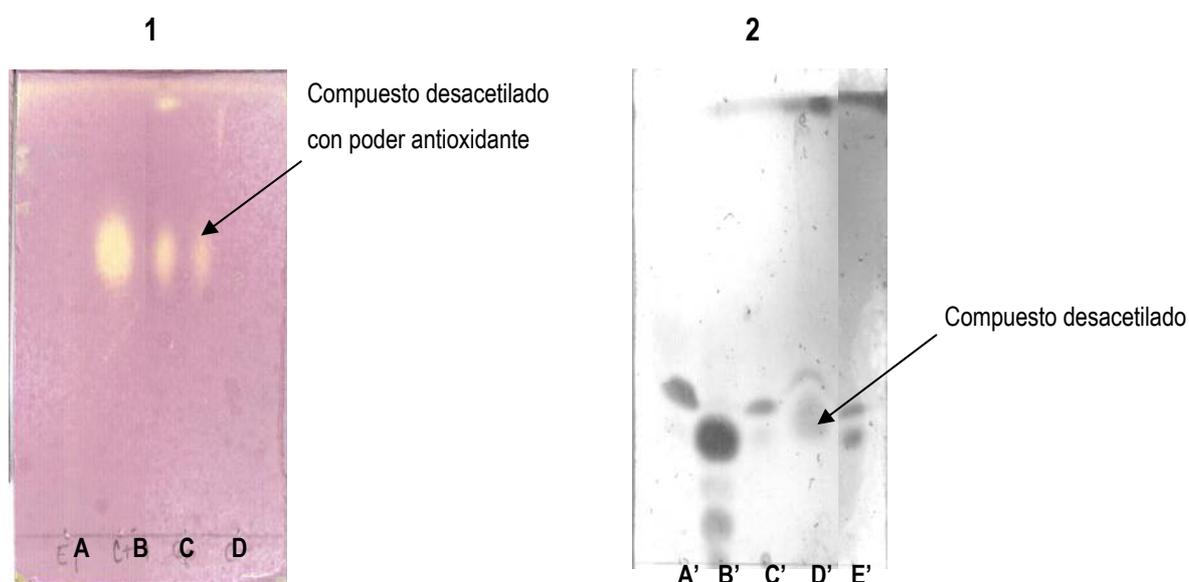


Figura 7.13. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del ácido ferúlico acetilado. (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar de ácido ferúlico acetilado, Rf= 0; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, Rf= 0.79; **C:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, Rf= 0.77; **D:** Blanco, Rf= 0.77. (2) Revelador Vainillina. **A':** Estándar de ácido ferúlico acetilado, Rf= 0.4; **B':** Estándar de ácido ferúlico desacetilado, Rf= 0.3; **C':** Blanco, Rf= 0.38; **D':** Control positivo *Candida antarctica*, Rf= 0.38; **E':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, Rf= 0.38.

En la Figura 7.13 (2) se ve que la reacción con el control positivo (*Candida antarctica*) desacetila casi por completo el sustrato (**D'**), mientras que con la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 se aprecia que hay una desacetilación (**E'**) menor.

El análisis de los productos en el HPLC corroboran los resultados mostrados en las cromatoplasmas (Figura 7.13).

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (HPLC)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (HPLC)
Ácido ferúlico	48.05	75.58

Ácido cumárico:

Los resultados de la reacción se muestran en la Figura 7.14. En la placa 1 se puede ver desacetilación con la dos enzimas, pero también en el blanco, debido a que se presentó autohidrólisis del sustrato en las condiciones en las cuales se lleva la reacción, como ocurrió con el ácido ferúlico. También se puede apreciar que hay más poder antioxidante con la lipasa de *Candida antarctica* (**B**) que con la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 (**C**). En la placa 2 no alcanza a percibirse desacetilación, probablemente por la fase móvil utilizada.

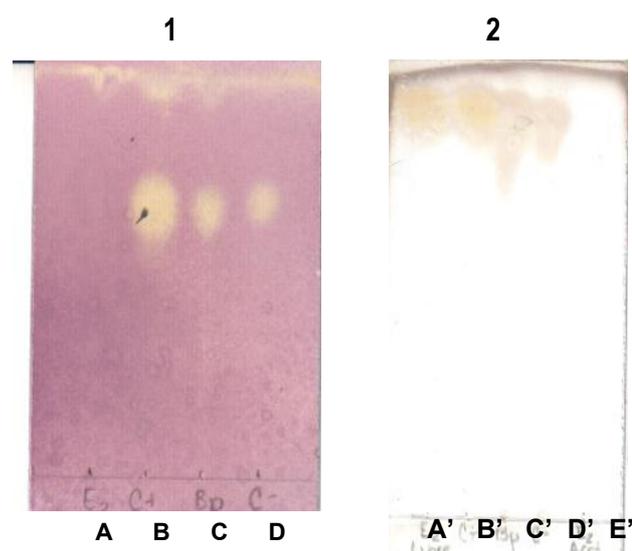


Figura 7.14. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del ácido cumárico acetilado. (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar de ácido cumárico acetilado, $R_f = 0$; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.385$; **C:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.385$; **D:** Blanco, $R_f = 0.385$. (2) Revelador Sulfato cérico. **A':** Estándar de ácido cumárico acetilado, $R_f = 0.4$; **B':** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.385$; **C':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.385$; **D':** Blanco, $R_f = 0.385$; **E':** Estándar de ácido cumárico desacetilado, $R_f = 0.385$.

Los resultados del análisis de los productos en el HPLC arrojan lo mismo que lo observado en las cromatoplasas.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (HPLC)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (HPLC)
Ácido coumárico	9.73	100

Este resultado es importante ya que al igual que con el ácido ferúlico no existen enzimas que realicen estas reacciones de desacetilación.

TRITERPENOS:

Los triterpenos se corrieron en una fase móvil: Cloroformo:Tolueno:Ác.acético (8:0.5:0.5 v/v/v). Como revelador se usó ácido sulfúrico.

Amirina y Colesterol:

Estas reacciones no fueron catalizadas ni por la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 ni por la de *Candida antarctica*, como se muestra en las Figuras 7.15 y 7.16. Esto puede deberse a que las moléculas son muy grandes y la enzima no la pudo hidrolizar por impedimento estérico o a que las condiciones de reacción no eran las óptimas para que la enzima catalizara la reacción. Sin embargo, al analizar los productos por CG

se encontró que si hubo hidrólisis de la amirina por la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1.

Esto pasó porque posiblemente las condiciones en las cuales se manejaron los productos de reacción no fueron las adecuadas y pudo haber ocurrido una autohidrólisis, por lo cual es importante corroborar estos resultados, aunque preliminarmente se puede afirmar que la enzima no hidrolizó los triterpenos.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (CG)
Amirina	30.12	0
Colesterol	0	0



Figura 7.15. CCF de los productos de hidrólisis enzimática de la amirina acetilada. Revelador ácido sulfúrico. **A:** Estándar de amirina acetilada, $R_f = 0.66$; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.66$; **C:** Blanco, $R_f = 0.66$; **D:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.385$.



Figura 7.16. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del colesterol acetilado Revelador ácido sulfúrico. **A:** Estándar colesterol desacetilado, $R_f = 0.15$; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.73$; **C:** Blanco, $R_f = 0.73$; **D:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.385$, **E:** Estandar colesterol acetilado.

FENOLES:

Este grupo de sustratos se corrieron en la fase móvil hexano:acetato de etilo(9:1.v/v).

Hidroxiquinona

Esta reacción sí se lleva a cabo por las dos enzimas. Se aprecia en la Figura 7.17 un producto mayoritario con la lipasa de *Candida antarctica* que con la de *Bacillus pumilus* GMA1 no se aprecia tan claramente. No se observa una autohidrólisis.



Figura 7.17. CCF de los productos de hidrólisis enzimática de la hidroxiquinona acetilada. Revelador ácido sulfúrico. **A:** Estándar de hidroxiquimona acetilada, Rf= 0.33; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, Rf= 0.177; **C:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, Rf= 0.172; **D:** Blanco, Rf= 0.33.

Los resultados en el CG indican también que hubo una desacetilación, y se puede afirmar que fue total.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antártica</i> (CG)
Diacetilado de Hidroxiquinona	100	100

TBHQ

En la Figura 7.18 (1 y 2) se muestran de los productos de la hidrólisis y en los cuales se puede ver que sí se lleva a cabo la desacetilación enzimática y que no hubo autohidrólisis.

Sin embargo, en el resultado de la CG se obtuvo que la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 no hidroliza el sustrato mientras que la lipasa de *Candida antarctica* sí aunque con bajos rendimientos. Esto pudo deberse a que las condiciones en la

cuales se corrieron los productos de reacción son muy drásticas y el producto desacetilado se pudo degradar durante la corrida en el CG. Por lo tanto queda pendiente buscar el método más adecuado para analizar los productos de reacción.

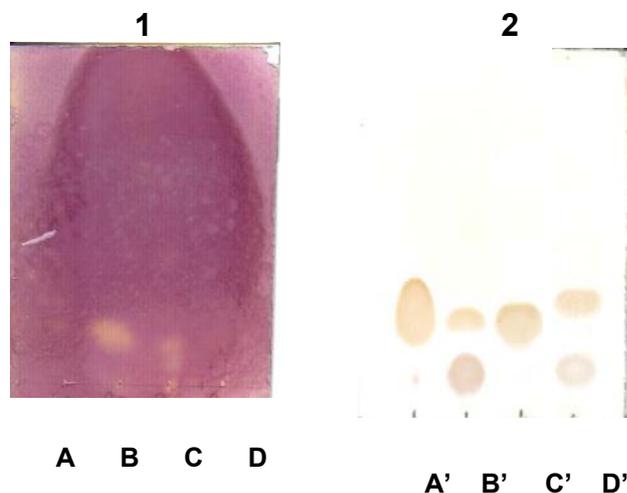


Figura 7.18. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del TBHQ acetilado (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar TBHQ acetilado, $R_f = -$; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.155$; **C:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.145$; **D:** Blanco, $R_f = -$. (2) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar TBHQ acetilado, $R_f = 0.3$; **B':** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.8$; **C':** Blanco, $R_f = 0.3$; **D':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.9$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (CG)
TBHQ	0	6.79

Difeniletíl acetato

La reacción de desacetilación si se llevó a cabo con las dos enzimas (Figura 7.19), como ocurrió con los otros dos fenoles, lo cual permite decir que la enzima es muy afin a este tipo de moléculas.



Figura 7.19. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del difenil etil acetato Revelador ácido sulfúrico. **A:** Estándar de difenil etil acetato, $R_f = 0.7$; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f = 0.276$; **C:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f = 0.148$; **D:** Blanco, $R_f = 0.73$.

Los resultados en el CG corroboran a los obtenidos en la CCF.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1(CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (CG)
Difenil etil	70.06	73.34

NAFTOLES:

La placa se corrió en una fase móvil Hexano: Acetato (9:1.v/v).

α -Naftil acetato

En la reacción con *Candida antarctica* se puede observar que toda la materia prima inicial fue hidrolizada tanto por esta enzima como por la de *Bacillus pumilus* GMA1, aunque en este caso la reacción es incompleta pues se aprecia materia prima acetilada, mientras que en el blanco no se observa autohidrólisis (Figura 7.20). Este resultado se confirma con la CG solo que se obtuvo que la desacetilación se realizó a un 100%.



Figura 7.20. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del α -Nattil acetato. Revelador sulfato cérico. (1) **A:** Estándar de α -Nattil acetato, $R_f= 0.7$; **B:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f= 0.489$; **C:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 , $R_f= 0.425$; **D:** Blanco, $R_f= 0.73$. (2)**A':** Estándar α -Nattil acetato, $R_f= 0.46$; **B':** blanco, $R_f= 0.46$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (CG)
α -Nattilacetato	100	100

FLAVONOIDES:

Los flavonoides se corrieron en una fase móvil Acetato:Hexano (9:1.v/v).

Quercetina

En los resultados del CCF se puede observar (Figura 7.21, 1) que hay autohidrólisis del sustrato (C) y que con las dos enzimas si se lleva a cabo la reacción. Se puede apreciar que el control positivo (D) tiene un mayor poder antioxidante que con *Bacillus pumilus* GMA1 (B). Además en la Figura 7.21 (2.1) se pueden observar diferentes productos con la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, lo que indica que esta enzima desacetiló en posiciones distintas.

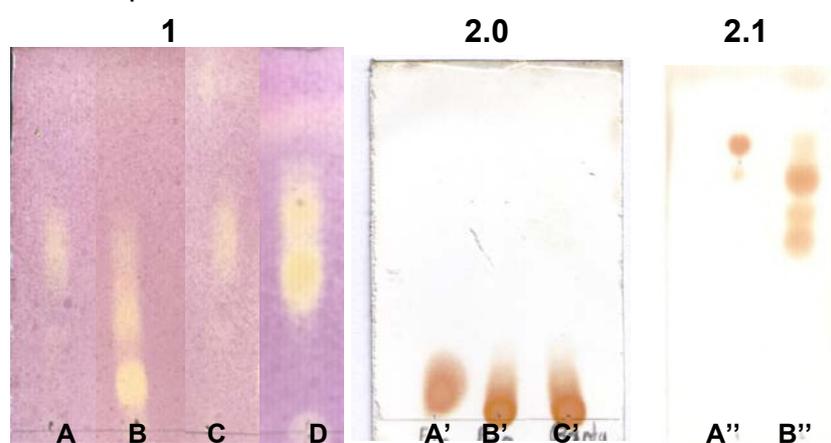


Figura 7.21. CCF de los productos de hidrólisis enzimática de la quercetina acetilada (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar quercetina acetilada, Rf=0.5; **B:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, Rf= 0.18; **C:** Blanco, Rf= 0.55; **D:** Control positivo *Candida antarctica*, Rf= 0.595. (2.0) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar quercetina acetilada, Rf= 0.175; **B':** Blanco, Rf= 0.15; **C':** Rxn la lipasa de *Candida antarctica*, Rf= 0.15. (2.1) Revelador sulfato cérico. **A'':** Estándar quercetina acetilada, Rf= 0.175; **B'':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, Rf= 0.15.

En la Figura 7.21 (2.0) no se pueden apreciar los productos de la reacción porque no se eligió una fase móvil adecuada. Por otra parte los resultados del análisis de los productos en el HPLC indican que si hubo una nivel alto de desacetilación.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (HPLC)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (HPLC)
Quercetina	96.9	95.8

Catequina

En la Figura 7.22 (1) se aprecia que las dos enzimas llevan a cabo la reacción y que hay un mayor poder antioxidante con la lipasa de *Candida antártica* (A) que con la de *Bacillus pumilus* GMA1 (B). Este mismo resultado se obtuvo en el HPLC. Cabe mencionar que las condiciones de reacción favorecen la autohidrólisis.

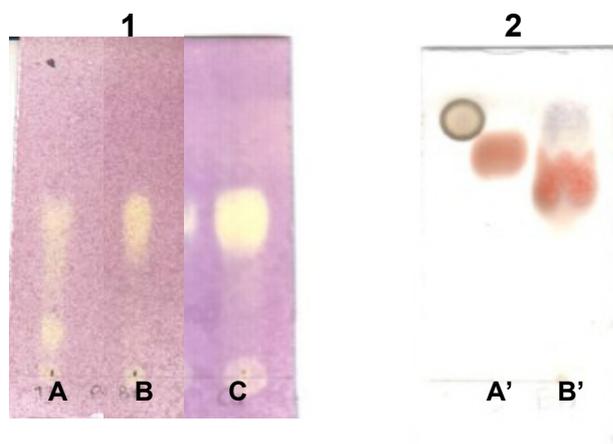


Figura 7.22. CCF de los productos de hidrólisis enzimática de la catequina acetilada (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar catequina acetilada, $R_f=0.5$; **B:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.46$; **C:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f= 0.55$. (2) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar catequina acetilada, $R_f= 0.76$; **B':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.68$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (HPLC)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>C. antarctica</i> (HPLC)
Catequina	64.49	98.9

Epicatequina

En este sustrato se observan los mismos productos de reacción con el blanco y con las dos lipasas (Figura 7.23 (1)), lo cual quiere decir que este medio favorece la autohidrólisis.

El análisis de los productos con el HPLC mostró que no hay desacetilación por parte de la lipasa de *Candida antarctica*, mientras que para la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 se obtuvo que hay un 56.99% de desacetilación. Este resultado se pudo dar porque el método con el cual se analizó no era el adecuado para este tipo de moléculas.

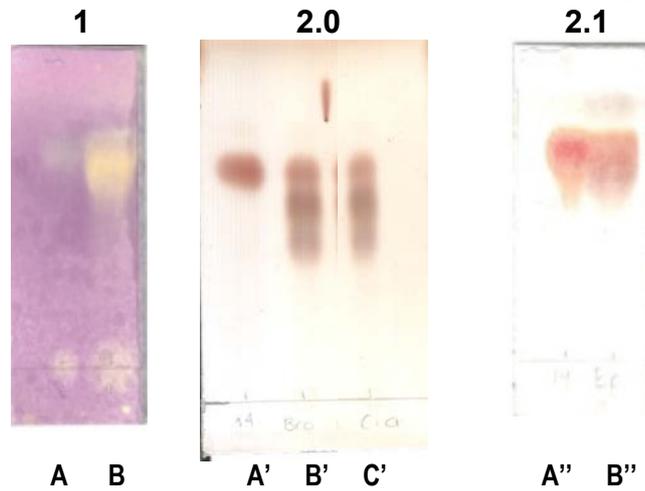


Figura 7.23. CCF (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar epicatequina acetila, $R_f=0.7$; **B:** Blanco, $R_f= 0.7$. (2.0) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar epicatequina acetilada, $R_f= 0.76$; **B':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.76$; **C':** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f= 0.7$. (2.1) Revelador sulfato cérico. **A'':** Estándar epicatequina acetilada, $R_f= -$; **B'':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.74$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (HPLC)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (HPLC)
Epicatequina	56.99	0

Hesperetina

En la Figura 7.24 (1) se muestra observa que el estándar esta hidrolizado. Lo cual también se observa en las placas 2.0 y 2.1. En este sustrato se observan los mismos productos de reacción con el blanco y con la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, lo cual quiere decir que este medio favorece la autohidrólisis.

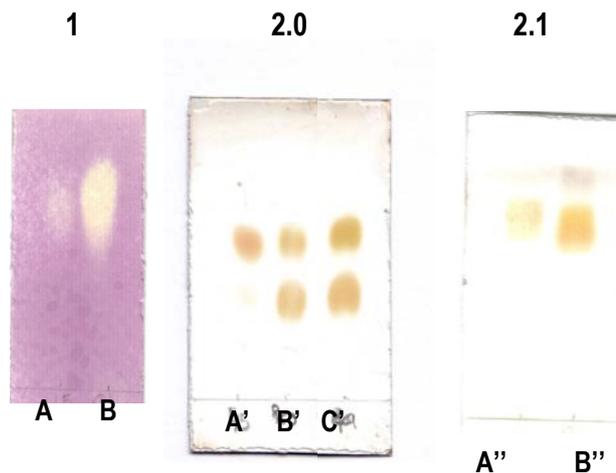


Figura 7.24. CCF de los productos de hidrólisis enzimática de la hesperetina acetilada. (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar hesperetina acetila, $R_f=0.6$; **B:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.325$; (2.0) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar hesperetina acetilada, $R_f= 0.8$; **B':** Blanco, $R_f= 0.5$ **C':** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f= 0.328$. (2.1) Revelador sulfato cérico. **A'':** Estándar hesperetina acetilada, $R_f= 0.65$; **B'':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.825$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (HPLC)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antarctica</i> (HPLC)
Hesperetina	50.87	100

Las condiciones de reacción para este grupo de sustratos favorecieron la autohidrólisis. Sin embargo, se aprecia que la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 si lleva a cabo la reacción de desacetilación sobre los mismos y, además, se obtienen productos diferentes de reacción, como ocurre con la quercetina y la epicatequina. Esto nos indica que la especificidad de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 es diferente que la de *Candida antarctica*.

MOLÉCULAS PEQUEÑAS NO AROMÁTICAS (ÁCIDO KÓJICO):

Ácido kójico

Se observa que existe una autohidrólisis del sustrato y los dos productos de reacción con las enzimas probadas en la Figura 7.25 (1).

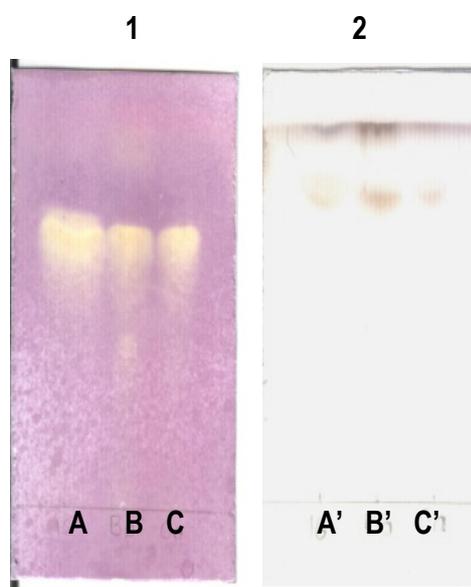


Figura 7.25. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del ácido kójico acetilado. (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar ácido kojico acetilado, $R_f=0.6$; **B:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.6$; **C:** Control positivo *C. antarctica*, $R_f=0.6$. (2.0) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar de ácido kojico acetilado, $R_f= 0.7$; **B':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, $R_f= 0.7$; **C:** Control positivo *Candida antárctica*, $R_f= 0.7$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antártica</i> (CG)
Ácido kójico	0	80

Discusión

Dilaurato de ácido kójico

En esta reacción se puede apreciar que la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 si lleva a cabo la reacción y la lipasa de *Candida antarctica* no la realiza (Figura 7.26). Esto es muy interesante ya que no hay enzimas reportadas que realicen esta reacción, y por tal el uso de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 en la industria puede ser de interés.

Los resultados en la CG indican que no hay hidrólisis de ninguna lipasa, pero este resultado está en duda porque en la CCF muestra que si hay desacetilación, lo más probable es que el método de análisis no sea el óptimo para este sustrato, por lo cual queda pendiente buscar un metodología para el análisis de los productos de reacción que sea menos severo.

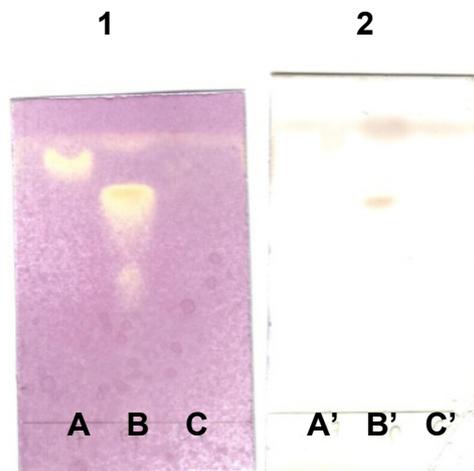


Figura 7.26. CCF de los productos de hidrólisis enzimática del dilaurato de ácido kójico acetilado. (1) Revelador DPPH. **A:** Estándar dilaurato de ácido kojico acetilado, $R_f=0.88$; **B:** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA, $R_f= 0.66$; **C:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f=---$. (2.0) Revelador sulfato cérico. **A':** Estándar dilaurato de ácido kojico acetilado, $R_f= 0$; **B':** Rxn la lipasa de *Bacillus pumilus*, $R_f= 0.7$; **C:** Control positivo *Candida antarctica*, $R_f= 0$.

SUSTRATO (ACETILADO)	% de Hidrólisis con la lipasa <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (CG)	% de Hidrólisis con la lipasa de <i>Candida antártica</i> (CG)
Dilaurato de ácido kójico	0	0

Es importante resaltar las diferencias obtenidas en las reacciones de hidrólisis entre la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1y la de *Candida antarctica*. En algunos casos, se tienen diferentes productos, tal es el caso de la quercetina y la epicatequina. Otros sustratos fueron hidrolizados por la enzima de *Bacillus*

Discusión

pumilus GMA1 y no por la lipasa de *Candida antarctica*, como el dilaurato de ácido kojico. Esto muestra que tienen diferente especificidad.

Aunque hubo una mayor hidrólisis o síntesis con la lipasa de *Candida antarctica* que con la de *Bacillus pumillus* GMA1, las preparaciones enzimáticas son diferentes, puesto que se puede decir que las condiciones de producción de la enzima de este último no están optimizadas y se usó un extracto crudo con baja actividad, mientras que la de *Candida antarctica* es pura e inmovilizada. Aún así la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 mostró muy buenos resultados. Cuando se optimicen las condiciones de reacción y de producción, como el descrito en Ibáñez (2007) será posible ver mejores resultados.

8. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones óptimas de producción de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1: a 50°C durante 24 h, con una agitación de 100 rpm.
- Se logró la síntesis de un triacilglicerol enriquecido con CLA, a través de una reacción de interesterificación enzimática, con la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, bajo las condiciones de a_w de 0.7 y 0.5 y como medio de reacción hexano.
- En el caso de las reacciones de hidrólisis, la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 mostró amplia especificidad de sustrato y diferencias en la especificidad de los grupos de sustratos hidrolizado. En algunos sustratos (flavonoides y dilaurato de ácido kójico) se obtuvieron diferentes productos en comparación con la lipasa de *Candida antarctica*, lo que ofrece un campo específico de aplicación a esta enzima.
- La enzima hidrolizó eficientemente los sustratos acetilados: Ácido ferúlico, ácido cumárico, hidroxiquinona, TBHQ, difenil etil, α -Naftil, quercetina, catequina, dilaurato de ácido kojico.
- La lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 llevó a cabo una reacción de interesterificación que deriva en la generación de un lípido funcional. Y las reacciones de hidrólisis catalizadas generan productos que pueden ser empleados como antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianos por mencionar algunas de sus aplicaciones.

9. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Optimizar las condiciones de reacción tanto para las reacciones de hidrólisis como para la de síntesis, con el fin de emplearlas en la industria de alimentos.
- Disminuir el pH de las reacciones de hidrólisis para que no haya autohidrólisis de los sustratos.
- Hacer un estudio cuantitativo para obtener rendimientos de las reacciones.
- Identificar los productos obtenidos mediante espectrometría de masas
- Analizar los subproductos identificados en algunos sustratos tanto en las reacciones de síntesis y como de hidrólisis, para establecer la especificidad de la enzima.
- Buscar un método de análisis para los productos de hidrólisis para TBHQ, epicatequina, hesperetina y dilaurato de ácido fólico.
- Realizar las reacciones evaluadas con la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 inmovilizada con el fin de aplicarlas a nivel industrial.
- Evaluar las propiedades bioactivas de los productos generados en las diferentes reacciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Akoh C., Min D., (2002). Food lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology Second edition, Revised and expanded, New York, pp 908-966
- 2) Andlauer W. and Furst P. (2002). Nutraceuticals a piece of history, present status and outlook. Food Research Int., 35:171-176.
- 3) Arpigny J. and Jaeger K. (1999). Bacterial Lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J. 343, 177-183.
- 4) Berlitz H., Grosch W. (1997). Química de los alimentos. Acribia S.A., España, pp. 250, 259, 817, 894.
- 5) Berglund P. and Hutt K. (2000). Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN, editor. Stereoselective biocatalysis. New York: Marcel Dekker pp. 296-285.
- 6) Berkeley, N. Y col. (1984). Identificación of *Bacillus* species. Meth. Microbiol. 16: 291-328.
- 7) Bustos I. (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- 8) Bustos I., (1998). Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.
- 9) Chasquibol N. and Lengua L. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos clasificación e importancia. Rev. Per. Quim. Ing. Quim. 5 (2), 9-20.
- 10) Chen H., Hsiao K., Wu S. and Wang K. (1995). Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. Biotechnol Lett; 17:305-308.
- 11) Claon P. and Akoh C. (1994). Enzymatic synthesis of geranyl acetate in n-hexane with *Candida antarctica* lipase. Journal of American Oil Chemists Society, 71: 575-578.
- 12) Dharmsthite S., Ammaranond P. (1997). Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). Biotechnol Appl Biochem, 26:111-116.
- 13) Davranov K. (1994). Microbial lipases in biotechnology". Appl. Biochem. Microbiol. 30:427-432.

-
- 14) Derewenda ZS, Derewenda U, Dodson GG. (1991). The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor niehei* triglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 227:818-39.
 - 15) Dong H., Gao S., Han SP. and Cao SG. (1999). Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:251-6.
 - 16) Ducret A., Trani M. and Lortie R. (1998). Lipase catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme Microb Technol;* 22:212-6.
 - 17) Figueroa E. and Villeneuve P. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. [J Agric Food Chem.](#) 53(8):2779-2787.
 - 18) Fragopoulou E., Nomikos T., Karantonis H., Apostolakis C., Pliakis e., Samiotaki M., Panayotou G. and Antonopoulou S. (2007). Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 55:80-89.
 - 19) Godtfredsen S. (1990). Microbial enzymes and biotechnology. Cap- 7; Microbial lipases, pp. 255-274, Ed. Elsevier Applied Science. Northern Ireland.
 - 20) Golberg M., Thomas D. and Legoy m. (1990). The control of lipase-catalyzed transesterification and esterification reaction rates. *Eur. J Biochem.* 190, 603-609.
 - 21) Gross G. (1999). Plant polyphenols 2. *Chem Biology Pharmacology Ecology.* 2:482-494.
 - 22) Halling P. (1992). Salt hydrates for water activity control with biocatalysis in organic media. *Biotech, Tech.* 6:271-276.
 - 23) Harwood C. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular, biological and industrial workhorses. *TIBECH* 10,247-256.
 - 24) Hong C., Tang C., (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.,* 45: 2374-2378.
 - 25) Huesca T., López A. (2005). Síntesis de triacilglicéridos ricos en ácido linoleico conjugado (CLA) mediante esterificación enzimática en un medio libre de solvente. *Rev. Mex.* Vol. 4 75-87.
 - 26) Ibáñez A. (2007). Optimización del medio de cultivo para *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis Licenciatura, UNAM.

-
- 27) Isobe, K., Akiba T. Yamaguchi. S. (1988). Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric Biol Chem*, 52: 41-47.
- 28) Jaeger K., Dijkstra B. and Reetz M., (1999) Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev Microbiol.* 53:315-51.
- 29) Jaeger K. and Reetz M. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
- 30) Jones D., Pell P. and Sneath P. (1991). Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of Laboratory Methods. Second Edition. Edited by BE. Kirsop and A. Doyle, Editorial Academic Press, Inc San Diego, CA. 92101, pp.45-50.
- 31) Karpushova A., Brümmer F., Barth S., Lange R. and Schmid D. (2005). Cloning recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Microbiol. Biochemol* 67:59-69.
- 32) Kazlauskas R., Bornsheuer U. (1998). Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW, editores. *Biotechnology*. Vol 8 New York: VCH, pp 37-192.
- 33) Kim H. Park S. Lee j., Oh T. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci Biotechnol Biochem*; 62:66-71.
- 34) Kim I., Yoon C. and Lee K. (2001). Transesterification of conjugated linoleic acid and tricaprylin by lipases in organic solvents. *Food research international* 34: 301-306.
- 35) King J., Snyder J., Frykman H. and Neese A. (2001) Sterol ester production using lipase-catalyzed reactions un supercritical carbon dioxide. *Food Res Technol*; 212:566-9.
- 36) Klibanov A. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol* 115:97-101.
- 37) Klibanov A., Robert C. Lindsay L. and Brian J. Willis. (1989). *Advances in Enzymes*. Elsevier applied science, New York, pp. 25-44.
- 38) Kuan J., Shui T. and Jei K. (1998). Lipase-catalyzed tranesterification of propylene glycol with triglyceride in organic solvents. *J. Agric Food Chem.* 46, 3835-3838.
-

- 39)Kwon S., Song K., Hong W. and Rhee J. (1995). Removal of water produced from lipase- catalyzed esterification in organic solvent by preevaporation. *Biotechnol Bioeng.* 46, 393-395.
- 40)Lambusta D, Nicolosi G, Patti A. and Sanfilippo C. (2003). Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic.* 22 (5):271-277.
- 41)Liese A., Seelbach K. and Wandrey C. (2000). *Industrial biotransformations* Weinheim: Wiley-VCH.
- 42)Linfield W., Barauskas R. Sivieri L., Serota S. and Stevenson R. (1984). Lipid-lipase interactions. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*, *Ibidem*, 62:191-196.
- 43)Maldonado E., Ramirez M., Perez A. (1998). Anti-inflammatory activity of phenyl propanoids from *Cereopsis mutia* var. *mutia*. *Planta Med.*, 64. 660-661.
- 44)Masse L., Kennedy K., Chou SP. (2001). The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *J Chem. Technol Biotechnol*; 76:629-35.
- 45)Mellou F., Lazari D., Skaltsa H., Tselepis A., Kolisis F. and Stamatis H. (2005). Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoide glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *Journal of Biotechnology* 116: 295-304.
- 46)Miller G. Jarvis K. (1999). *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. National Dairy Council, 2a Edit., U.S.A., pp.19-20.
- 47)Moller, B. et al. (1991). Alkaline *Bacillus* lipases, Coding DNA sequences therefore and bacilli wich produce these lipases. *Patente internacional* WO91/16422
- 48)Mora R. (2007). Bases moleculares de las propiedades catalíticas de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis Maestría, UNAM.
- 49)Nawani, N. and Kaur J. (1999). Purification characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol Cell Biochem* 2006:91-96.
- 50)Nthangeni, M. Patterton H. Tonder A. Vergeer W. and Litthauer Derek (2001). Over Expression and properties of apurified recombinand *Bacillus*



- licheniformis lipase: a comparative report on Bacillus Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*; 28:705-712.
- 51)Orozco B. (1993). Aplicación de sistemas enzimáticos lipolíticos en la obtención de sabores lácteos a partir de grasa de leche. Tesis, Universidad Iberoamericana.
- 52)Pettersen G. (1977). A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is more Generally Applicable.
- 53)Philip Molyneux. (2004). The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
- 54)Pouderoyen G., Egger T., Jaeger K., Dijkstra B., (2001). The crystal structure of Bacillus subtilis lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* 309:215-226.
- 55)Rantakyla M., Alkio M., Paltonen O. (1996). Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase. *Biotechnol Lett*;18;1089-94.
- 56)Rendón X. (2001). Síntesis selectiva de acilglicéridos por glicerólisis enzimática en medios no convencionales. Tesis Maestría, UNAM.
- 57)Rubin B., Dennis EA. editors. *Lipases; Part A.* (1997). *Biotechnology methods in enzymology.* Vol 284. New York: Academic Press; pp. 1-408.
- 58)Rubin B, Dennis EA editors. *Lipases; Part B* (1997). *Enzyme characterization and utilization methods in enzymology.* Vol. 286. New York: Academic Press; pp 1-563.
- 59)Shägger H., Von J., (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry.* 166:368-379.
- 60)Sefkow M. (2001). First efficient synthesis of chlorogenic acid. *J. Org. Chem.*, 1137-1141.
- 61)Silva FAM, Borges F., Guimaraes C., Lima J., Matos C. and Reis S. (2000) Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J. Agric. Food. Chem.* 48:2122-2126.

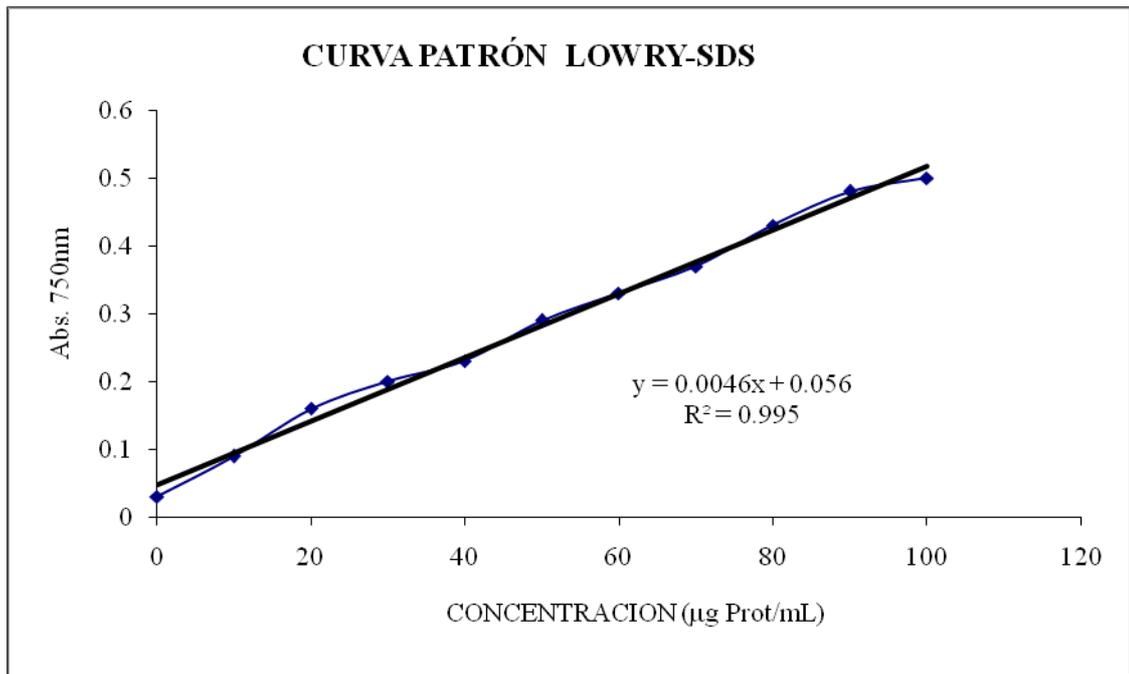
- 62) Somova L., Shode F., Mipando M. (2004). Cardiogenic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvarol. *Phytomedicine*, 11: 121-129.
- 63) Sugihara A., Tani T. and Tominaga Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* *J Biochem.* 109:211-6.
- 64) Supachok Sinchaikul, (2001). Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization," *Idealy* pp. 388-398.
- 65) Synytsya A., Blafková P., Synytsya A., Copíková J. and Uher Michal U. (2007). Conjugation of kojic acid with chitosan. *Carbohydrate polymers*.
- 66) Takahashi H., Fujita M., Minami H., Fukuyama Y. (1999). Coumaroyl triterpenes from *Casuarina equisetifolia*. *Phytochemistry*, 51:543-550.
- 67) Torres C., Lin B., Lessard L. and Hill C. (2005). Lipase-mediated transesterification of menhaden oil with the ethyl of conjugated linoleic acid: multi-response kinetic. *Biochemical Engineering Journal* 23:107-116.
- 68) Therisod M., Klivanov A. (1987). Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugar catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 1987; 109:3977-81.
- 69) Tsai SW., Dordick JS. (1996). Extraordinary enantiospecificity of lipase catalysis in organic media induced by purification and catalyst engineering. *Biotechnol Bioeng*; 52:296-300.
- 70) Tsujita T., Ninomiya H. and Okuda H. (1989). *p*-Nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Journal of lipid research*. Volume 3:997-1004.
- 71) Turner C., Persson M., Mathiasson L., Adlercreutz P. and King JW. (2001). Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. *Enzyme Microb. Technol*; 29:111-21.
- 72) Vorderwülbecke T., Kieslich K. and Erdmann H. (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.* 30:579-581.
- 73) Vulfson EN (1994). Industrial applications of lipases, In: Woolley P, Peterson SB, editors. *Lipases-their structure, biochemistry and applications*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp 271-88.



- 74) Weete J. (2002), Cap. 26. Microbial Lipases, Akoh C., Min D. Ed. Marcel Dekker, Inc. 2ª edit., New York, pp. 813-838.
- 75) Willis W. and Marangoni A. (2002). Cap. 27. Enzymatic Interesterification, Akoh C., Min D. Editorial Marcel Dekker, Inc. 2ª edit., New York, pp. 839-908.
- 76) Wong P. (2001). Lipasa Termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- 77) Yamaguchi S. and Mase T. (1991). High-yield synthesis of monoglyceride by mono and diacylglycerol lipase from *Penicillium camemberti* U-150. J. of Ferm. and bioeng. 72:162-167.
- 78) Yang Z. and Robb D. (1993). Use of salt hydrates for controlling activity of tyrosinase in organic solvents. Biotech. Tech. 7:37-42.

11. APÉNDICE

I. Curva patrón de Lowry-SDS modificado (Petterson, 1977), para la cuantificación de la proteína extracelular.



De esta curva patrón se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:

$$\text{Abs}(750\text{nm}) = 0.0046 (\text{Proteína}/\mu\text{g}/\text{mL}) + 0.056$$

De la cual:

$$\text{Proteína}(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{\text{Abs}(750\text{nm}) - 0.056}{0.0046}$$

II. Curva patrón de p-Nitrofenol para determinar la actividad lipolítica.