



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS DE BENZIL-4-NITROFENIL
CARBONATO CON LA LIPASA RECOMBINANTE
DE *BACILLUS PUMILUIS* GMA1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA :
María Likhatcheva

TUTOR
Dr. Ismael Bustos
2009





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.

JURADO

PRESIDENTE	PROF. JOSÉ EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN
VOCAL	PROFA. LAURA KAWASAKI WATANABE
SECRETARIO	PROF. ISMAEL BUSTOS JAIMES
1ER. SUPLENTE	PROFA. GEORGINA GARZA-RAMOS MARTÍNEZ
2DO. SUPLENTE	PROF. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE FÍSICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS,
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

ASESOR

MARÍA LIKHATCHEVA

SUSTENTANTE

Este trabajo contó con el apoyo de los proyectos **CONACYT 41328Q y 53710,**
y proyecto **PAPIIT IN212607-3**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes por su apoyo, enorme paciencia, por todo lo que aprendí y su siempre disposición para ayudarme y resolver mis dudas.

A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas por su ayuda y consejos.

A la Universidad Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por la formación que recibí.

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Resumen	1
Capítulo 1. Lipasas	2
1.1 Introducción	2
1.2 Estructura de las lipasas	5
1.3 Mecanismo catalítico	7
1.4 Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas	9
1.5 Clasificación de las lipasas bacterianas	11
1.6 Lipasas del género <i>Bacillus</i>	14
Capítulo 2. Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1	17
2.1 Introducción	17
2.2 Propiedades bioquímicas	19
2.3 Lipasa recombinante de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (Bp1A-r)	20
Capítulo 3. Promiscuidad enzimática	22
Capítulo 4. Carbonatos orgánicos	25
4.1 Definición	25
4.2 Propiedades físicas y químicas	26
4.3 Usos industriales	26
4.4 Dimetil carbonato	28
Capítulo 5. Objetivos	33
Capítulo 6. Materiales y métodos	34
6.1 Materiales	34
6.2 Métodos	36
Capítulo 7. Resultados y discusión	49
Capítulo 8. Conclusiones y perspectivas	60
8.1 Conclusiones	60
8.2 Perspectivas	61
Referencias	62

Abreviaturas

BCA	Acido bicinconínico
BplA	Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
BplA-r	Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 recombinante
DMC	Dimetil carbonato
pNF	4-Nitrofenol
pNFA	4-Nitrofenil acetato
PODS	Persulfato de amonio
SDS	Dodecil sulfato de sodio

Resumen

Las lipasas constituyen un grupo de enzimas con gran potencial biotecnológico ya que catalizan reacciones de hidrólisis/síntesis y transesterificación dependiendo de las condiciones del medio de reacción. La variedad de aplicaciones industriales generadas en los últimos años es el resultado de la comprensión de su estructura y la forma en que efectúan su catálisis. Otra característica importante de estas enzimas es que pueden presentar promiscuidad, esto implica que pueden utilizar diversos compuestos como sustrato además de su sustrato natural. El estudio de la promiscuidad enzimática de las lipasas puede permitir desarrollar nuevas y vastas aplicaciones biotecnológicas.

Los carbonatos orgánicos cuentan con un enlace muy parecido al que presentan los ésteres, presentes en los triacilglicéridos que son el sustrato natural de las lipasas. Esta similitud estructural sugiere que los carbonatos orgánicos pueden ser reconocidos e hidrolizados por las lipasas. Asimismo, un estudio preeliminar realizado en nuestro grupo demostró que la BplA-r (lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 recombinante) también es capaz de hidrolizar el dimetil carbonato, formando metanol y CO₂.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar y caracterizar la reacción promiscua de hidrólisis de un carbonato orgánico catalizada por la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1. El sustrato que se utilizó fue benzil-4-nitrofenil carbonato, el cual es un modelo de carbonato orgánico que tiene la ventaja de ser cromogénico. La lipasa de *B. pumilus* GMA1 fue clonada y caracterizada en un trabajo previo. En este trabajo se utilizó la enzima recombinante (BplA-r) en forma pura. Inicialmente se midió la estabilidad de la BplA-r en condiciones experimentales, a 25°C en amortiguador de fosfatos pH = 7.5 con 1% de tritón X100, para obtener su constante cinética de inactivación (k_i). De forma paralela se determinó la constante cinética de primer orden (k_d) para la hidrólisis química del benzil-4-nitrofenil carbonato. Mediante una curva de avance de reacción ajustada a la ecuación integrada de Michaelis-Menten-Henry, incluyendo las constantes cinéticas k_i y k_d , se calcularon las constantes cinéticas k_{cat} y K_m para la hidrólisis enzimática del benzil-4-nitrofenil carbonato. Este sustrato es transformado en 4-nitrofenol, alcohol bencílico y dióxido de carbono.

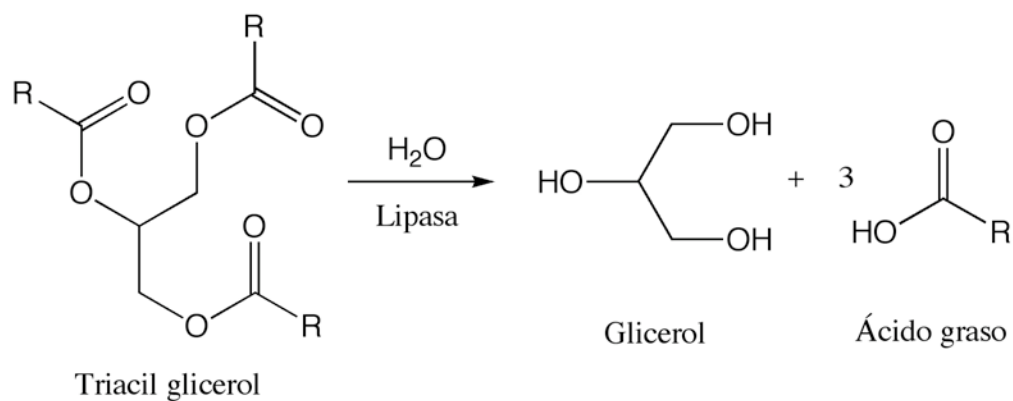
La caracterización cinética arrojó valores de k_{cat} y K_m de 7.1 min⁻¹ y 0.178 mM respectivamente. La eficiencia catalítica (especificidad) de la enzima con respecto al sustrato estudiado, k_{cat}/K_m , fue de 39.89 min⁻¹ mM⁻¹. Estos resultados comparados con los resultados obtenidos para la hidrólisis del 4-nitrofenil acetato, un éster que es un sustrato típico de esta enzima, demuestran que la hidrólisis del benzil-4-nitrofenil carbonato ocurre lentamente, pero esta menor velocidad no se debe a una menor capacidad de unión entre el sustrato y la enzima. Nuestros datos demuestran que esta enzima es capaz de hidrolizar benzil-4-nitrofenil carbonato y dimetil carbonato, de lo cual podemos suponer que sería capaz de utilizar otros carbonatos orgánicos como sustratos. Este resultado da pie a la realización de futuros estudios sobre la promiscuidad enzimática de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 y más específicamente sobre su capacidad de hidrolizar y posiblemente sintetizar carbonatos orgánicos.

Capítulo 1. Lipasas

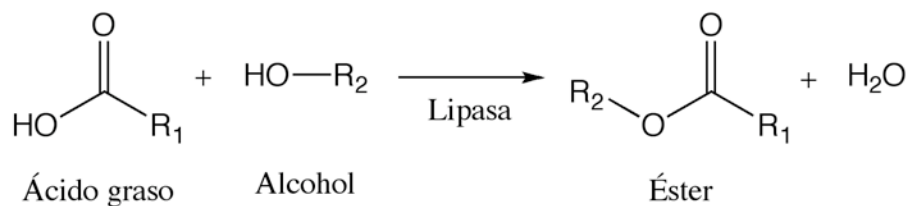
1.1 INTRODUCCIÓN

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolasas) son proteínas que en medios acuosos catalizan la hidrólisis del enlace éster presente en los triacilgliceroles, para liberar ácidos grasos y glicerol. En contraste, en medios con baja concentración de agua como son los disolventes orgánicos, las lipasas tienen la capacidad de llevar a cabo la reacción inversa: la síntesis de ésteres a partir de alcoholes y ácidos orgánicos además de la alcoholisis y la transesterificación de ésteres (Fig 1.1). Otro grupo de enzimas, las esterasas, también hidrolizan a los enlaces éster. No obstante, estas últimas requieren que sus sustratos sean solubles. Esto ha sido sugerido como un criterio general para diferenciar a las lipasas verdaderas de las esterasas. La baja solubilidad de los triacilgliceroles en agua requiere que la etapa catalítica en las lipasas suceda en la interfase lípido-agua [Bornscheuer, 2002].

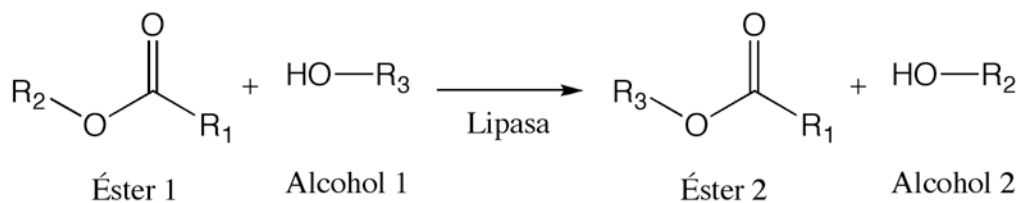
a) Hidrólisis (medio acuoso)



b) Síntesis (medio no acuoso)



c) Alcoholisis (medio no acuoso)



d) Transesterificación (medio no acuoso)

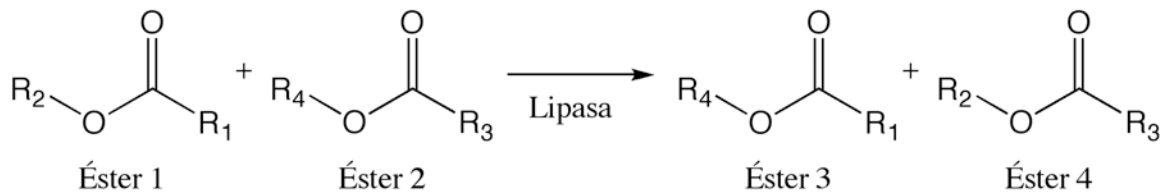


Figura 1.1. Tipos de reacción realizados por las lipasas en diferentes condiciones experimentales.

De acuerdo a [Arpigny y Jaeger \(1999\)](#), existen 2 criterios para considerar una enzima como una lipasa verdadera:

- Aumenta su actividad cuando el sustrato forma una emulsión (activación interfacial)
- Presenta un motivo estructural que cubre el sitio activo de la enzima (“tapa”) que al contacto con la interfase se mueve descubriendo el sitio activo y permitiendo la entrada del sustrato.

El aumento en la actividad al actuar en la interfase lípido/agua se debe a cambios conformacionales del sitio activo de la enzima. En ausencia de esta interfase, el sitio activo se encuentra cubierto por la “tapa” y en presencia de sustancias hidrófobas este motivo se aleja del sitio activo exponiendo una gran superficie hidrófoba y hace accesibles los residuos catalíticos al sustrato ya que la superficie hidrófoba interactúa con la interfase lipídica. La tapa del sitio activo puede consistir ya sea de una sola hélice α [[Brzowski y col., 1991](#); [Derewenda y col., 1992](#)], de dos hélices α [[Kim y col., 1997](#); [Schrag y col., 1997](#)] o estar compuesta por un asa [[Grochulski y col., 1993](#)]. En ausencia de la interfase lípido-agua la tapa cubre el sitio activo y la actividad de la enzima es mínima. Por esta razón la actividad lipolítica en las lipasas aumenta al estar en contacto con una interfase, hecho conocido como activación interfacial.

La tapa del sitio activo y la activación interfacial han sido descritas en muchas enzimas lipolíticas. A pesar de esto, se han descrito muchas lipasas que no presentan ya sea una o ambas características. Ejemplos de esto son la lipasa de *Bacillus subtilis* [[Lesuisse y col.,](#)

1993] y la lipasa pancreática de puerco de guinea [Hjort y col., 1993] entre otras que carecen de una tapa estructural.

Las propiedades catalítica de las lipasas, como son su marcada preferencia por sustratos no solubles, sus regio- y enantioselectividad y su habilidad de catalizar una amplia gama de reacciones las hace muy atractivas para aplicaciones industriales [Arpigny y Jaeger, 1999].

1.2 ESTRUCTURA DE LAS LIPASAS

Los estudios de las lipasas por difracción de rayos X revelaron que el patrón de plegamiento común de todas las lipasas es una típica estructura α/β abierta como en otras hidrolasas, como las proteasas, esterasas y haloperoxidasas [Bornscheuer, 2002]. Este plegamiento consiste en una estructura central β con 8 hebras paralelas, exceptuando la segunda que es antiparalela. Las secciones β 3 a β 8 están conectadas con hélices- α , las cuales están unidas a cada lado de la hoja β central [Jaeger y col., 1999]. El sitio activo esta formado por una triada catalítica (Ser-Asp/Glu-His), donde el aminoácido nucleofílico serina, se encuentra localizado en el carboxilo terminal de la hoja β 5 [Isobe y col., 1988]. Generalmente en el residuo serina también se encuentra en una secuencia pentapéptida altamente conservada de Gly-X1-Ser-X2-Gly, excepto en las lipasas de *Bacillus* donde el pentapéptido conservado es Ala-X1-Ser-X2-Gly [Arpigny y Jaeger, 1999]. Estas enzimas, a pesar de tener un patrón de plegamiento común, presentan pesos moleculares muy heterogéneos, que van desde los 19 hasta los 60 kDa (Fig. 1.2).

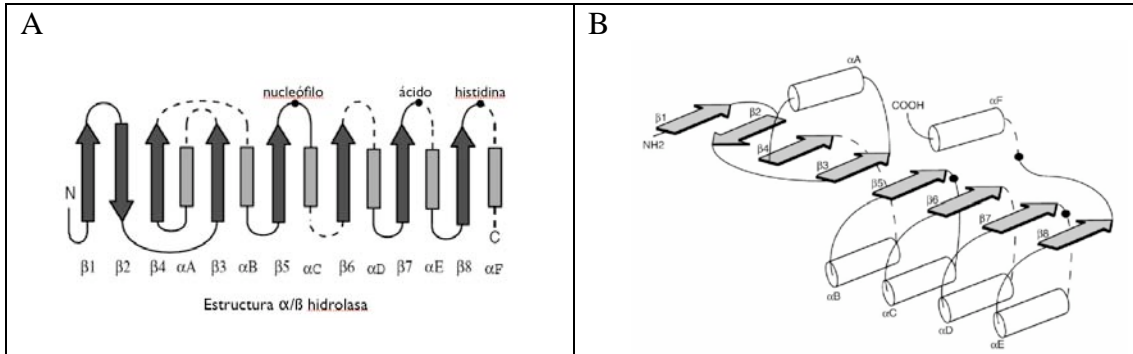


Figura 1.2. Estructura α/β hidrolasa. A) topología de la estructura secundaria y B) disposición en el espacio. (Fuente: van Pouderoyen y col., 2001).

En las lipasas el residuo de Ser de la triada catalítica se encuentra en la secuencia consenso mencionada con anterioridad, mientras que el resto de los aminoácidos de esta triada provienen de distintas regiones de la proteína. El residuo de Ser se encuentra en una conformación ϵ ($\psi = 62^\circ$, $\phi = -121^\circ$). Esta región consiste en una hebra β seguida por un giro rígido que contiene el residuo de Ser y en seguida una hélice α , motivo estructural conocido como β - ϵ -Ser- α . Este motivo estructural posiciona al residuo nucleófilo en la superficie del sitio activo, lo cual permite el fácil acceso por un lado al residuo de histidina y por otro al sustrato. El residuo catalítico ácido (Asp) está localizado en el giro que conecta la hebra $\beta 7$ con la hélice αE , mientras que la histidina, el tercer residuo catalítico, se encuentra en giro después de la hebra $\beta 8$ de la hoja central. [Schrag y col., 1997] (Fig. 1.2).

1.3 MECANISMO CATALÍTICO

Las lipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster de los triacilglicéridos en medios acuosos así como la síntesis de ésteres a partir de alcoholes y ácidos orgánicos y transesterificación en medios no acuosos. En las reacciones de hidrólisis actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilglicerolos para liberar ácidos grasos y glicerol (Fig. 1.1). La hidrólisis del sustrato empieza con el ataque del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo del residuo nucleófilo de serina, sobre el carbonilo del enlace éster del lípido. Se forma un intermediario tetraédrico, que se caracteriza por la carga negativa en el oxígeno del carbonilo del enlace y cuatro átomos unidos al carbono carbonilo. El intermediario es estabilizado por interacciones con un macrodipolo producido por la hélice αC y puentes de hidrógeno entre el oxígeno cargado negativamente (el oxianión) y por lo menos dos grupos NH de la cadena principal, a lo que se conoce como “cavidad oxianiónica”. Uno de los grupos NH es de los residuos que están detrás del residuo de serina, y el otro proviene de la hebra $\beta 3$. El carácter nucleofílico de la serina es incrementado por la histidina catalítica a la que se transfiere un protón del grupo hidroxilo de la serina. La transferencia de este protón es facilitada por la presencia del ácido catalítico que orienta el anillo imidazol de la histidina y neutraliza parcialmente la carga generada en él. Subsecuentemente este protón es donado al oxígeno del enlace éster para formar un alcohol. El componente ácido del sustrato es esterificado por la serina nucleofílica (se forma un intermediario unido covalentemente) mientras se libera el alcohol. Este proceso continúa con un paso de desacilación, en el cual una molécula de agua hidroliza al intermediario covalente. La histidina del sitio activo activa la molécula de agua quitándole un protón. El ión OH^- resultante ataca el

carbono carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la serina. De nuevo se forma un intermediario tetraédrico cargado negativamente, el cual es estabilizado por las interacciones con la cavidad oxianiónica. A continuación la histidina dona un protón al oxígeno del residuo de serina, el cual libera de forma concertada al componente acilo, formando un ácido carboxílico. Después del desprendimiento del acilo, la enzima está lista para un nuevo ciclo catalítico [Jaeger y col., 1999] (Fig. 1.3).

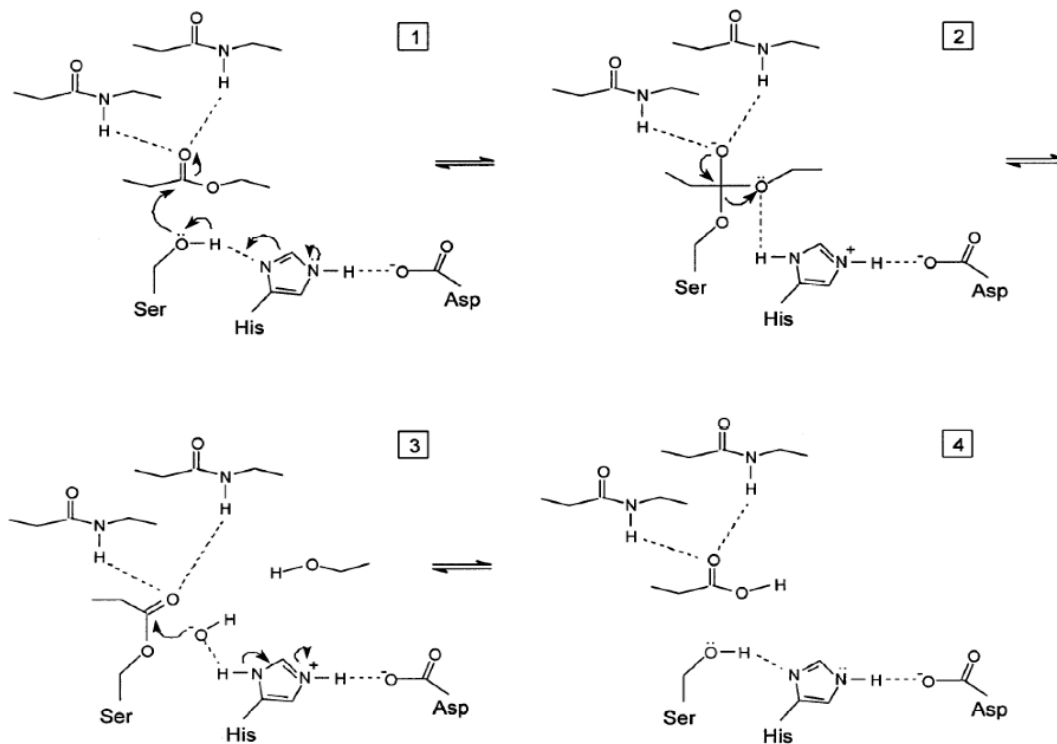


Figura 1.3. Mecanismo químico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas. 1) Activación del residuo nucleófilo de Ser. 2) Formación del intermediario tetraédrico. 3) Intermediario covalente acil-enzima. 4) Hidrólisis del intermediario covalente y regeneración de la enzima (Fuente: Jaeger y col., 1999).

1.4 APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS LIPASAS

Las reacciones que catalizan las lipasas, ya sea en medio acuoso o no acuoso, ocurren normalmente con una alta regio- y enantio-selectividad. Por esta razón han llamado poderosamente la atención para su uso en síntesis orgánica, donde es muy apreciada la generación o utilización selectiva de isómeros.

Las lipasas se encuentran en la naturaleza y son producidas por plantas, animales y microorganismos. Las lipasas de origen microbiano, principalmente bacterianas y fúngicas, son las más usadas en aplicaciones biotecnológicas. Aunque existe un amplio número de lipasas bacterianas, sólo unas pocas son explotadas comercialmente. Entre los géneros de mayor importancia se encuentran *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas* [Pandey y col., 1999].

El uso comercial de las lipasas es un negocio de billones de dólares que comprende una gran variedad de aplicaciones. En el área de los detergentes, ya en 1996 se vendían alrededor de 1000 toneladas de lipasas cada año [Godfrey y West, 1996]. Las lipasas también juegan un importante papel en la producción de algunos ingredientes comestibles [Jaeger y Reetz, 1998]. Un ejemplo de esto es la lipasa de *Rhizomucor miehei* que cataliza la reacción de transesterificación de qué con qué? reemplazando el ácido palmítico por ácido esteárico para producir el estearil-oleil-estearil triacilglicérido con el punto de fusión deseado para su uso como sustituto de mantequilla de cacao en el chocolate [Coleman y Macrae, 1980]. Otras aplicaciones de gran interés incluye el uso de lipasas para remover la resina de la pulpa en la industria papelera [Farell y col., 1997], en la

producción de saborizantes para productos de uso diario y bebidas, y en la química orgánica sintética.

El número de reportes sobre el uso de lipasas como catalizadores en química orgánica es muy considerables y va en aumento [Boland y col., 1991; Drauz y Waldmann, 1995]. Además de la hidrólisis, acilación o transesterificación regioselectiva, una gran variedad de procesos enantioselectivos han sido reportados. Los dos tipos de transformaciones orgánicas enantioselectivas catalizadas por lipasas son reacciones de sustratos proquirales y la resolución cinética de racematos [Jaeger y col., 1999].

En principio, una clase muy importante de compuestos orgánicos puede ser producida de manera enantioselectiva usando lipasas como catalizador. Ya sea en medio acuoso (reacciones de hidrólisis), o en disolventes orgánicos (acilación o transesterificación) [Klibanov, 1990]. Para llevar a cabo estas reacciones, típicamente se utilizan lipasas bacterianas de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, y otras especies del éste género, así como lipasas de *B. cepacia*, *C. viscosum*, *B. subtilis*, *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., y *S. marcescens* [Boland y col., 1991; Drauz, y Waldmann, 1995].

El número de lipasas bacterianas reportadas crece rápidamente. Una cifra impresionante de genes de lipasas ha sido identificada en años recientes, y de muchas de estas proteínas se han caracterizado algunas propiedades bioquímicas.

A pesar de que las lipasas obtenidas de algunas especies de *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* ya pueden ser producidas a escala industrial, sigue habiendo una falta de conocimientos acerca de la regulación, y en particular de los mecanismos de plegamiento y secreción de estas proteínas. La existencia de las estructuras

tridimensionales de lipasas permite la identificación de dominios y de residuos de aminoácidos involucrados en la unión del sustrato, la catálisis y la enantioselectividad, permitiendo de esta manera proponer diseños de lipasas con usos específicos. La creación de lipasas con nuevas funciones mediante diseño es una meta que se ha visto cercana [Boland y col., 1991; Drauz y Waldmann 1995], aunque en la práctica la evolución dirigida ha tenido más y mayores éxitos que el diseño de proteínas [Montiel y Bustos, 2008].

1.5 CLASIFICACIÓN DE LAS LIPASAS BACTERIANAS

Las lipasas bacterianas han sido clasificadas por Arpigny y Jaeger (1999) en base a la homología de su secuencia de aminoácidos y peso molecular (Tabla 1.1). Esta clasificación se mantiene vigente a pesar de haberse hecho hace varios años, ya que las principales familias de lipasas se han mantenido. En la clasificación original se identificaron alrededor de 50 lipasas las cuales fueron agrupadas en 8 familias:

- Familia I – Comprende un total de 22 enzimas que a su vez se dividen en 6 subfamilias
 - Subfamilia I.1 – enzimas con un peso molecular promedio de 30-32 kDa. Lipasas secretadas por la vía tipo II; para su secreción necesitan un transportador externo.
 - Subfamilia I.2 – enzimas de un peso molecular aproximado de 33 kDa debido a una inserción en la secuencia de aminoácidos que forma una

doble hoja β -antiparalela en la superficie de la molécula. También son secretadas por la vía tipo II.

- Subfamilia I.3 – enzimas de peso molecular mas alto que el de las subfamilias anteriores (*Pseudomonas fluorescens*, 50kDa; *Serratia marcescens*, 65 kDa), no tienen péptido señal en el N-terminal ni tampoco residuos de cisteína. Son enzimas secretadas por la vía tipo I; se autotransportan.
- Subfamilia I.4 – son las lipasas mas pequeñas conocidas hasta ahora (19 a 21 kDa). Tienen intervalos de pH óptimos alcalinos y preferencia hacia los triacilglicéridos de cadena corta como sustratos (<10 átomos de carbono en la cadena del acilo). Las lipasa conocidas de *Bacillus* tienen en común que el residuo de Ala es reemplazado por la primera glicina en el pentapéptido conservado, quedando: Ala-X₁-Ser-X₂-Gly.
- Subfamilia I.5 – su peso molecular es de aproximadamente 75 kDa. Las lipasas de *Staphylococcus* presentan gran similitud en su secuencia de aminoácidos y en sus propiedades bioquímicas, además de ser secretadas como precursores. Entre las lipasa verdaderas, la de *Staphylococcus hyicus* es la única que presenta una actividad fosfolipídica considerable.
- Subfamilia I.6 – comprenden a lipasas de los géneros *Propionibacterium* y *Streptomyces*.
- Familia II (GD₂SL) – No presentan el pentapéptido general Gly-X-Ser-X-Gly, si no la secuencia Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)]. En estas proteínas el aminoácido Ser está más cercano al extremo N-terminal que en otras enzimas lipolíticas.

- Familia III – Exhiben un plegamiento ortodoxo de α/β hidrolasa y contiene una típica triada catalítica. También muestran aproximadamente 20% de similitud en su secuencia de aminoácidos con isoformas intracelulares y plasmáticas del PAF-AH humano (factor-activador-de-plaquetas acetil hidrolasa, que son proteínas monoméricas). El aspartato catalítico de estas enzimas se encuentra en una posición no equivalente respecto a las lipasas de las demás familias.
- Familia IV (HSL) – A esta familia pertenecen las lipasas adaptadas al frío, actividad relativamente alta a temperaturas menores de 15°C, que muestran una considerable similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a la HSL de mamíferos (lipasas sensibles a hormonas).
- Familia V – Estas lipasas, al igual que las enzimas de la familia HSL, se encuentran en bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*), así como en bacterias psicrófilas (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) y en bacterias termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Muestran similitudes estructurales con deshalogenasas, haloperoxidasas y epóxido hidrolasas.
- Familia VI – Con un peso molecular promedio de 23-26 kDa, las enzimas de esta familia están entre las esterases mas pequeñas conocidas actualmente. Tienen gran especificidad con sustratos pequeños y no presentan actividad con triglicéridos de cadena larga. Exhiben aproximadamente 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos comparadas con lisofosfolipasas eucarióticas (fosfolipasas independientes de Ca^{2+}). La unidad biológicamente activa de estas enzimas es el dímero.

- Familia VII – Tienen un peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Comparten un 40% de similitud con las proteínas eucarióticas acetilcolina esterasa y la carboxilasa del hígado/intestino. Estas proteínas no han sido bien caracterizadas.
- Familia VIII – Presentan una similitud considerable con varias β -lactamasas clase C. Estas esterasas han sido identificadas con un motivo consenso Gly-X₁-X₂-Leu. Es necesaria más información estructural para describir claramente esta familia de esterasas.

1.6 LIPASAS DEL GÉNERO *BACILLUS*

Las lipasas del género *Bacillus* pertenecen a las subfamilias I.4 y I.5 dependiendo de su peso molecular y homología de secuencia. La mayoría de las lipasas termoestables provenientes de especies termófilas de *Bacillus* pertenecen a la subfamilia I.5, estas lipasas son de un peso molecular relativamente alto y presentan temperaturas óptimas elevadas. La subfamilia I.4, en contraste, agrupa lipasas de bacterias mesófilas del mismo género y cuyo peso molecular es pequeño. Dentro de la subfamilia I.4 existe una marcada homología de secuencias (mayor al 70% de identidad) pero a su vez presenta poca identidad respecto a las lipasas de la subfamilia I.5 (menor al 15%). En las lipasas de la subfamilia I.4, la secuencia característica Gly-X-Ser-X-Gly del pentapéptido que contiene al residuo catalítico de serina se modifica a una secuencia de Ala-X-Ser-X-Gly. Además las secuencias alrededor de los residuos catalíticos His y Asp son muy diferentes respecto a las de otras familias [Hyung y col., 2002].

Tabla 1.1. Familias de enzimas lipolíticas de origen microbiano. (Fuente: Arpigny y Jaeger, 1999)

Familia	Subfamilia	Especie productora	Número de acceso	Identidad (%)	Propiedades	
I	1	<i>Pseudomona aeruginosa</i> *	D50587	100	Lipasas verdaderas	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF0312260	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomona wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
		2	<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354		35
			<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489		35
	<i>Burkholderia cepacia</i> *		M58494	33		
	3	<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33		
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D11455	14		
	4	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15		
		<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16		
	5	<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13		
		<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15		
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14		
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15		
<i>Staphylococcus aureus</i>		M12715	14			
<i>Staphylococcus epidermis</i>		AF090142	13			
6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14			
	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	U80063	14			
II (GDSL)		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100	Aciltransferasa Esterasa o.m.-esterasa ^b	
		<i>Streptomyces scabies</i> *	M57297	36		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35		
		<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		
		<i>Photorhabdus luminescens</i>	X66379	28		
III		<i>Streptomyces exfoliatus</i> *	M86351	100	Lipasa extracelular	
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		
		<i>Moraxella sp.</i>	X53053	33		
IV (HSL)		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100	Esterasa Lipasa Carboxiesterasa Lipasa putativa Carboxiesterasa Esterasa extracelular 2	
		<i>Pseudomonas sp. B11-1</i>	AF034088	54		
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		
		<i>Moraxella sp.</i>	X53868	25		
V		<i>Pseudomona oleovorans</i>	M58445	100	PHA-despolimerasa ^b Esterasa putativa Esterasa extracelular Esterasa Esterasa extracelular 3	
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		
		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		
		<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		
		<i>Moraxella sp.</i>	X53869	34		
VI		<i>Synechocystis sp.</i>	D90904	100	Carboxiesterasas	
		<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50		
		<i>Pseudomona fluorescens</i> *	S79600	24		
		<i>Rickettsia prowazekki</i>	Y11778	20		
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16		
VII		<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100	Carbomato hidrolasa p-Nitrobencil esterasa Carboxiesterasa putativa	
		<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		
VIII		<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100	Esterasa	
		<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		
		<i>Pseudomona fluorescens</i> SIK W1	AAC60471	40		

* Enzimas lipolíticas con estructura tridimensional conocida.

^a Similitud en las secuencias de aminoácidos determinados con el programa Megalign (DNASar), con el primer miembro de la familia arbitrariamente fijado al 100%.

^b Esterasa unida a membrana externa.

Algunas especies del género *Bacillus* poseen un sistema lipolítico apropiado para usos biotecnológicos. En este contexto, las lipasas de *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. lincheniformis*, *B. termocatenulatus*, *B. thermoleovorans*, *B. stearothermophilus* y algunas otras especies han sido descritas, purificadas y clonadas [Ruiz y col., 2002].

Las lipasas de la subfamilia I.4 son las lipasas más pequeñas conocidas, con un peso molecular de 19-20 kDa [Schmidt-Dannert y col., 1997]. Hasta el año 1999, sólo tres enzimas estaban clasificadas en esta subfamilia, dos lipasas de *B. subtilis* (LipA y LipB) y una lipasa de *B. pumilus* que comparten un 74% de identidad de secuencia con respecto a las lipasas de *B. subtilis*. En base a estudios más recientes se han agregado a esta subfamilia las lipasas provenientes de *B. lincheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* DBRI-191, *B. sp.* B26 y *B. circulans* [Lesuisse y col., 1993; Nthangeni y col., 2001; Hyung y col., 2002].

La lipasa A de *B. subtilis* (BslA) es una de las más estudiadas dentro de las lipasas del género *Bacillus*. Es la única cuya cristalización y estructura tridimensional ha sido descrita [van Pouderoyen y col., 2001]. Otras lipasas de la subfamilia I.4 no han sido estudiadas tan exhaustivamente, aunque muchas de ellas han sido expresadas exitosamente en *E. coli*, purificadas y se han explorado su potencial catalítico. Sin embargo no se ha cristalizado ninguna de estas enzimas ni hay estudios detallados de sus propiedades catalíticas.

Capítulo 2. Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

2.1 INTRODUCCIÓN

La bacteria *Bacillus pumilus* GMA1 (Fig. 2.1) fue aislada en Los Azufres, Michoacán, México. La lipasa producida por esta cepa tiene preferencias por ácidos grasos de cadena corta como sustratos. La actividad de esta enzima ha sido caracterizada frente a distintas condiciones fisicoquímicas, encontrándose valores de temperatura y pH óptimos interesantes para usos industriales [Bustos, 1995].

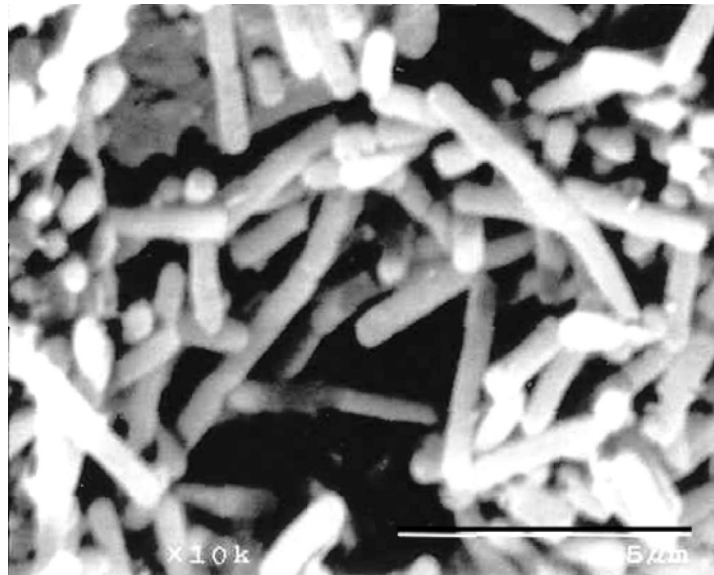


Figura 2.1. *Bacillus pumilus* GMA1 a 10,000x. La línea de escala representa 5 µm (Cortesía: Q.A. Patricia Wong).

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BplA) es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis* (BslA) [Bustos, 1998]. Las dos lipasas tienen 181 residuos de amino ácidos en sus formas

maduras y un peso molecular de 19.5 kDa. A partir de los datos cristalográficos de BslA [van Pouderoyen y col., 2001] se ha modelado la estructura de la lipasa BplA tomando en cuenta la enorme identidad de secuencia que hay entre ambas proteínas (Fig. 2.2). Se trata de una molécula globular con un plegamiento clásico α/β hidrolasa con 6 hebras- β paralelas flanqueadas por 6 hélices α . La triada catalítica corresponde a los residuos de Ser77, Asp133 e His156 y los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 forman la cavidad oxianiónica y están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas de estructura conocida [Mora, 2008].



Figura 2.2. Modelo estructural de la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156. (Fuente: Mora, 2008).

2.2 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

La actividad de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 ha sido caracterizada en extractos parcialmente purificados. Esta caracterización se realizó estudiando la hidrólisis de tributirina en emulsiones a distintos pHs y temperaturas. Estos estudios mostraron valores de temperatura óptima (T_{opt}) y pH óptimo (pH_{opt}) de 50°C y 10, respectivamente [Bustos, 1995; Wong, 2001]. También se sabe que esta proteína presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta como sustrato [Bustos, 1998].

Recientemente se han explorado las capacidades de síntesis y de hidrólisis de la BpLA. En las reacciones de hidrólisis se emplearon diferentes compuestos fenólicos bioactivos acetilados, cuya actividad consiste en presentar propiedades reductoras. Entre los sustratos evaluados se obtuvieron resultados positivos con los ésteres acéticos del ácido ferúlico, del ácido cumárico, de la hidroxiquinona, de la amirina, difeniletanol, del α -naftol, de la quercetina y de la catequina. Para la reacción de interesterificación se utilizó tricaprilina y ácido linoleico conjugado, para obtener un lípido funcional en alimentos. Esta reacción funcionó satisfactoriamente. Estos resultados indican el potencial que presenta esta enzima en aplicaciones de biocatálisis [Ruiz, 2007].

Actualmente se conocen mas de 20 enzimas lipolíticas de la familia I.4 que han sido identificadas y caracterizadas a partir de especies de *Bacillus*. Estas incluyen lipasas y esterases de microorganismos mesófilos o termófilos. Dentro de este grupo destacan dos lipasas termoactivas; la lipasa de *B. licheniformis* y la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Estas presentan valores de T_{opt} entre 50-60°C [Bustos, 1995; Wong, 2002; Nthangeni, y col., 2001].

2.3 LIPASA RECOMBINANTE DE *B. PUMILUS* GMA1 (BPLA-R)

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BpIA) ha sido clonada y expresada en *E. coli*. La expresión de esta lipasa en *E. coli* no requiere la región del gen que codifica para el péptido señal de secreción en *Bacillus*. Por esta razón a la secuencia que codifica para la forma madura de la lipasa se le adicionó un codón de inicio (ATG) en el extremo 5'. Este gen modificado se clonó en el vector pET22b+, en el que fue posible fusionarlo con una secuencia que codifica para un pentapéptido que contiene una etiqueta de His en su extremo 3' [Mora, 2008]. La proteína resultante fue modelada al igual que se hizo con la enzima silvestre encontrando que no había diferencias significativas, aunque sólo se trata de un estudio computacional (Fig. 2.3).

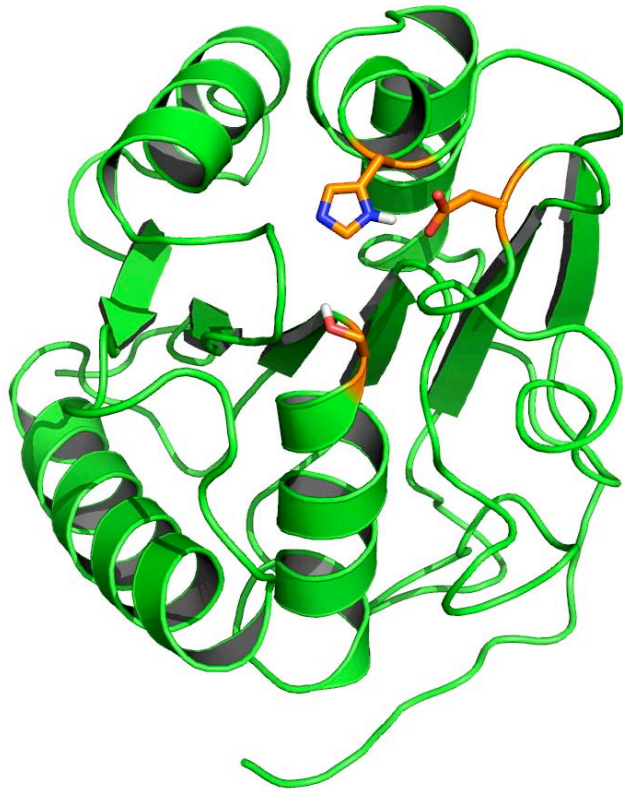


Figura 2.3. Modelo estructural de la lipasa *B. pumilus* GMA1 recombinante (BpIA-r). Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156.

Esta lipasa recombinante, con una Met en su extremo N-terminal y una etiqueta de His en su extremo C-terminal (BplA-r), fue caracterizada cinéticamente por [Mora \(2008\)](#), quien además analizó el efecto de algunas mutaciones en su termoestabilidad. Los estudios de Mora indican que la mutación Gly28Ser aumenta la k_{cat} hasta 400%, mientras que otras mutaciones pueden mejorar su desempeño a altas temperaturas. Sin embargo, estos estudios también indicaron que esta enzima recombinante es mesófila y no termófila como se sugiere en estudios anteriores. Sin embargo la proteína recombinante es ligeramente distinta de la silvestre y las condiciones del ensayo fueron distintas tanto en pH, temperatura, sustrato y presencia de surfactantes [[Mora, 2008](#)].

En todos los estudios realizados con esta lipasa se ha probado su potencial como hidrolasa de ésteres al igual que su capacidad de sintetizar lípidos. Sin embargo la utilización de sustratos distintos de los ésteres, pero químicamente parecidos, no ha sido estudiada. Por su estructura electrónica, es posible que los tioésteres, las amidas y los carbonatos orgánicos puedan ser hidrolizados por las lipasas, en lo que podría definirse como promiscuidad catalítica.

En este trabajo se estudian las propiedades cinéticas de esta enzima recombinante al igual que su promiscuidad enzimática.

Capítulo 3. Promiscuidad enzimática

La promiscuidad enzimática es un fenómeno bastante frecuente pero todavía poco entendido. Este fenómeno parece tener una particular relevancia en la evolución de nuevas funciones, metabolismo de fármacos, y en ingeniería biocatalítica *in vitro*.

Se ha pensado tradicionalmente que las enzimas son catalizadores específicos para convertir un solo sustrato en un solo tipo de producto. En los últimos años se ha descubierto que muchas enzimas son capaces de metabolizar sustratos de estructuras diferentes o convertir un sustrato a variados productos, en otras palabras presentan promiscuidad catalítica [Copley, 2003].

Al parecer la promiscuidad catalítica juega una función muy importante en la evolución de nuevas funciones a partir de formas ya predeterminadas. Se ha propuesto que las mutaciones puntuales causan que una enzima específica por un sustrato se vuelva más promiscua; después de una duplicación genética, los templados promiscuos pueden sufrir más mutaciones para ganar o optimizar nuevas funciones [Khersonsky y col., 2006].

En principio las enzimas desintoxicantes son el resultado de la selección y evolución de la promiscuidad. La principal característica de las enzimas desintoxicantes como son los citocromos P450 (CYPs), las glutatión S-transferasas (GST's) y las uridil difosfato ácido-glucorónico transferasas (UGTs), entre otras, es su habilidad de metabolizar compuestos químicos con propiedades muy variadas [Ekroos y Sjogren, 2006]. Por otro lado estas enzimas también presentan promiscuidad de productos además de la promiscuidad de

sustratos, ya que una sola enzima desintoxicante es capaz de producir una gran variedad de productos a partir de un solo sustrato. También los sistemas de regulación responsables de la inducción de estas enzimas son altamente promiscuos. En resumen la promiscuidad catalítica es obvia en muchos niveles de la catálisis de desintoxicación [Cook y Atkins, 1997].

Dicho lo anterior, la promiscuidad enzimática se puede definir simplemente como la habilidad de una enzima de metabolizar diferentes sustratos: una enzima altamente promiscua es una que metaboliza una gran variedad de sustratos con la misma eficiencia catalítica. Una enzima que metaboliza sustratos diferentes con la misma eficiencia es mas promiscua que una enzima que metaboliza compuestos similares [Abhinav y Atkins, 2007]. Todavía no existe una medida cuantitativa de la promiscuidad enzimática, lo que hace que sea casi imposible comparar el comportamiento promiscuo de diferentes enzimas. Hasta la fecha es poco comprendido la relación entre la promiscuidad enzimática y la estructura de la proteína, aunque se piensa que la flexibilidad estructural confiere promiscuidad [Abhinav y Atkins, 2007]. Sin embargo estudios más detallados para entender mejor el mecanismo molecular de la promiscuidad y su papel biológico son difíciles de realizar sin tener una medida cuantitativa de la promiscuidad funcional. Tampoco se tiene claro aún qué tan promiscuo tiene que ser un templado para facilitar la evolución de nuevas funciones o si los grados de plasticidad estructural requeridos para una alta plasticidad funcional están acompañados de inestabilidad térmica.

El estudio de la promiscuidad catalítica es de gran importancia ya que las enzimas existentes pueden ser usadas con diferentes propósitos, al igual que se pueden modificar las enzimas conocidas para que funcionen de manera diferente. Las lipasas son una de

tantas enzimas que presentan promiscuidad enzimática. En nuestro caso estamos interesados en estudiar la utilización de carbonatos orgánicos por las lipasas. Estos compuestos tienen diversos usos industriales y esencialmente no existen en la naturaleza, razón por la cual pueden considerarse como contaminantes, aunque también son bloques de construcción en química orgánica para la obtención de bienes de consumo [Abbas-Alli, 1996; Parrish y col 2000].

Capítulo 4. Carbonatos orgánicos

4.1 DEFINICIÓN

Los carbonatos son las sales del ácido carbónico o ésteres con el grupo R-O-C(=O)-O-R'. Pueden considerarse derivados del ácido carbónico (H₂CO₃), que se forma al disolver dióxido de carbono (CO₂) en agua. Según el pH están en equilibrio con el bicarbonato y el dióxido de carbono. La mayoría de los carbonatos a parte de los carbonatos de los metales alcalinos son poco solubles en agua. Debido a esta característica son importantes en geoquímica y forman parte de muchos minerales y rocas Si los átomos de hidrógeno del ácido carbónico son reemplazados por átomos de un metal, se forma un carbonato inorgánico, por ejemplo el carbonato de sodio, Na₂CO₃. Si los átomos de hidrógeno se sustituyen por radicales orgánicos, se forman carbonatos orgánicos, por ejemplo el carbonato de etilo, (C₂H₅)₂CO₃. Los carbonatos orgánicos son ésteres del ácido carbónico. Se pueden formar a partir de fosgeno (Cl₂C=O) y el alcohol correspondiente [Abbas-Alli, 1996].

El ácido carbónico, que es inestable a temperatura ambiente, ha sido purificado a temperaturas bajas y caracterizado de manera espectroscópica. La diesterificación del ácido carbónico con compuestos hidroxilados (alcoholes) lleva a la formación de compuestos orgánicos estables, carbonatos orgánicos. Dependiendo de la naturaleza del compuesto hidroxilado el carbonato resultante puede ser un dialquilcarbonato, un diarilcarbonatos, o un carbonato mixto con sustituyentes dialquilo y diarilo. Existen

muchos tipos de carbonatos orgánicos de los cuales el mas sencillo es el dimetil carbonato [Hage y col., 1993].

4.2 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS

Los carbonatos de dialquilo de importancia industrial son todos líquidos incoloros. La mayoría de ellos tienen aromas placenteros. Por otro lado los carbonatos aromáticos son sólidos. El etilencarbonato es muy soluble en agua, mientras que el propilencarbonato es mucho menos soluble (25.0 g/100 g de agua a 25°C). El butilencarbonato es aún menos soluble (7.0 g /100 g de agua a 25°C). Los dimetil y dietil carbonatos son prácticamente insolubles en agua pero son muy solubles en disolventes orgánicos, particularmente en los más polares como son los ésteres, las cetonas, los éteres, los alcoholes y los hidrocarburos aromáticos [Abbas-Alli, 1996].

4.3 USOS INDUSTRIALES

El etilencarbonato tienen un amplio uso como disolvente de compuestos aromáticos, de polímeros y de sales inorgánicas. En muchos casos, los etilen- y propilencarbonatos ofrecen una alternativa segura y limpia a los disolventes dipolares apróticos más peligrosos, como la acetona y el etil acetato. Al igual que otros carbonatos son utilizados en industrias como disolventes para la separación de fenoles y ciclohexanos [Murtha, 1978].

Los policarbonatos son usados ampliamente en la producción de resinas para CD's y DVD's, al igual que en la producción automotriz en donde son utilizados para fabricar algunas partes de los automóviles y próximamente se espera que sustituyan al vidrio [Parrish, y col., 2000].

Los carbonatos también han sido utilizados como aditivos en combustibles debido a su alto contenido de oxígeno y a que reducen las emisiones contaminantes, como es el caso del dimetil carbonato (DMC), así como aceites lubricantes en refrigeradores [Pacheco y col., 1997]. Algunos carbonatos con altas constantes dieléctricas son utilizados en las baterías y condensadores [Azumato y Ishida, 1971].

Los alquil carbonatos son utilizados en síntesis orgánicas como grupos protectores para alcoholes. Por otro lado, los alil-alquil carbonatos se han utilizado de manera extensa en la química de los péptidos y azúcares, y para la síntesis de productos naturales como son las avermectinas y los acil glucoronidos [Cvetovich y col., 1994].

Estos son sólo algunos usos que tienen los carbonatos orgánicos. Hay innumerables ejemplos de usos en química orgánica como factores importantes de muchas síntesis. En este trabajo se utilizó un carbonato orgánico, el bencil-4-nitrofenol carbonato, como modelo general para la hidrólisis de los carbonatos utilizando la lipasa recombinante de *B. pumillus* GMA1 (BplA-r) como catalizador. El estudio de esta reacción puede dar pie a la posible producción de carbonatos orgánicos utilizando enzimas como catalizadores.

4.4 DIMETIL CARBONATO

Uno de los carbonatos orgánicos más conocidos es el dimetil carbonato (DMC) (Fig 4.1). Éste es considerado una buena opción para mejorar las especificaciones de oxigenación en la gasolina y como un medio en la conversión del gas natural a un combustible líquido. Existen tres esquemas comerciales para su producción, la mas antigua de todas es la menos eficiente ya que usa fosgeno, el cual es un compuesto imposible de transportar. Los otros dos métodos tienen una complicada serie de ventajas y desventajas [Pacheco y Marshall, 1997; Aresta y col., 2001].

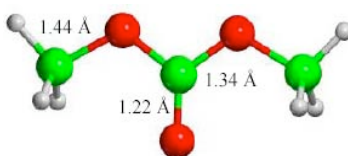


Figura 4.1. Estructura química de dimetil carbonato (DMC)

El DMC es una opción viable en las industrias de refinería, para que estas puedan cumplir con las especificaciones de oxígeno en la gasolina. El DMC tiene gran contenido de oxígeno (53% en peso), alto octanaje, reduce las emisiones de CO₂ y NO_x, tiene un punto de congelación de 1°C (en gasolina al 3-4%, el punto de congelación es por debajo de los -40°C), una baja toxicidad y se biodegrada rápidamente [Pacheco y Marshall, 1997]. Todas estas características son muy ventajosas en el uso de éste como aditivo para gasolina, el problema radica en que su producción es muy compleja y problemática y las cantidades de DMC que son producidas en este momento a nivel mundial son muy bajas e insuficientes para darle este tipo de uso.

Como hemos mencionado con anterioridad, sólo existen tres métodos comerciales para la producción de este compuesto. Un proceso desarrollado por ENIChem (Italia) que es utilizado a mayor escala que se basa en una carbonilación oxidativa de metanol utilizando el CuCl como catalizador. Este proceso, aunque es el más utilizado de todos y el de mayor escala, tiene varios inconvenientes como son los problemas de separación y bajas conversiones por ciclo [Pacheco y Marshall, 1997]. La empresa UBE (Japón) desarrolló una carbonilación oxidativa basada en la tecnología que ellos han utilizado ya por varios años en la producción de dimetil oxalato, en donde el DMC es un subproducto. Se usa un catalizador basado en óxido nítrico, UBE opera con una conversión mucho más alta (casi de 100%), requiere de menor volumen de reactor que el proceso de ENIChem, y tiene menos problemas de desactivación del catalizador [Pacheco y Marshall, 1997].

Existen otros dos procesos que no son de práctica comercial pero son bastante eficientes y podrían tener una aplicación comercial. Un esquema patentado por Dow utiliza un sistema de catálisis similar al de ENIChem, utilizando un catalizador impregnado en carbón activado. Las conversiones por ciclo son comparables con las del método de ENIChem, pero el catalizador se va desactivando ya que pierde área superficial. La regeneración de este catalizador con HCl seco es otra complicación más. A pesar de que Dow está trabajando para mejorar esta catálisis es muy poco probable que ésta llegue a ser de uso industrial por lo menos en los próximos años [Pacheco y Marshall, 1997].

En el otro esquema, desarrollado por Texaco entre otros, un carbonato cíclico se forma a partir de etileno a través del óxido de etileno, y es subsecuentemente transesterificado para formar un mol de etilenglicol por cada mol de DMC producido. Este método es el menos probable de ser utilizado a nivel de industria ya que la productividad es baja y la

economía está muy ligada al mercado de etilenglicol [Pacheco y Marshall, 1997]. Estos son los métodos mas utilizados para la producción de DMC pero existen muchos otros que no son tan utilizados y mucho menos efectivos.

La evaluación de la tecnología de producción de DMC y sus propiedades de combustible se ha vuelto muy importantes para la industria de aceites, por que los recientes estudios económicos han demostrado que es mucho mas económico usar DMC en la gasolina reformulada que MTBE (metil ter-butil éter) producido de butano. El DMC no puede considerarse un mejorador de octanaje debido a su elevado precio [PREP Report, Chem. Systems Inc. 90S7, 1991]. Sin embargo es uno de los oxigenantes más eficientes hablando de costo-beneficio. El DMC nunca se ha utilizado en la gasolina de manera comercial, pero existen muchas patentes de la utilidad de éste en combustibles. Union Oil Co. recientemente ha patentado el uso de DMC y de DMDC (dimetil dicarbonato) como aditivo de combustibles por su capacidad de reducir las emisiones de partículas en motores de combustión interna que utilizan diesel como combustible [Kanne y Iwamoto, 1990; US Patent 4,904,279]. En 1983 salió una patente Japonesa la cual muestra que el DMC es mas eficiente en la reducción de las emisiones de CO₂ y NO_x que el etanol en los automóviles [Imoura y Matsushita, 1986; Japanese Patent Sho 61[1986]-207496]. Mas recientemente se ha reportado que las emisiones de automóviles que utilizan DMC como aditivo, analizados por Amoco (American Oil Company), indican que el DMC reduce el total de las emisiones de hidrocarburos y CO₂ mucho mas que el MTBE a igual porcentaje de peso de oxígeno en el combustible. Las emisiones de formaldehído también fueron mas bajas con DMC que con MTBE [Pacheco y Marshall 1997] (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Historia de Patentes del DMC como aditivo a combustibles. (Fuente: Pacheco, M. A. y Marshall, C. L. 1997)

Año/inventor/no. de patente	Compañía/función	Niveles de uso
1943 Gaylor US 2,331,386	Standard Oil Dev. Co. Mejora de la llegada e inyección del diesel al motor	3% DEC y DBC (dibutil carbonatos) en diesel.
1982 Bretherick EP 82,688	BP Usos en gasolinas	10% DMC y DEC en gasolina
1983 Short EP 98,691	ICI Aumento en el octanaje	5% DMC y DEC en gasolina
1983 Smith US 4,380,455	Dow Cosolvente para el gasohol, previene separación de fase.	0.4% en gasohol, 10% EtOH
1986 Inomura y Matsushita JP 61-207496	Toyo Soda Industry Co. Combustible para motor de combustión interna.	10% en gasolina con y sin etanol.
1986 Jessup, Brass, y Croudace US 4,600,488	Unocal Aumento en el octanaje.	
1986 Kane y Iwamoto US 4,904,279	Union Oil Combustibles compuestos de hidrocarburos con carbonatos y bicarbonatos como aditivos.	
1990 Dillon e Iwamoto US 4,891,049	Unocal Reducción de emisión de partículas en diesel.	

El DMC reacciona muy lentamente con agua para producir metanol y CO₂. Las condiciones que favorecen esta reacción son la elevada temperatura, una gran cantidad de agua libre y la presencia de álcalis. Bajo condiciones normales en gasolina sin agua libre la reacción no procede en absoluto. Con cantidades pequeñas de agua libre y temperaturas adecuadas, una parte del DMC entrara a la fase acuosa y se hidroliza. En un sistema completamente acuoso y con carbonato alcalino como catalizador el DMC se hidroliza de manera muy lenta [Crandal y col., 1987; US Patent 4,600,408].

Es importante realizar mas estudios respecto al uso de DMC como aditivo en la gasolina y para poder encontrar maneras mas eficientes de producción de este compuesto que faciliten su uso a gran escala. Consideramos que si el DMC u otros carbonatos pueden ser hidrolizados por una lipasa promiscua, entonces bien se podría pensar en una reacción en sentido contrario. Por ahora nos enfocaremos en la reacción de hidrólisis catalizada por la BplA-r, utilizando como sustrato modelo al bencil-4-nitrofenil carbonato, un carbonato orgánico cromogénico.

Capítulo 5. Objetivos

GENERALES:

- Demostrar y caracterizar cinéticamente la hidrólisis de bencil-4-nitrofenil carbonato por la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1

PARTICULARES:

- Sobre-expresar en *E. coli* y purificar la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1
- Medir la constante de inactivación de la enzima y la constante de hidrólisis espontánea del bencil-4-nitrofenil carbonato en las condiciones del ensayo
- Determinar si la enzima producida presenta promiscuidad hidrolítica frente a carbonatos orgánicos
- Determinar los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , para la hidrólisis del bencil-4-nitrofenil carbonato por la BplA-r

Capítulo 6. Materiales y métodos

6.1 MATERIALES

Reactivos químicos:

Reactivo	Marca
Ácido bicinconánico (BCA)	Sigma
Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	Sigma
Agar LB (Luria Bertráni)	Difco
Albúmina bovina	Sigma
Ampicilina	Sigma
Bicarbonato de sodio anhidro (NaHCO_3)	Sigma
Bencil-4-nitrofenil carbonato	Aldrich
Caldo Luria Betrani (LB)	Sigma
Carbonato de Sodio anhidro (Na_2CO_3)	Sigma
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)	Sigma
Glicerol	Sigma
Hidróxido de sodio (NaOH) (lentejas)	J. T. Backer
Imidazol	Sigma
IPTG	Sigma
Reactivos para electroforesis	Sigma
4-Nitrofenil acetato (pNFA)	J. T. Backer
4-Nitrofenol	Sigma
Reactivos para electroforesis	Sigma
Sulfato de cobre (CuSO_4)	Sigma
Tartrato dibásico dehidratado	J. T. Backer
Triton X100	Sigma

Amortiguadores utilizados:

Amortiguador	Número	Características
Sonicado	1	Fosfato de potasio 20 mM Imidazol 10 mM pH = 7.5
Equilibrado	2	Fosfato de potasio 20 mM NaCl 500 mM Imidazol 20 mM pH = 7.5
Elución	3	Fosfato de potasio 20 mM NaCl 500 mM Imidazol 500 mM pH = 7.5
Regeneración	4	EDTA 50 mM NaCl 500 mM pH = 4
Fosfatos con Tritón X100	5	Fosfato de potasio 50 mM TritonX100 1% (v/v) pH = 7.5

Equipos:

Equipo	Marca
pHmetro 713 <i>Metrohm</i>	Brinkmann
Espectrofotómetro CARRY 400	Varian
Sonicador CV26	Cole Parmer
Espectrofotómetro <i>Ultrospec 2000</i>	Amersham-Pharmacia
Microcentrífuga 5417R	Eppendorf
HPLC (Controlador 600S, bomba 626, detector dual de absorbencia 2487, desgacificador en línea <i>AF</i> y colector de fracciones III)	Waters
Centrífuga <i>Avanti J-251</i>	Beckman
Cámara de electroforesis	BioRad
Incubadora orbital	Lab-Line Instruments Inc.
Thermomixer	Eppendorf

Material Biológico:

Cepa Bacteriana	Descripción
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Transformada con el plásmido pETbpl, que contiene el gen que codifica para la BplA-r

6.2 MÉTODOS

- **Producción de Biomasa**

Para producir cantidad suficiente de la enzima estudiada, BplA-r, se sembró la cepa *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformada con el plásmido pETbpl, el cual contiene la construcción que permite la expresión de la lipasa BplA-r, y se indujo la producción de la enzima con IPTG. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Sembrar cepa *E. coli* BL21 (DE3) en medio sólido con ampicilina.
2. Incubar toda la noche a 37°C.
3. Seleccionar dos colonias diferentes del cultivo e inocular con cada una dos tubos de 10 mL con medio de cultivo LB líquido, esterilizado previamente, al cual se le agrega ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL. Incubar toda la noche a 37°C con agitación suave.
4. Inocular con las 2 muestras anteriores un matraz con 1 L de medio LB líquido, e incubar a 37°C con agitación suave, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.7.
5. Inducir la producción de la proteína agregando IPTG al medio de cultivo a una concentración final de 0.5 mM.
6. Incubar a 37°C con agitación de 250 rpm de 3 a 4 horas.

7. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. Eliminar el sobrenadante.
8. Resuspender las células en amortiguador de sonicado frío (amortiguador 1).
9. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. Eliminar sobrenadante.
10. Resuspender las células en amortiguador de sonicado, poner muestra en hielo.
11. La muestra en hielo se somete a 18 pulsos de sonicación de 20 segundos de duración a 40-50 W, dejando descansar la muestra 1 min entre cada pulso para evitar que la muestra se caliente.
12. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 min. Conservar el sobrenadante (fracción soluble), que es el extracto intracelular, a 4°C.
13. Separar 1 ml del sobrenadante para pruebas de actividad posteriores así como de concentración de proteína (muestra de proteína antes de purificar).

- **Purificación de la lipasa BplA-r por cromatografía de afinidad**

La lipasa BplA-r cuenta con una cola de histidina (6 residuos de histidina) que le fue agregada para poder purificarla mediante una resina impregnada con iones de níquel, metal afín a los residuos de histidina de la proteína [Mora, R. 2008]. Para la purificación de la proteína se siguió un método desarrollado anteriormente por Mora (2008), para purificar la misma enzima, basándose en el procedimiento de purificación sugerido por el fabricante de la resina de afinidad (Protino Ni-IDA, Macherey Nagel). Se utilizó el equipo cromatográfico HPLC de Waters. La muestra inyectada en el equipo fue el extracto intracelular obtenido. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se empacó una columna cromatográfica (Waters) con 20 ml de la resina Protino Ni-IDA. La columna se instaló debidamente en el equipo de HPCL (Waters) que

consiste en: controlador (600S), bomba (626), detector dual de absorbencia (2487), desgacificador en línea (AF) y colector de fracciones (III). El programa utilizado para el manejo del equipo fue el *Empower* (Waters).

2. Se utiliza una velocidad de flujo de 2 mL/min durante toda la corrida cromatográfica, para pasar las disoluciones por la columna.
3. Se pasan 200 mL de agua destilada, 200 mL de NiSO₄ 10 mM y 200 mL del amortiguador de equilibrado (Amortiguador 2).
4. Se inyecta la muestra (extracto intracelular).
5. Se pasan 200 mL del amortiguador de equilibrado.

Elución de la proteína

6. Se pasa el amortiguador de elución (Amortiguador 3) de forma gradual para hacer un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM durante 90 min.
Se recogen fracciones de 2 mL.
7. Las fracciones en las que se encuentra la proteína pura se colectan, se verifica su pureza mediante un análisis de electroforesis, y se dializan frente a una solución de fosfato de potasio 20 mM pH 7.5, para eliminar el imidazol.
8. La proteína pura se concentra en glicerol 50% (V/V) para su posterior conservación a -20°C.

Regeneración de la columna

9. Se pasan 400 mL del amortiguador de regeneración (Amortiguador 4), 400 mL de agua destilada y 400 mL de agua destilada con 20% de etanol.
10. La columna se conserva a 4°C.

- **Análisis de proteína purificada mediante electroforesis**

Se corrió un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) para verificar la pureza de la proteína recolectada en la columna de afinidad, se comparó con una muestra de la proteína antes de purificar y con la muestra de la proteína pura y concentrada. Se tomaron 9 muestras de los tubos recolectados en la cromatografía de afinidad, de la fracción que correspondía a la proteína pura. Para ello se usó un gel separador y un gel y un gel concentrador, que se prepararon como se indica en el método. En cada carril se pusieron 5 μ L de muestra mezclada con mezcla desnaturizante (4:1), centrifugada y calentada a baño María anteriormente. La electroforesis se realizó usando una diferencia de potencial de 160 volts durante 40 minutos. El gel se tiñó con azul de Coomasie.

Gel empacador (para 4 geles):	Acrilamida-bis	875 μ L
	Tris-HCl 1M pH 6.8	325 μ L
	SDS 10%	25 μ L
	Agua	2.86 mL
	PODS	90 μ L
	Desgasificar al vacío	
	TEMED	20 μ L
Gel separador (para 4 geles):	Acrilamida-bis	8.00 mL
	Tris-HCl 1M, pH 8	8.75 mL
	SDS 10%	0.22 mL
	Agua	4.3 mL
	PODS	0.3 mL
	Desgasificar al vacío	
	TEMED	27 mL
Mezcla desnaturizante:	SDS 10%	2 mL
	Merceptoetanol	200 μ L
	E.D.T.A 250 mM	160 μ L
	Glicerol	2 mL
	Tris-HCl 1M pH 6.8	1 mL
	Agua	hasta 5 mL
	Azul de bromofenol	0.1 mg

- **Medición de actividad**

Método espectrofotométrico con 4-nitrofenil acetato (pNFA). La lipasa reconoce y cataliza la reacción de hidrólisis del pNFA generando un compuesto colorido, el 4-nitrofenol (pNF), que absorbe en la región visible a 410 nm. La absorbencia se midió con un espectrofotómetro CARY 400 (Varian). Se mide la absorbencia con una concentración conocida de sustrato y enzima y después estos valores son divididos entre la pendiente de una curva patrón de pNF, que se hace el mismo día del experimento. Se calculó tanto la actividad de la enzima ya purificada como de la enzima antes de purificar, esto para obtener la actividad absoluta la cual indica la cantidad de enzima que se ha perdido en el proceso de purificación. También se midieron tanto las actividades volumétricas como las específicas (actividad volumétrica/concentración de proteína). Para medir la actividad volumétrica se sigue el siguiente protocolo:

1. En una celda de espectrofotómetro con 1000 μL de la mezcla de sustrato (500 μM de pNFA en el amortiguador de fosfatos con tritonX100 (Amortiguador 5), preincubada a la temperatura de estudio (25°C), adicionar 10 μL de la enzima lipasa BplA-r (ya sea muestra de la enzima pura o la muestra tomada antes de purificar la enzima).
2. Medir el cambio de absorbencia a 410nm en el tiempo ($\text{Abs}_{410}/\text{min}$) contra un blanco (mezcla sustrato sin enzima) a 25°C.
3. A partir de los datos anteriores se calculó la producción de pNF en el tiempo usando el valor de la pendiente de la curva patrón de pNF ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$).

4. Después de haber calculado la concentración de la proteína los datos obtenidos de actividad volumétrica se dividen entre la concentración de la proteína para obtener el valor de la actividad específica.
5. Teniendo los datos de la actividad volumétrica se calculó la actividad absoluta para medir el porcentaje de enzima que se perdió en el proceso de purificación. Los valores de la actividad volumétrica se multiplicaron por el volumen total de la muestra. Se considero que la actividad volumétrica de la muestra sin purificar por el volumen de esta misma muestra corresponde a un 100% de actividad absoluta y a partir de este dato se calculo la actividad absoluta de la muestra ya purificada.

Tanto para la muestra de la proteína purificada como para la muestra de la proteína antes de purificar se siguió el protocolo anterior. Por cada muestra se prepararon tres celdas de espectrofotómetro, como se indica en el protocolo, y se midió el cambio de absorbencia a 410 nm en el tiempo (Abs_{410}/min). Teniendo estos datos se obtuvo un valor promedio del cambio de absorbencia de las tres celdas. El valor promedio obtenido para cada muestra, proteína purificada y proteína antes de purificar, se dividió entre la pendiente de la curva patrón y se multiplicó por el inverso del factor de dilución, para obtener los valores de actividad de las dos muestras. Se hicieron las conversiones de unidades pertinentes para tener unidades de U/ml; una unidad (U) es la cantidad de enzima que genera 1 μ mol de producto en 1 min.

- **Determinación de la concentración de proteína.**

Para poder calcular la actividad específica y los parámetros cinéticos, calculamos la concentración de la enzima que teníamos tanto en la muestra sin purificar como en la muestra de enzima pura obtenida. Para esto se utilizó el método de ácido bicinconínico (BCA). Este método se basa en el hecho de que los iones de Cu^+ formados en condiciones alcalinas se ligan al enlace peptídico de los aminoácidos en las proteínas. Este complejo es detectado por la reacción con el BCA produciendo un color púrpura intenso, el cual es proporcional a la cantidad de proteína. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se prepara el reactivo BCA como se indica en la siguiente tabla:

Reactivo	Cantidad	Procedimiento
BCA	5g	En un vaso de pp, disolver las sales con un poco de agua destilada. Ajustar el pH a 11.3. Aforar a 500mL con agua destilada. Conservar en refrigeración.
Na_2CO_3 anhidro	8.55g	
Tartrato dibásico dihidratado	0.8g	
NaOH lentejas	2g	
NaHCO_3 anhidro	4.73g	
H_2O	Aforar a 500mL	

2. Diluir 10 μL de la muestra problema con 90 μL de agua destilada (factor de dilución 10^{-1}).
3. Diluir 10 μL de la disolución anterior con 90 μL de agua destilada (factor de dilución 10^{-2}) y adicionar 1 mL de la mezcla BCA- Cu^{2+} (9,800 μL de BCA, 200 μL de CuSO_4 4% p/v).
4. Mezclar perfectamente e incubar a 37°C durante 30 min. Las muestras adquieren color púrpura intenso.
5. Medir absorbencia a 562 nm. Se utilizó el espectrofotómetro *Ultrospec 2000* (Amersham-Pharmacia).

6. Para calcular la concentración de la proteína se dividieron las absorbencias obtenidas entre la pendiente de una curva patrón de albúmina bovina ($Abs_{562}/[mg/ml]$) y el resultado obtenido se multiplicó por el inverso del factor de dilución.

Tanto para la muestra de la enzima pura como para la enzima impura este procedimiento se realizó para muestras con 2 factores de dilución, 10^{-1} y 10^{-2} , y por duplicado. Los cálculos se realizaron con el promedio de las absorbencia obtenidas por cada factor de dilución, obteniendo de esta manera 2 datos por muestra de enzima, para corroborar su veracidad, la concentración de proteína reportada es el promedio de los dos datos.

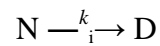
- **Estabilidad de la enzima BpIA-r en condiciones experimentales**

Se midió la estabilidad de la lipasa BpIA-r en condiciones experimentales, a $25^{\circ}C$ en Amortiguador 5, para poder calcular la constante de inactivación (k_i), la cual se utilizó para calcular los parámetros cinéticos de K_m y k_{cat} . La enzima fue incubada en las condiciones experimentales durante 360 min y se midió la actividad a los 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se prepararon 16 tubos con 500 μL de solución enzimática (0.25 μM concentración final de enzima, en amortiguador de fosfatos (Amortiguador 5)).
2. Los tubos fueron incubados en el Termomixer (Eppendorf) a $25^{\circ}C$ sin agitación.
3. A los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos, se sacaron 2 tubos y su contenido fue transferido a una celda de espectrofotómetro con 500 μL de solución de sustrato (500 μM de pNFA en el amortiguador de fosfatos con Tritón X100 (Amortiguador 5)).

4. Se midió el cambio de absorbencia a 410 nm en el tiempo (Abs_{410}/min) contra un blanco (mezcla sustrato sin enzima) a 25°C. Como esto se realizó por duplicado en cada tiempo se calculó un promedio entre los 2 valores obtenidos.
5. Se calcularon los valores de actividad volumetrica en cada tiempo.

Para calcular la constante de activación se considero que la enzima solo tiene dos estados el nativo N (enzima con actividad) y el desnaturalizado D (enzima sin actividad). El paso de N a D esta dado por:



En donde la velocidad de este proceso esta dada tanto por la constante de inactivación como por la concentración de la enzima nativa:

$$v = k_i [N]$$

La velocidad también puede expresarse en términos de la aparición de la enzima desnaturalizada en el tiempo:

$$d[D]/dt = k_i[N]$$

Esto también puede expresarse en función a la enzima nativa:

$$-d[N]/dt = k_i[N]$$

El signo menos hace referencia a que la concentración de la enzima nativa disminuye a medida que esta se desnaturaliza.

Despejando la ecuación anterior obtenemos:

$$-d[N]/[N] = k_i dt$$

Al integrar esta ecuación tenemos que:

$$\int (-d[N]/[N]) = k_i \int dt$$

Resolviendo esta ecuación entre los límites 0 y t :

$$-\ln(N_t/N_0) = k_i t$$

Pasamos el signo negativo para el otro lado de la ecuación:

$$\ln(N_t/N_0) = -k_i t$$

En este caso la concentración de la enzima inicial esta dada por la actividad enzimática en el $t = 0$ ya que la enzima nativa es la que tiene actividad y la concentración de la enzima nativa en cualquier tiempo t esta dado por la actividad calculada en ese tiempo.

Por lo tanto tenemos que:

$$\ln(\text{Act}_t/\text{Act}_0) = -k_i t$$

Para obtener el valor de k_i se graficó el tiempo contra $\ln(\text{Act}_t/\text{Act}_0)$, y la pendiente de esa gráfica equivale a $-k_i$.

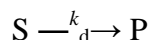
- **Hidrólisis del sustrato**

El bencil-4-nitrofenil carbonato, que es el sustrato a estudiar, se hidroliza espontáneamente en disolución acuosa a temperatura ambiente dando lugar a 4-nitrofenol, alcohol bencílico y un compuesto inestable que instantáneamente se transforma en dióxido de carbono (los mismos productos que se forman al ser hidrolizado por la lipasa). Por esto, en este trabajo antes de medir la cinética enzimática de la hidrólisis de este compuesto por la lipasa BplA-r, se midió la hidrólisis espontánea del sustrato en disolución acuosa en las condiciones experimentales. Se obtuvo una constante k de descomposición (k_d), la cual fue utilizada posteriormente para calcular los parámetros cinéticos, K_m y k_{cat} . Para esto se siguió el siguiente protocolo:

1. Preparar una solución con el sustrato, bencil-4-nitrofenil carbonato 100 μM con Amortiguador 5.
2. Poner 1000 μL de la solución anterior a una celda de espectrofotómetro.
3. Medir el cambio de absorbencia a 410 nm en el tiempo ($\text{Abs}_{410}/\text{min}$) contra un blanco (amortiguador 5) a 25°C durante 270 min. Se utilizó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian)
4. A partir de estos datos se calculó la producción del pNF, con el valor de la pendiente de una curva patrón de pNF ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$), de lo que se puede calcular el consumo del sustrato (bencil-4-nitrofenil carbonato) en el tiempo.

A partir de esto se calculó la constante de descomposición (k_d).

Suponemos que la hidrólisis el sustrato esta dada por:



A partir de esto siguiendo la misma lógica que se uso para calcular la constante de inactivación (k_i), tenemos que:

$$\text{Ln}(S_t/S_0) = -k_d t$$

La concentración del sustrato en un tiempo t esta dada por la concentración del sustrato inicial (100 μM) menos la concentración del producto en el tiempo t:

$$\text{Ln}(S_0 - P_t/S_0) = -k_d t$$

Para obtener el valor de k_d se graficó el tiempo contra $\text{Ln}(S_0 - P_t/S_0)$, la pendiente de esa gráfica equivale a $-k_d$.

- **Cinética de la hidrólisis del bencil-4-nitrofenil carbonato por la BpIA-r**

Un estudio preliminar realizado por nuestro grupo demostró que la BpIA-r es capaz de hidrolizar el DMC, formando metanol y CO₂. Desafortunadamente estos productos son difíciles de medir en nuestras condiciones experimentales y más aún hacer cinéticas a concentraciones bajas de sustrato y bajos niveles de conversión, como lo requiere un estudio de velocidades iniciales. Por esta razón decidimos utilizar un carbonato orgánico alternativo, que además fuese cromogénico para que su detección cuantitativa fuese muy simple. La BpIA-r es capaz de reconocer e hidrolizar el bencil 4-nitrofenil carbonato a 4-nitrofenol, alcohol bencílico y CO₂, a pesar de que este no es su sustrato natural. El bencil-4-nitrofenil carbonato cuenta con un enlace muy parecido al éster presente en los triacilglicéridos, que son el sustrato natural de las lipasas, lo que permite el reconocimiento y la hidrólisis de este compuesto.

Se determinaron los parámetros cinéticos de la hidrólisis de bencil-4-nitrofenol carbonato con la lipasa BpIA-r. Para la parte experimental se utilizó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian) para medir el cambio en la absorbencia a 410 nm de una solución con 100 μM de bencil-4-nitrofenil carbonato y con una concentración de 1 μM de lipasa BpIA-r durante 270 minutos a 25°C. Se hicieron 3 diferentes cinéticas respetando los datos de concentración tanto del sustrato como de la enzima. Utilizando los datos obtenidos de manera experimental las 3 cinéticas fueron analizadas utilizando el programa *Encora 1.2* [Willeman y col., 2000; Staathorf, 2001] el cual esta disponible libremente en Internet (<http://www.tnw.tudelft.nl>). Mediante este programa se obtuvieron los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , de esta hidrólisis. El programa se basa en la integración numérica de la ecuación diferencial de Michaelis-Menten-Henry, por el método de Runge-Kutta. Se

tomaron en cuenta la constante de inactivación enzimática y la constante de descomposición del sustrato, estas fueron ingresadas al programa el cual hace un balance de materia para cada paso de integración para poder incluir estas constantes. Se siguió el siguiente protocolo:

1. A una celda de espectrofotómetro con 1000 μL de la mezcla sustrato (bencil-4-nitrofenil carbonato 100 μM con Amortiguador 5), adicionar la enzima Bp1A-r (concentración final 1 μM).
2. Medir el cambio de absorbencia a 410 nm en el tiempo ($\text{Abs}_{410}/\text{min}$) contra un blanco (mezcla sustrato sin enzima) a 25°C por 270 min.
3. A partir de los datos anteriores calcular la producción de pNF y el consumo de sustrato (bencil-4-nitrofenil carbonato) en el tiempo con el valor de la pendiente de una curva patrón de pNF ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$).
4. Alimentar con los datos anteriores al programa *Encora 1.2* para el calculo de los valores de k_{cat} y K_{m} . Tomar en cuenta la constante de inactivación de la enzima y la constante de descomposición del sustrato.

Capítulo 7. Resultados y discusión

- **Producción de biomasa**

Para producir cantidad suficiente de la enzima estudiada, BplA-r, se sembró la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y se indujo la producción de la enzima usando el inductor IPTG. Se obtuvo 1 L de medio de cultivo de la bacteria recombinante. Después de esto se separó el contenido intracelular mediante sonicación y centrifugación, según la metodología descrita anteriormente.

- **Purificación de la proteína recombinante**

La fracción soluble, de un cultivo de un litro de la bacteria recombinante, se inyectó en una columna de afinidad para etiquetas de histidina en dos partes, para no sobrepasar la capacidad de la columna. Esta columna fue equilibrada previamente con una disolución amortiguadora (Amortiguador 2). Después de inyectar la muestra se lavó la columna pasando más de la disolución amortiguadora. La proteína unida en la matriz de afinidad fue eluída de la columna con un gradiente creciente de imidazol (de 20 a 500 mM). Debido a la capacidad de imidazol de absorber luz UV, se observa en los cromatogramas un aumento gradual en la absorbencia a 280 nm durante el gradiente de este compuesto. Los detalles de este procedimiento están en la metodología. El resultado obtenido fue que

a una concentración mayor a 300 mM de imidazol, la proteína unida a la matriz es eluída de la columna (Fig. 7.1).

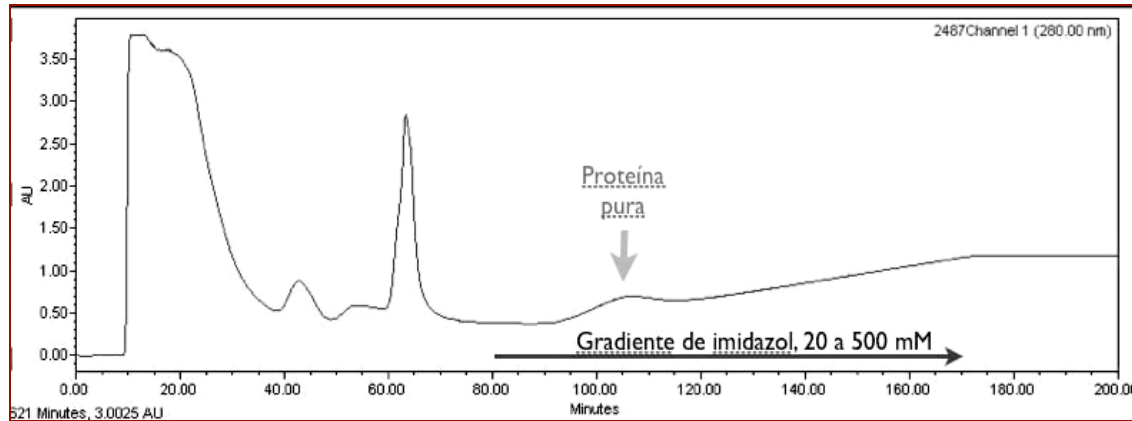


Figura 7.1. Cromatograma de la purificación de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 (BplA-r) en columna de afinidad.

Las fracciones de la elución con la proteína recombinante pura se colectaron y se dializaron contra un amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM pH 7.5 para eliminar el imidazol. Se tomaron muestras de algunas de estas fracciones y se realizó una prueba de electroforesis para verificar la pureza de éstas. La muestras ya dializadas se concentraron en glicerol puro para su conservación a -20°C .

- **Análisis de proteína purificada mediante electroforesis**

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar la pureza de la proteína recolectada en la columna de afinidad. Se comparó con una muestra de la proteína antes de purificar y con la muestra de la proteína pura ya concentrada. En el primer carril se cargo una muestra de la proteína antes de purificar y

en los carriles del 2-9 se pusieron las muestras recolectadas en la cromatografía de afinidad de diversas fracciones del proceso de elusión, que mayoritariamente correspondían a la proteína pura. En el último carril se puso la muestra de la enzima ya pura y concentrada (Fig. 7.2).

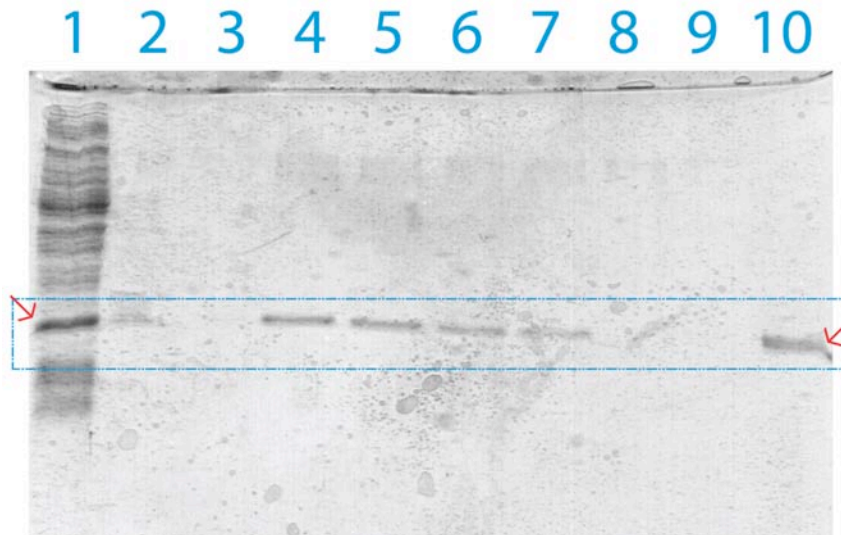


Figura 7.2. Electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones de la elusión de la proteína pura; a partir del minuto 115 hasta el minuto 160, se tomaron muestras en los minutos: 115, 120, 125, 130, 140, 145, 150 y 160, para comprobar la pureza de la proteína obtenida. El carril 10 corresponde a la proteína pura ya concentrada. Se cargaron 5 μ L de muestra por carril.

En la figura 7.2 podemos ver que en el carril 1 que corresponde a la muestra antes de ser purificada existen muchas bandas que corresponden a todas las proteínas intracelulares de *E. coli*, sin embargo se ve mas claramente la banda señalada que corresponde a la lipasa BplA-r. En los siguientes carriles, que corresponden a algunas de las fracciones de la proteína purificada, se ve claramente la misma banda que sobresale en la primera columna, que corresponde a la proteína de interés. El ultimo carril corresponde a la

enzima purificada y concentrada. Podemos entonces decir que contamos con una proteína electroforéticamente pura.

- **Medición de actividad**

Se midió la actividad tanto de la enzima purificada y concentrada en glicerol, como del extracto enzimático antes de purificar. Se obtuvieron los datos de la actividad específica, actividad volumétrica y actividad absoluta, de la manera que se indicó en el método.

Muestra	Volumen (mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad absoluta (U)
Enzima antes de purificar	75.0	2.57	2303.30	5919.49	443961.75 (100%)
Enzima pura	16.4	1.55	4683.78	7254.24	118969.53 (26.8%)

* 1 U de actividad enzimática corresponde = 1 μ mol de producto/min.

Al calcular el rendimiento de la purificación basado en la actividad absoluta, tenemos que sólo conservamos el 26.8% de la actividad inicial. Este no es un resultado excelente, pero la enzima tiene la pureza adecuada para realizar los estudios cinéticos, sobre todo si consideramos que pretendemos medir una reacción promiscua.

- **Estabilidad de la enzima BplA-r en condiciones experimentales**

Se determinó la estabilidad enzimática en condiciones experimentales, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente, para obtener la constante de inactivación (k_i). En la figura 7.3 se observa el regráfico del logaritmo de la relación de actividades final e

inicial, en función del tiempo. La pendiente de este gráfico corresponde a $-k_i$, que es la constante de desactivación de la enzima en estas condiciones.

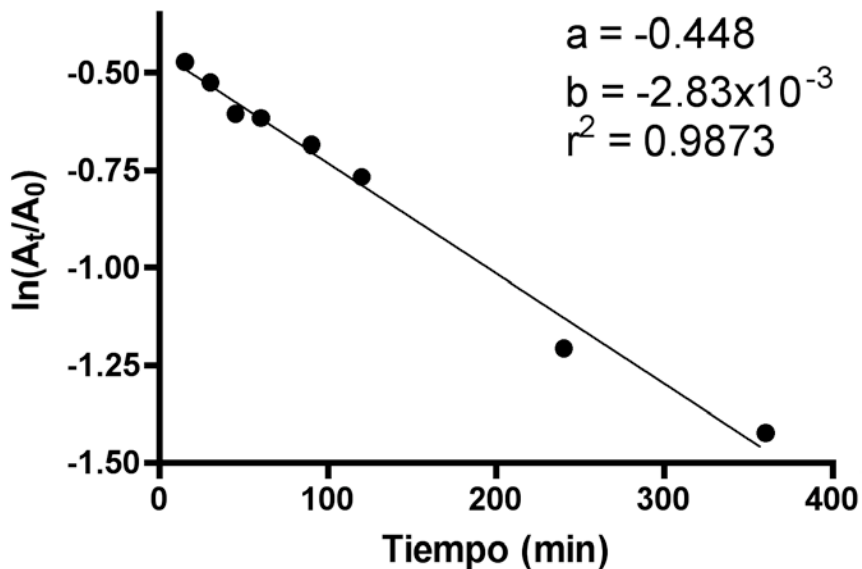


Figura 7.3. Regráfico del logaritmo de la relación de actividades final e inicial, en función del tiempo. La pendiente de este gráfico corresponde a $-k_i$.

La k_i calculada corresponde a $2.83 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Este valor es muy similar al obtenido previamente por Mora (2008) para la misma enzima en condiciones equivalentes. Este valor nos da una vida media de $\ln 2 / 2.83 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} = 244.9 \text{ min}$.

- **Hidrólisis del sustrato**

El sustrato bencil-4-nitrofenil carbonato se hidroliza de manera no enzimática en solución acuosa para formar 4-nitrofenol, alcohol bencílico y CO_2 , esta hidrólisis aunque ocurre de manera lenta tiene que ser considerada al calcular los parámetros cinéticos de la reacción enzimática de este sustrato. Por esto se siguieron los pasos señalados en la metodología

para determinar la constante de descomposición (k_d) en condiciones experimentales (Fig. 7.4).

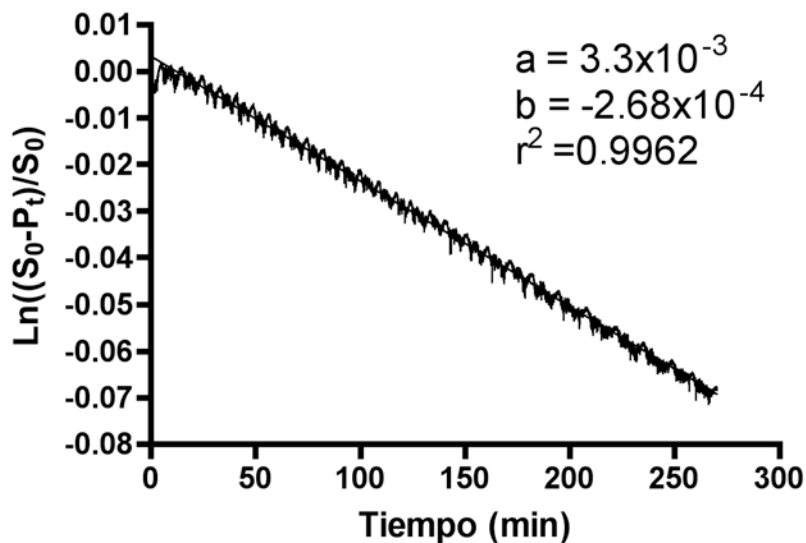


Figura 7.4. El logaritmo de la relación del cambio de sustrato a producto contra el tiempo. La pendiente de este gráfico corresponde a $-k_d$.

La k_d calculada a partir de la pendiente de la figura (7.4) corresponde a $2.68 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

- **Cinética de la hidrólisis del bencil-4-nitrofenil carbonato por la BpIA-r**

La lipasa BpIA-r es capaz de reconocer al bencil-4-nitrofenil carbonato como sustrato e hidrolizarlo a 4-nitrofenol, alcohol bencílico y CO_2 , a pesar de que este no es su sustrato natural. El bencil-4-nitrofenil carbonato (Fig. 7.5) cuenta con un enlace similar al éster de los triacilglicéridos o el pNFA (Fig 7.6), lo que permite el reconocimiento y la hidrólisis de este compuesto (Fig. 7.7).

Se determinaron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m de la hidrólisis de bencil-4-nitrofenil carbonato con la lipasa BpIA-r.

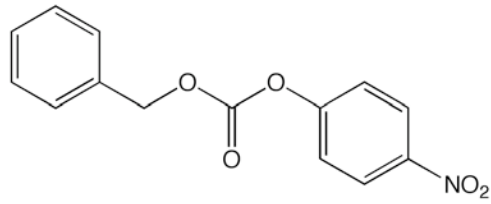


Figura 7.5. Estructural del bencil-4-nitrofenil carbonato.

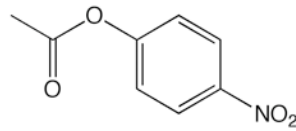


Figura 7.6. Estructura del 4-nitrofenil acetato.

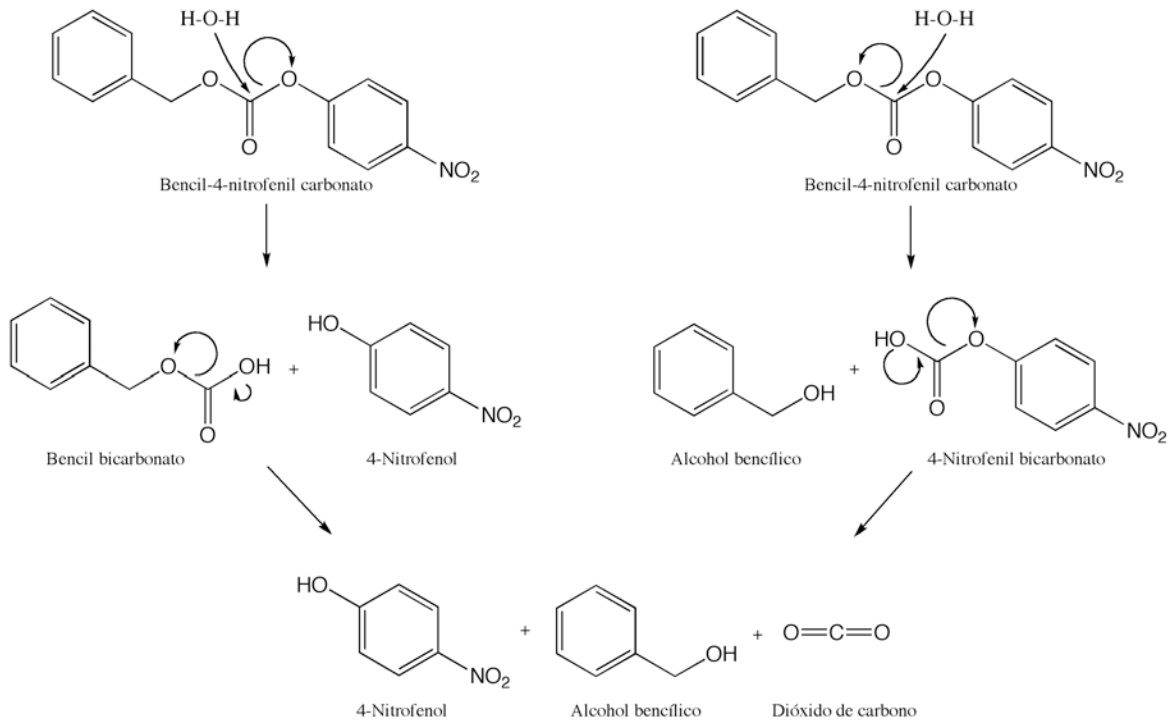


Figura 7.7. Hidrólisis de bencil-4-nitrofenil carbonato por la lipasa Bp1A-r. Existen dos vías posibles para esta reacción pero las dos llevan a los mismos productos, 4-nitrofenol, alcohol bencilico y dióxido de carbono.

Los datos de las curvas de reacción obtenidas en las tres cinéticas realizadas se ajustaron con el programa *Encora 1.2*. En la figura 7.8 se muestra un ejemplo de uno de los ajustes que hizo el programa a la reacción de hidrólisis de la lipasa. El programa toma en cuenta un modelo con un solo sustrato (S) y un solo producto (P), aunque en realidad hay una molécula de agua que participa en la hidrólisis y los productos finales son tres; 4-nitrofenol, que es el producto detectado por el método experimental, alcohol bencílico y CO₂. Cabe destacar que la formación de CO₂ no es una reacción catalizada por la enzima. También se considera que el paso de S a P es irreversible, debido a que la hidrólisis en medios acuosos es esencialmente irreversible. En el ajuste se consideraron también la inactivación enzimática en condiciones experimentales (k_i) y la hidrólisis no-enzimática del sustrato (k_d), constantes calculadas anteriormente, cuyos valores son $k_i = 2.83 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ y $k_d = 2.68 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ respectivamente. De esta manera se evitaron errores importantes como es el considerar que la concentración de la enzima es constante, este error se eliminó al considerar la k_i , mientras que la k_d nos ayuda a ajustar la concentración del sustrato en cada uno de los tiempos evaluados.

De esta manera se obtuvieron las siguientes constantes cinéticas: $k_{\text{cat}} = 7.1 \text{ min}^{-1}$ y $K_m = 0.178 \text{ mM}$. A partir de éstas se pudo evaluar la eficiencia catalítica (especificidad) de la enzima con respecto al sustrato estudiado, $k_{\text{cat}}/K_m = 39.89 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

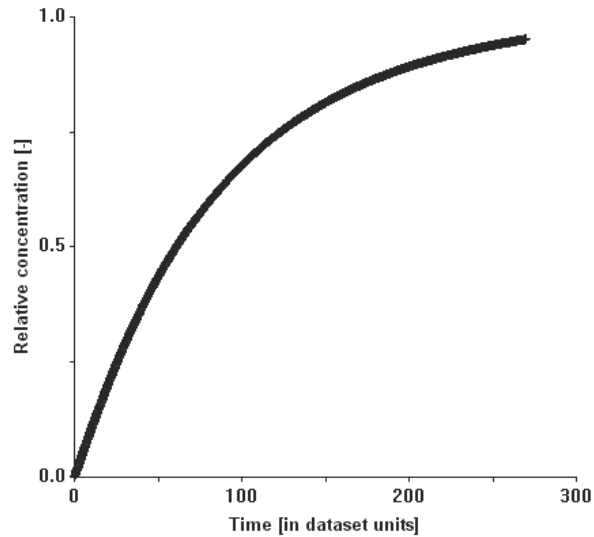


Figura 7.8. Ejemplo de un ajuste de los datos de una de las cinéticas de hidrólisis de bencil-4-nitrofenil carbonato catalizado por BplA-r.

Este es un valor bastante bajo de k_{cat}/K_m si lo comparamos con el valor obtenido por Mora (2008) en las mismas condiciones de temperatura pero utilizando un sustrato muy diferente (pNFA), que fue igual a $127.53 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ($k_{cat} = 51.1 \text{ min}^{-1}$, $K_m = 0.401 \text{ mM}$). La diferencia entre estos dos valores es comprensible debido a la diferencia estructural entre los sustratos (Figs. 7.5 y 7.6), el pNFA utilizado por Mora es un éster, por lo tanto es un sustrato típico de esta enzima, mientras que el sustrato utilizado en este trabajo, bencil-4-nitrofenil carbonato, es un compuesto que a pesar de tener estructura bastante parecida a un éster es definitivamente otro tipo de compuesto, razón por la cual la eficiencia con la cual esta enzima es capaz de reconocerlo e hidrolizarlo es considerablemente menor. La K_m para el bencil-4-nitrofenil carbonato resultó mucho menor que la misma para el pNFA, lo cual sugiere que la menor constante catalítica (k_{cat}) de la enzima no radica en una pobre unión del sustrato a la enzima, sino en la plasticidad del sitio activo para atacar al sustrato. También es preciso remarcar que es posible que la enzima catalice con mayor eficiencia uno de los dos caminos propuestos para la hidrólisis

del sustrato (Fig. 7.7), y que en realidad estamos midiendo un promedio de ambas reacciones. Por tal motivo es de interés hacer estudios en los que se mida también la aparición del alcohol bencílico.

Se demostró que la enzima BplA-r es capaz de realizar relaciones promiscuas en general y en particular es capaz de hidrolizar al bencil-4-nitrofenil carbonato, de lo cual podemos suponer que esta enzima sería capaz de hidrolizar cualquier tipo de carbonatos orgánicos solubles, incluyendo carbonatos con relevancia ecológica como es el DMC.

Comprobamos que esta enzima es capaz de hidrolizar DMC, estos resultados no son reportados por falta del equipo necesario para la cuantificación de metanol y CO₂. El DMC es hidrolizado por esta lipasa en metanol y CO₂. Se realizaron experimentos cualitativos en donde se pudo ver la producción de metanol de manera colorimétrica usando el método de oxidación del metanol con permanganato de potasio (NOM-142-SSA1-1995). Para esto se hace una mezcla de la enzima con el sustrato de interés, en este caso el DMC en un amortiguador (fosfatos 50 mM, pH = 7.5) y al cabo de la reacción se agrega una disolución de permanganato de potasio en ácido fosfórico (15 mL de ác. fosfórico aforados a 100 mL; 3 g de permanganato de potasio aforado con la disolución anterior a 100 mL). Esta solución se dejó reposar 30 min en hielo y después se decoloró con bisulfito de sodio en polvo, se agregaron ácido cromotrópico al 5% y ácido sulfúrico concentrado y se incubó a 70°C por 15 minutos. El permanganato de potasio reacciona con el metanol generando formaldehído, el cual reacciona con el ácido cromotrópico. El producto de esta reacción es de color morado. Para poder observar esto la solución primero es decolorada con bisulfito de sodio. Con este método se comprobó que la enzima BplA-r produce metanol a partir de DMC.

Tomando en cuenta todo lo dicho anteriormente se puede suponer que esta enzima puede hidrolizar carbonatos orgánicos en general, por lo tanto se puede asumir que es capaz de realizar también la reacción inversa, la síntesis de carbonatos. Aquí vale la pena señalar que en el mecanismo propuesto para la hidrólisis (Fig. 7.7), no importa la vía que siga la reacción, sólo la primera parte de la reacción es catalizada por la enzima. La segunda parte de la reacción, correspondiente a la desprotonación de los bicarbonatos obtenidos es espontánea. Se dice que la descomposición del ácido carbónico en CO_2 y H_2O es instantánea, aunque ciertamente su velocidad depende del pH y la temperatura. Un bicarbonato como los generados en nuestro ensayo, al pH del ensayo, rápidamente se debe desprotonar y promover su descomposición en CO_2 y el alcohol correspondiente. Desafortunadamente no tenemos información sobre la constante de velocidad de descomposición de estos bicarbonatos en las condiciones del ensayo, ni en otras, para compararlas con la k_{cat} de la enzima. Esto nos podría decir si la baja velocidad observada es un efecto del paso final de desprotonación y no del paso enzimático.

Finalmente cabe señalar que para hacer que la reacción funcione en el sentido de la síntesis sería necesario que tuviéramos una cantidad de bicarbonato orgánico apreciable para que la lipasa pudiera utilizarla como sustrato. Desafortunadamente la existencia de estos compuestos requiere de la reacción entre un alcohol y CO_2 a altas presiones y temperaturas, y aún en estas condiciones su concentración suele ser muy baja. No obstante esperamos que este trabajo sirva como base para investigaciones futuras respecto a la promiscuidad de esta enzima, sus mecanismos catalíticos y la síntesis enzimática de carbonatos orgánicos.

Capítulo 8. Conclusiones y perspectivas

8.1 CONCLUSIONES

Se expresó y purificó la enzima recombinante de *B. pumilus* GMA1. El rendimiento de la purificación fue de 26.8%. A pesar de no ser un rendimiento muy alto nos permitió trabajar con la enzima pura lo cual en este caso, que se trabajó con promiscuidad enzimática, es de gran importancia para asegurar que la reacción estudiada en efecto fuera realizada por la enzima BpLA-r y no por alguna otra enzima.

Se midió la estabilidad de la enzima en las condiciones del ensayo. Su constante de inactivación (k_i) es de $2.83 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Este valor indica que la enzima es estable y soporta bastante bien el detergente adicionado (1% Triton X100). Esto facilita el trabajo con esta enzima.

La constante de descomposición del bencil-4-nitrofenil carbonato (k_d) en las condiciones del ensayo es de $2.68 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. El sustrato es suficientemente estable para trabajar con él en nuestras condiciones.

La lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 presenta actividad de hidrolasa promiscua frente a los carbonatos orgánicos bencil-4-nitrofenil carbonato y dimetil carbonato.

La constante catalítica (k_{cat}) para la hidrólisis del bencil-4-nitrofenil carbonato es de 7.1 min^{-1} y la constante de Michaelis-Menten-Henry (K_m) es de 0.178 mM . Mientras que la k_{cat} resultó ser siete veces menor para el bencil-4-nitrofenil carbonato en relación al pNFA, la K_m por el carbonato resultó ser menos de la mitad que aquella por el éster. Estos datos confirman la hipótesis planteada y muestran la capacidad de esta lipasa de realizar reacciones promiscuas utilizando carbonatos orgánicos como sustrato con suficiente eficiencia.

Nuestros resultados sugieren que la hidrólisis de carbonatos por la lipasa BplA-r está limitada por la catálisis y no por la unión del carbonato orgánico a la enzima.

8.2 PERSPECTIVAS

Estudiar la vía de hidrólisis de los carbonatos midiendo simultáneamente la aparición de cada uno de los alcoholes liberados.

Estudiar la promiscuidad catalítica de la mutante Gly28Ser la cual presenta una k_{cat} , para el pNFA, cuatro veces mayor a la de la BplA-r.

Estudiar la unión del bencil-4-nitrofenil carbonato a la BplA-r por métodos computacionales (*docking*) entre otros como el intercambio isotópico, la estructura del complejo enzima sustrato, etc., para proponer cuál de las vías de hidrólisis propuestas es la predominante.

Referencias

1. Abbas-Alli, G. S. (1996). Organic Carbonates. Chem. Rev. 96(3): 951-76.
2. Abhinav, N., Atkins, W. M. (2008). A quantitative index of substrate promiscuity. Biochemistry 47:157-66.
3. Aresta, M., Dibenedetto, A., Tommasi, I. (2001). Developing innovating synthetic technologies of industrial relevance based on carbon dioxide as raw material. Energy & Fuels. 15:269-73.
4. Arpigny, J. L., Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J. 343:177-83.
5. Azumoto, A., Ishida, T. (1997). Chem. Abs. 74:65062u.
6. Boland, W., Fröbl, C., Lorenz, M. (1991). Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. Synthesis 1049-72.
7. Bornscheuer, U. T., Bessier, C., Srinivas, R., Krishna, S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends Biotechnol. 20:433-37.
8. Bronscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: clasification, properties and aplication in biocatalysis. FEMS Microbiol. Lett. 26:73-81.
9. Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. C., Lawson, D. M. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the estructure of a fangal lipase-inhibitor complex. Nature 351:491-94.
10. Bustos, I. (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo. Tesis, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
11. Bustos, I. (1998) .Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.
12. Coleman, M. H., Macrae, A. E. (1980). U.S. Patent No. 1,577,933.
13. Cook, D. L., Atkins, W. M. (1997). Enhanced detoxication due to distributive catalysis and toxic thresholds: a kinetic analysis. Biochemistry 36:10801-806.
14. Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. Curr. Opin. Chem. Biol. 7:256-72.
15. Crandal, J. W., et al 1987; US Patent 4,600,408.
16. Cvetovich, R. J., Nelly, D. H., DiMichele, L. M., Shuman, R. F., Grabowski, E. J. (1994). J. Org. Chem. 59:7704.
17. Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S. (1992). Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. Biochemistry 31:1532-41.
18. Drauz, K., Waldman, H. (1995). Enzyme catalysis in organic synthesis: A Comprehensive Handbook, Vols. 1, 2. New York: VCH Publ. 504 pp.
19. Ekroos, M., Sjongren, T. (2006). Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:13682-87.
20. Farrell, R. H., Hata, K., Wall, M. B. (1997). Solving pitch problems in pulp and paper processes by the use of enzymes or fungi. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 57:197-212.
21. Godfrey T., West, S. (1996). Industrial Enzymology. The Aplication of Enzymes in Industry. New York: Stockton. 512 pp. 2nd ed.

22. Grochulski, P, Li, Y., Schrag, J. D., Cygler, M. (1994). Two conformational status of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci.* 3:82-91.
23. Hage, W., Hallburcker, A., Mayer, A. (1993). *Chem. Soc.* 115, 8427.
24. Hjort, A., Carriere, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho) lipase. *Biochemistry* 32:4702-7.
25. Hyung, K. K., Hwa, J. C., Myung, H. K. (2002). Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochem. Biophys. Acta* 1583:205-12.
26. Imoura, S., y Matsushita, D., 1986; Japanese Patent Sho 61[1986]-207496.
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. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-51.
29. Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:29-63.
30. Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
31. Jaeger, K-E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotech.* 13:390-97.
32. Kanne, D. M., Iwamoto, R. Y., 1990; US Patent 4,904,279.
33. Khersonsky, O., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. (2006). Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10:498-508.
34. Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W. (1997). The crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas cepacia*, reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5:1571-84.
35. Klibanov, A. M. (1990). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.* 23:114-20.
36. Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216:155-160.
37. Li, C., Hassler, M., Bugg, T. D. (2008). Catalytic Promiscuity in the α/β -hydrolase superfamily: hydroxamic acid formation, C-C bond formation. Ester and thioester hydrolysis in the C-C hydrolase family. *Chem. Bio. Chem.* 9: 71-76.
38. Montiel, C., y Bustos, I., 2008. Trends and Challenges in Directed Evolution. *Chem. Biol.* 2: 50-59.
39. Mora, R. (2008). Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de Maestría, UNAM.
40. Murtha, T. P. US Patent 4,115,206. 1978.
41. Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Bebidas Alcohólicas. Especificaciones Sanitarias. Etiquetado Sanitario y Comercial.
42. Nthangeni, M. N., Patterton, H., van Tonder, A. Vergeer, W., Litthauer, D. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 28(7-8):705-12.

43. Pacheco, M. A., Marshall, C. L. (1997). Review of dimethyl carbonate (DMC) manufacture and its characteristics as a fuel additive. *Energy & Fuels*. 11:2-29.
44. Pandey, A., Benjamín, S., Zoclo, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Zoclo, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29:119-31.
45. Parrish, J. P., Salvatore, R. N., Jung, K. W. (2000). Perspectives on alkyl carbonates in organic synthesis. *Tetrahedrom*. 56:8207-237.
46. PREP Report, Chem. Systems Inc. 90S7, 1991.
47. Ransac, S., Blaauw, M., Leuisse, E. (1994). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a lipase from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 238: 857-59.
48. Ruiz, C., Blanco, A. Pastor, F. I., Diaz, P. (2002). Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:263-67.
49. Ruiz, N. K. (2007). Uso de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 en biocatálisis. Tesis, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
50. Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Wahl, S., Schmidt, R. D. (1997). *Bacillus thermocatenulatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. *Biochem. Soc. Trans.* 25:178-82.
51. Schrag J. D., Cygel, M. (1997). Lipases and α/β hidrolasa fold. *Methods. Enzymol.* 284:85-107.
52. Susanne, A. F., Eipper, A., Retz, T. M., Otte, N., Thiel, W. (2003). Directed evolution of enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatal. Biotransform.* 21: 67-73.
53. van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* 309:215-26.
54. Willeman, W. F., Hanefeld, U., Straathof, A. J. J. and Heijnen, J. J. (2000). Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase. *Enzyme Microb. Technol.* 27:423-33.
55. Wong De la Mora, P. (2001). Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción fermentativa y algunas propiedades. Tesis, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.