



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

---

---

Inmovilización de la lipasa de *Bacillus pumilus*  
GMA1 y actividad en disolventes orgánicos.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

MONTSERRAT T. BENÍTEZ MONTELONGO



MÉXICO, D.F.

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 asignado:**

Presidente: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero

Vocal: Prof. Francisco Ruiz Terán

Secretario: Prof. Ismael Bustos Jaimes

1<sup>er</sup> suplente: Prof. Jorge Aburto Anell

2<sup>o</sup> suplente: Prof. Sandra Paola Sánchez Rodríguez

**Lugar donde se desarrolló este trabajo:**

Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor: Ismael Bustos Jaimes

---

Sustentante: Montserrat T. Benítez Montelongo

---

Este trabajo contó con el apoyo de los  
proyectos CONACYT 53710 y PAPIIT IN212607

# Agradecimientos

**Dr. Ismael Bustos Jaimes:** Por las oportunidades únicas y maravillosas que me diste y lo que me hiciste aprender, todo ello ha resultado invaluable. Por tu confianza, por tu apoyo y por tu paciencia.

**Dra. Carmina Montiel Pacheco:** Por facilitarme el material SBA 15 y por todo tu apoyo con la obtención de cromatogramas.

**M. en C. Raúl Aguilar y Dr. Francisco Ruiz Terán:** Por sus comentarios y apoyo con la corrección de este escrito.

**Al Laboratorio de Ingeniería y Fisicoquímica de Proteínas:** Por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México:** Por hacerme crecer no solo dentro de sus salones, por hacerme una persona integral. Por dejarme ver la vida desde un pedestal más alto. Por todo lo que me ha dado.

**Ricardo Betanzos:** Por toda tu ayuda con las imágenes de este trabajo.

**Julieta Montelongo:** Por tus revisiones y comentarios en la redacción de este escrito.

**Natalia Benítez:** Por tu entusiasmo y ayuda con esto, y todo lo que viene después.

**Gabriel Benítez:** Por darme cada mañana las ganas de estar, por tu ejemplo y tu apoyo incondicional.

# Dedicatorias

**Papá y mamá:** ¿A quién si no a ustedes? Simplemente nada de lo que soy podría ser sin ustedes. Gracias por su apoyo incondicional, por su confianza, por su fortaleza pero sobre todas las cosas por su inmenso amor. Los amo profundamente.

**Tomás:** Desde que tú estás en él, mi mundo es un mejor lugar. Gracias por tu amor, tus consejos, por ser mi amigo y hacerme una mejor persona. Te amo.

**Natalia:** Ni siquiera se me ocurre como agradecerte tu apoyo, tu cariño y tu confianza. Te quiero como no te puedes imaginar.

**Ricardo:** Me encanta que una persona como tu ahora forme parte de mi vida. Te siento como un hermano, y te quiero como tal.

**Dr. Martín Iglesias:** Por que todo empezó gracias a usted. Por darme disciplina y seguridad. Por buscar siempre lo mejor para mí. Por ser mucho más que un profesor: por ser mi amigo.

**Familia Jujnovsky Orlandini:** Gracias por compartir tantos momentos maravillosos, y hacerme sentir como parte de ustedes. ¡Los quiero mucho!

**Diana y Juan Pablo:** Por que ustedes me han enseñado el verdadero significado de la amistad. Por que juntos hicimos los últimos años los más maravillosos.

**Paulina, Alejandra y Fermín:** Por ser mis hermanos durante todos estos años, por que ocupan un lugar muy grande en mi vida.

**Vicky, Paulina, Patricio y Luciana:** Por que han sido una lucecita en mi vida, por que los quiero infinitamente y me llenan de felicidad.

**Ana Benítez:** Te quiero y te admiro profundamente. Tu fortaleza y entereza son un ejemplo que voy a procurar seguir el resto de mi vida. Me llena de orgullo poder dedicarte ahora yo, una parte de mi trabajo.

**“Your real duty is to preserve your dream”.**

**Amedeo Modigliani**

**“Destiny is not a matter of chance; but a matter of choice. It is not a thing to be waited for, it is a thing to be achieved”.**

**William Jennings Bryan**



# Índice General

<b>Resumen</b>	1
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	2
<b>Capítulo 2. Objetivos</b>	4
<b>Capítulo 3. Antecedentes</b>	
3.1 Lipasas	5
3.1.1 Clasificación	8
3.1.2 Estructura	10
3.1.3 Mecanismo catalítico	11
3.1.4 Lipasas del género <i>Bacillus</i>	12
3.2 Lipasa de <i>B. pumilus</i> GMA1	13
3.2.1 Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de BplAr	15
3.3 Inmovilización de enzimas	16
3.3.1 Materiales mesoporosos	19
3.3.2 Síntesis	20
3.3.3 SBA-15	22
<b>Capítulo 4. Materiales y métodos</b>	
4.1 Esquema general de trabajo	24
4.2 Reactivos	25
4.3 Cepas bacterianas	26
4.4 Equipo	27
4.5 Obtención de BplAr a partir de células recombinantes de <i>E.coli</i>	27
4.6 Purificación de BplAr por afinidad	28

4.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida	29
4.8 Concentración de la proteína	29
4.9 Producción de SBA-15	29
4.10 Inmovilización de la proteína en SBA-15	30
4.11 Actividad de la enzima inmovilizada	30
4.12 Cuantificación de proteína	31
4.13 Reacciones de síntesis y alcoholisis en medio orgánico	31
4.14 Análisis cualitativo de las muestras	32
4.15 Análisis cuantitativo de las muestras	33
<b>Capítulo 5. Resultados y discusión</b>	
5.1 Obtención de la lipasa recombinante de <i>B. pumilus</i> GMA1	35
5.2 Purificación de la enzima	36
5.3 Electroforesis SDS-PAGE	37
5.4 Concentración de la proteína	37
5.5 Producción de SBA-15	38
5.6 Cuantificación y actividad de la enzima	38
5.7 Inmovilización en SBA-15	39
5.8 Estabilidad de la enzima inmovilizada	41
5.9 Reacciones de alcoholisis y síntesis en medio orgánico	42
5.9.1 Análisis cualitativo	42
5.9.2 Análisis cuantitativo	48
<b>Capítulo 6. Conclusiones y Perspectivas</b>	
6.1 Conclusiones	59
6.2 Perspectivas	60
<b>Referencias</b>	61

# Índice de Tablas

1. Clasificación de las lipasas bacterianas	9
2. Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de BplAr	16
3. Preparación de reacciones de síntesis en medio orgánico	32
4. Purificación de BplAr	38
5. Cantidad de proteína y actividad en la enzima inmovilizada	40
6. Análisis cromatográfico de las reacciones de síntesis en medio orgánico utilizando como sustrato ácido caproico	44
7. Análisis cromatográfico de las reacciones de síntesis en medio orgánico utilizando como sustrato ácido láurico	45
8. Análisis cromatográfico de las reacciones de alcoholisis en medio orgánico utilizando como sustrato vinil estearato	46
9. Áreas obtenidas a partir de los picos correspondientes al 1-feniletanol en la reacción de síntesis en medio orgánico, utilizando ácido caproico como sustrato	51
10. Áreas obtenidas a partir de los picos correspondientes al 1-feniletanol en la reacción de síntesis en medio orgánico, utilizando ácido láurico como sustrato	53
11. Áreas obtenidas a partir de los picos correspondientes al 1-feniletanol en la reacción de alcoholisis en medio orgánico, utilizando vinil estearato como sustrato	55
12. Resumen del desempeño de BplAr en relación a CalB en las reacciones estudiadas	57

# Índice de Figuras

1. Reacciones típicas de las lipasas	6
2. Estructura $\alpha/\beta$ hidrolasa	10
3. Mecanismo químico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas	12
4. <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 a 10,000x	14
5. Modelo estructural de BplA	15
6. Ruta general para la formación de materiales mesoporosos	21
7. Material mesoporoso SBA-15 (Santa Barbara Amorphous)	23
8. Cromatograma de la purificación de BplA por columna de afinidad (Ni).	36
9. Electroforesis SDS-PAGE	37
10. Estabilidad de la enzima inmovilizada	41
11. Cromatografía en capa fina	43
12. Cromatograma de la curva patrón de 1-feniletanol	49
13. Curva patrón de 1-feniletanol	50
14. Cromatogramas de la reacción de síntesis en medio orgánico con ácido caproico como sustrato	51
15. Concentración de alcohol en el medio de reacción, después del tiempo de incubación	52
16. Cromatogramas de la reacción de síntesis en medio orgánico con ácido láurico como sustrato	53
17. Concentración de alcohol en el medio de reacción, después del tiempo de incubación	54

18. Cromatogramas de la reacción de alcoholisis en medio orgánico con vinil estearato como sustrato	55
19. Concentración de alcohol en el medio de reacción, después del tiempo de incubación	56

## Abreviaturas usadas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactosido
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Aw	Actividad acuosa
BplA	Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
BplAr	Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 recombinante
CalB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
TeOS	Tetraetil ortosilicato
P123	Pluronic 123
FSM	Mesoporoso de hoja plegada
CCF	Cromatografía en capa fina
CGM	Cromatografía gases-masas
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sodio

# Resumen

Por años las lipasas han sido enzimas muy estudiadas debido a sus excelentes enantio y regioselectividades. Estas propiedades hacen que las lipasas sean la opción natural para la resolución de racematos y la hidrólisis selectiva de ésteres en química orgánica. Además de su capacidad hidrolítica, las lipasas llaman la atención debido a su habilidad de catalizar reacciones de esterificación, alcoholisis, aminólisis y tiólisis en medios no acuosos. En este trabajo se estudió el potencial catalítico de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1 (BplAr) en medios orgánicos. En su forma madura, BplA está constituida por 181 residuos de aminoácidos. Esta enzima es homóloga a otras lipasas de la sub-familia I.4, incluyendo a las lipasas de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. circulans*.

Para la utilización de BplAr en medios orgánicos se sintetizó un material mesoporoso compuesto por sílice (SBA-15), en el que la enzima recombinante pura fue inmovilizada. La enzima BplAr inmovilizada mostró una excelente estabilidad al almacenamiento. Los resultados muestran que BplAr es capaz de catalizar reacciones de síntesis y alcoholisis en medios orgánicos, al igual que se ha demostrado con otras enzimas lipolíticas.

# Capítulo 1. Introducción

Las lipasas catalizan la hidrólisis de los ésteres insolubles en agua y de los triglicéridos en la interfase entre un sustrato insoluble y el agua, produciendo ácidos grasos libres y glicerol. En ausencia de agua, estas enzimas son capaces de llevar a cabo reacciones de transesterificación y alcoholisis, así como de síntesis de ésteres a partir de ácidos grasos libres y alcoholes.

Debido a su importante papel en la naturaleza como catalizadores de la hidrólisis de triglicéridos (grasas y aceites), estas enzimas están presentes en mamíferos, plantas, hongos y bacterias. Su amplia distribución ha hecho posible su aislamiento de distintas fuentes. Además, con la llegada de la tecnología del ADN recombinante, ha sido posible clonar y expresar estas proteínas en grandes cantidades y a bajo costo. Por esta razón, y por su enorme potencial sintético, las lipasas se han convertido en los biocatalizadores ideales para la síntesis orgánica y la oleoquímica que se emplean en las industrias farmacéutica, de alimentos, cosmética, peletera, etc.

La producción de compuestos orgánicos enantiopuros es de vital importancia para las industrias química y farmacéutica. Una de las opciones más eficientes para la síntesis asimétrica de compuestos enantiopuros es el uso de biocatalizadores. Un gran número de microorganismos y las enzimas derivadas de ellos se han utilizado en la producción de compuestos ópticamente activos y los esfuerzos de encontrar nuevos biocatalizadores continúan. De igual manera, se han reportado

un gran número de biotransformaciones enantioselectivas de medicamentos o sus intermediarios utilizando lipasas comerciales.

Las lipasas han sido utilizadas en investigación y a nivel industrial con excelentes resultados, ya que los productos obtenidos por catálisis enzimática son generalmente más puros debido a la selectividad de las lipasas y a las condiciones suaves de reacción. Sin embargo, la separación de estas proteínas después de la reacción puede ser un paso que encarece el proceso y que generalmente no permite la reutilización de la enzima. Para evitar este problema se ha utilizado la inmovilización de estas proteínas. Se sabe que gracias a la inmovilización, las enzimas caras pueden reutilizarse y separarse de las mezclas de reacción mediante una operación simple. Además, la inmovilización suele mejorar la estabilidad de las mismas enzimas y en algunos casos, incluso, puede mejorar sus propiedades catalíticas. Se han reportado muchos métodos de inmovilización de lipasas, entre ellos unión covalente, atrapamiento físico y adsorción.

# Capítulo 2. Objetivos

## Objetivo general

- Estudiar el comportamiento catalítico de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1 (BplAr) inmovilizada en SBA-15.

## Objetivos específicos

- Expresar BplAr en células recombinantes de *E.coli* y purificarla.
- Sintetizar y caracterizar el material mesoporoso SBA-15.
- Inmovilizar la lipasa BplAr pura por adsorción en SBA-15.
- Estudiar el efecto de la inmovilización sobre la actividad y estabilidad de la enzima.
- Determinar el potencial catalítico de la forma inmovilizada de la enzima en reacciones de síntesis de ésteres directa y en alcoholisis de ésteres en medios orgánicos.

# Capítulo 3. Antecedentes

## 3.1 Lipasas

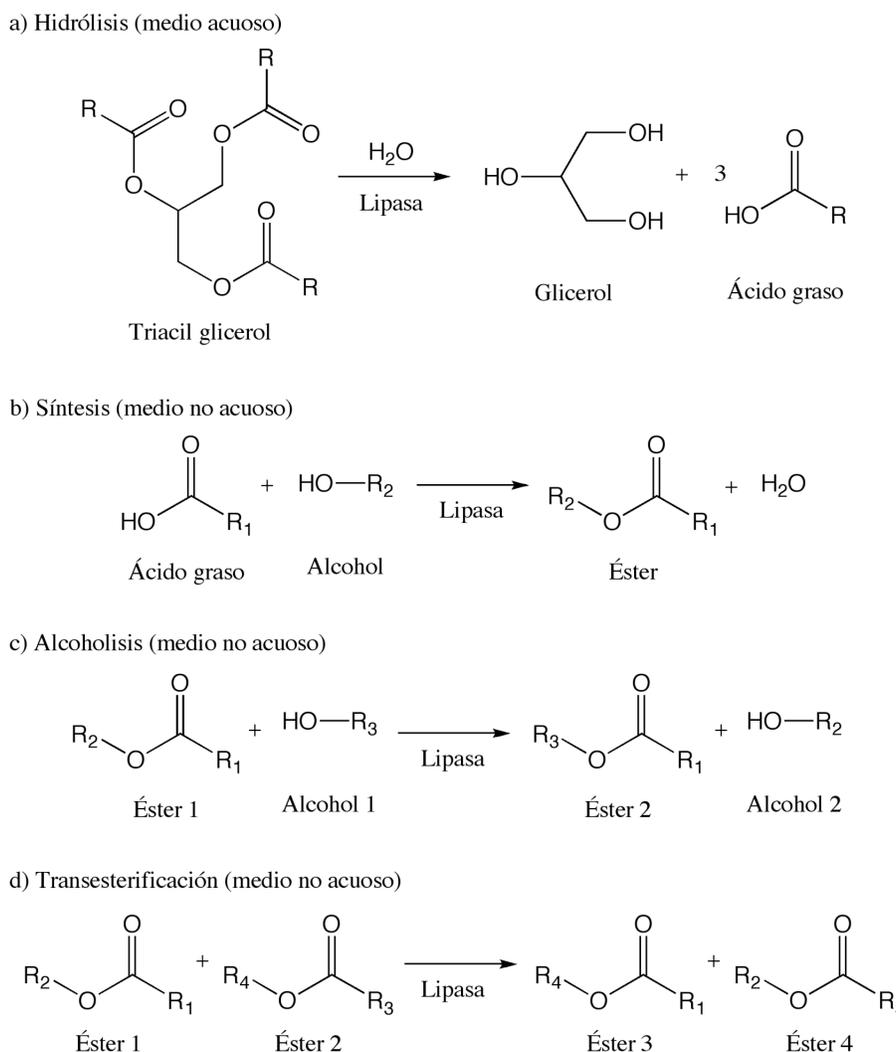
Las lipasas constituyen un grupo de enzimas con un gran potencial biotecnológico debido a su capacidad de catalizar reacciones de síntesis o hidrólisis, dependiendo del medio en el que se encuentren.

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3, triacilglicerol éster hidrolasas) son enzimas que en medio acuoso actúan sobre el enlace éster carboxílico de triglicéridos (generalmente de cadena larga, por su baja solubilidad en agua), liberando de esta manera glicerol y ácidos grasos [Jaeger, 1998]. Por otra parte, en medios con baja actividad acuosa realizan la reacción inversa, es decir, la síntesis de ésteres. Además de la síntesis directa de ésteres partiendo de alcoholes y ácidos grasos, también son capaces de realizar reacciones de alcoholisis y transesterificación (Figura 1).

La mayoría de las lipasas se clasifican en dos grupos:

- a) El grupo sn-1,3 regioespecíficas, que reaccionan con las posiciones externas del glicerol, por ejemplo las lipasas de *Aspergillus niger* y *Rhizopus delemar*, y las no regioespecíficas o al azar, que actúan en las tres posiciones del glicerol, como son las lipasas de *Geotrichum candidum* y *Cyclopium penicillium*.
  
- b) El grupo sn-2, lipasas que reaccionan con la posición central del glicerol, al cual pertenece un grupo reducido de lipasas; entre ellas se encuentra la lipasa

de *Candida antarctica* A, mostrando poca actividad con respecto a esa posición. Por otro lado, algunas lipasas muestran mayor selectividad por los triglicéridos comparada con los glicéridos parciales (mono y diglicéridos), así como preferencia por ciertos ácidos grasos [Lanser y col., 2001].



**FIGURA 1. Reacciones típicas de las lipasas.** a) Hidrólisis de triglicéridos en medio acuoso. b) Síntesis de ésteres a partir de un ácido graso y un alcohol en medios no acuosos. c) Alcoholisis en medio no acuoso. d) Transesterificación en medio no acuoso.

Además de la hidrólisis de lípidos, las lipasas pueden hidrolizar ésteres solubles en agua aunque, a menudo, con menor eficiencia. Los criterios de definición para las lipasas verdaderas, son dos [Jaeger y col., 1999]:

- a) Existencia de activación interfacial.
- b) La presencia de una “tapa” que cubre el sitio catalítico de la enzima.

Ambos fenómenos suelen estar asociados. Desde los primeros estudios de la cinética de las reacciones lipolíticas catalizadas por enzimas se observó un dramático incremento de la actividad catalítica cuando las lipasas se encuentran en una interfase lípido-agua. Gracias a las estructuras tridimensionales de las lipasas se ha podido entender este fenómeno: el sitio catalítico de las lipasas está cubierto por una cadena superficial que consiste en una hélice corta de naturaleza anfipática, o bien dos hélices o una región de horquilla que cubre el sitio activo, llamada "tapa" o "cubierta". Fuera de la interfase lípido-agua esta tapa se encuentra cubriendo el sitio activo, dando la forma “cerrada” del sitio activo de la lipasa. Cuando la enzima se encuentra dentro de la interfase, en presencia de

sustancias hidrófobas, la tapa se aleja del sitio activo permitiendo que los residuos catalíticos puedan interaccionar con el sustrato y exponiendo una gran superficie hidrófoba de la proteína, la cual interactúa con la interfase. Sin embargo, actualmente se sabe que la presencia de la “tapa” en la estructura de las lipasas no necesariamente está relacionada directamente con la activación interfacial [Jaeger y col., 1998].

### **3.1.1 Clasificación**

Las lipasas bacterianas se clasifican en función de su homología tanto por pesos moleculares como por identidad de secuencia de aminoácidos [Jaeger y col., 1998]. Esta clasificación agrupa a 50 enzimas en 6 familias diferentes (Tabla 1). A la fecha se han reportado más secuencias de lipasas. No obstante esto, la clasificación original sigue siendo vigente ya que prácticamente todas las enzimas lipolíticas caben en dicha clasificación.

Las lipasas se han utilizado de forma exitosa en numerosas actividades. En 1995 se introdujeron dos lipasas bacterianas a detergentes con gran éxito y a partir de esa fecha las lipasas se han incorporado a las formulaciones de detergentes comerciales de manera común. En la industria de alimentos se utilizan para hidrólisis de grasas, síntesis de aromas, producción de emulsificantes, modificación de grasas y aceites, etcétera [Masse, 2001]. En química orgánica y en la industria farmacéutica son los biocatalizadores más utilizados, debido a sus altas regio y enantioselectividades [Rsool y col., 2005].

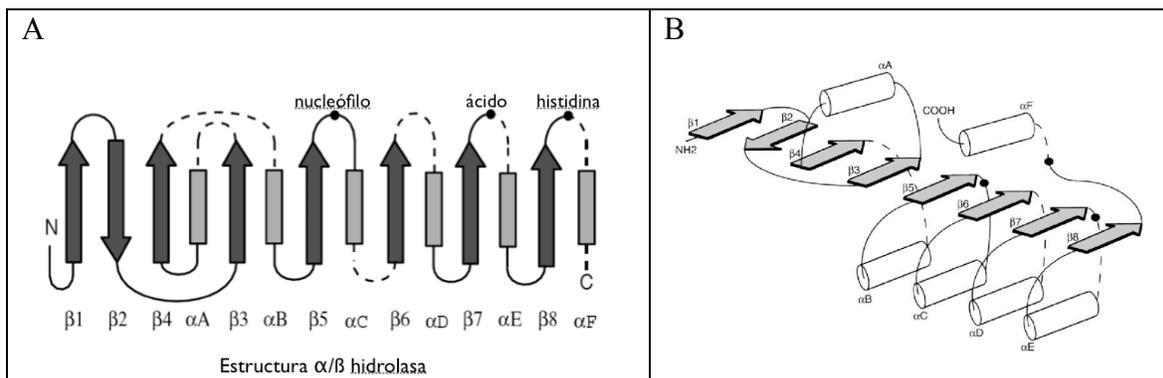
Existen en el mercado muchas preparaciones de lipasas. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos microorganismos junto con el desarrollo de la ingeniería de proteínas y la comprensión de su comportamiento catalítico, seguramente extenderá las posibilidades de utilizar estas enzimas de manera exitosa.

**TABLA 1. Clasificación de las lipasas bacterianas.** (Arpigny y Jaeger, 1999)

<b>Familia I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subfamilia I.1 y I.2, lipasas secretadas por la vía tipo II (para su secreción requieren de un transportador externo).</li> <li>• Subfamilia I.3, la ruta de secreción es del tipo I (se autotransportan).</li> <li>• Subfamilia I.4, son las lipasas más pequeñas (19 a 21 kD) conocidas hasta ahora. Tienen rangos de pH óptimo alcalinos y preferencia hacia los triacilglicéridos de cadena corta como sustratos (&lt;10 átomos de carbono en la cadena del acilo).</li> <li>• Subfamilia I.5, son lipasas con características de fosfolipasas.</li> <li>• Subfamilia I.6, comprende a lipasas de los géneros <i>Propionibacterium</i> y <i>Streptomyces</i>.</li> </ul>
<b>Familia II</b>	Lipasas con funciones desconocidas.
<b>Familia III</b>	Comprende las lipasas extracelulares de <i>Streptomyces</i> spp. y las cepas psicrófilas de <i>Moraxella</i> sp. El aspartato catalítico de estas enzimas se encuentra en una posición no equivalente respecto a las lipasas de las demás familias.
<b>Familia IV</b>	Lipasas adaptadas al frío que muestran similitud con las lipasas de mamíferos sensibles a hormonas (LSH). Las proteínas de este grupo presentan gran actividad a temperaturas bajas (menos de 15°C).
<b>Familia V</b>	Estas lipasas, igual que las enzimas sensibles a hormonas, se encuentran en bacterias mesófilas como <i>Pseudomonas oleovorans</i> , <i>Haemophilus influenza</i> o <i>Acetobacter pasteurianus</i> . También están en organismos que se adaptan al frío ( <i>Moraxella</i> sp., <i>Psy. immobilis</i> ) y al calor ( <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ). Además, muestran similitudes estructurales con deshalogenasas, haloperoxidasas y epóxido hidrolasas.
<b>Familia VI</b>	Incluye esterases que han sido parcialmente identificadas de las secuencias del genoma. Estas esterases son pequeñas proteínas localizadas en el citoplasma bacteriano con similitud a las lipofosfolipasas de mamíferos.

### 3.1.2 Estructura

Todas las lipasas cuya estructura tridimensional se conoce, pertenecen a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Estas enzimas comparten con las esterasas de serina, las tioesterasas y las bromoperoxidasas un patrón de plegamiento conformado por una hoja  $\beta$  central, formada a su vez por 8 diferentes hebras  $\beta$  conectadas por seis hélices  $\alpha$  [Schmidt-Dannert, 1999].



**FIGURA 2. Estructura  $\alpha/\beta$  hidrolasa.** a) topología de la estructura secundaria y b) plegamiento canónico. Se muestra con puntos negros la posición de los residuos catalíticos (Jaeger y col., 1999).

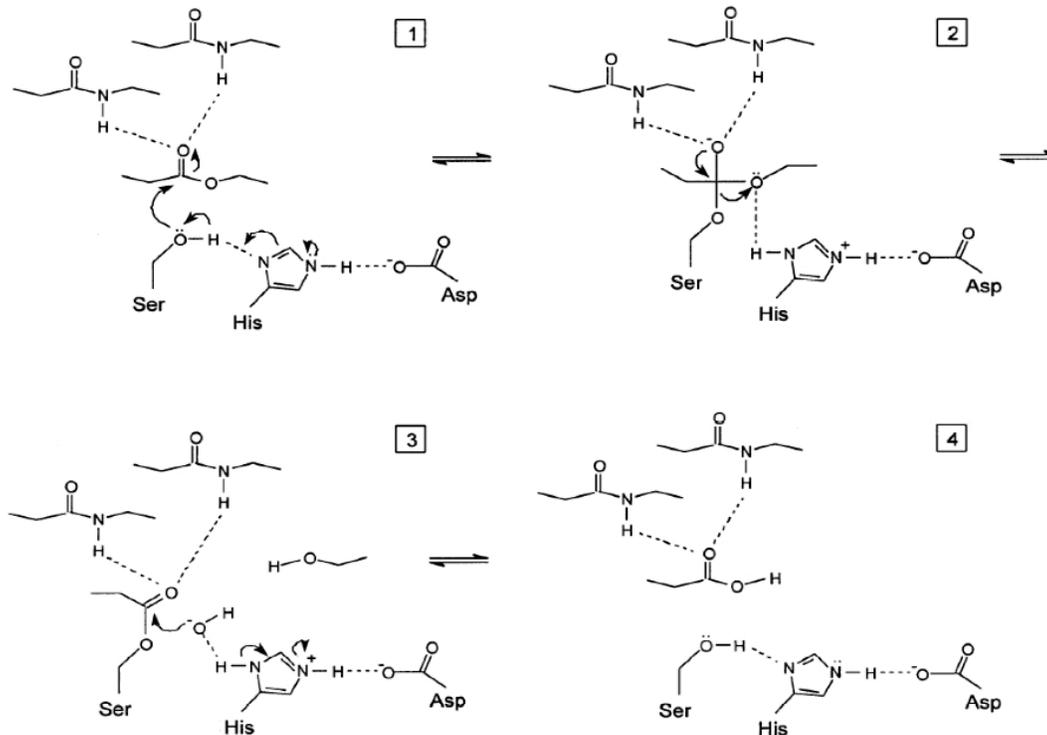
El sitio activo de las lipasas está formado por una triada catalítica conservada (serina, glutamato o aspartato e histidina), donde la serina, el aminoácido nucleófilo, se encuentra en el extremo carboxilo de la hebra  $\beta 5$ . Generalmente el residuo serina se encuentra dentro de un pentapéptido altamente conservado Gly-X1-Ser-X2-Gly, el cual, en las lipasas del género *Bacillus* pertenecientes a la subfamilia I.4, cambia por Ala-X1-Ser-X2-Gly [Jaeger y col., 1998 ; Derewenda y col., 1991].

### 3.1.3 Mecanismo catalítico

El grupo hidroxilo que pertenece al residuo de serina ataca el carbonilo del enlace éster del sustrato (situado en el extremo carboxilo de la hebra  $\beta 5$ ), produciendo la formación de un intermediario tetraédrico oxianiónico. Este oxianión es estabilizado mediante puentes de hidrógeno con los grupos amida del enlace peptídico de dos residuos de aminoácidos. El sitio en donde se estabiliza el oxianión es conocido como cavidad oxianiónica [Arpigny y Jaeger, 1999].

El grupo hidroxilo de la serina nucleofílica transfiere su protón a una histidina, lo cual incrementa el carácter nucleófilo de la primera. Esta transferencia es facilitada por la presencia del residuo ácido que orienta el anillo imidazol de la histidina y neutraliza parcialmente la carga generada en él. Posteriormente, el protón sustraído a la serina es donado al oxígeno del enlace éster para la formación de un alcohol.

La serina nucleofílica esterifica al componente ácido del sustrato formando un intermediario unido covalentemente a la enzima. Una molécula de agua hidroliza este intermediario (desacilación) tras su activación por la histidina catalítica, la cual sustrae un protón a la molécula de agua, formando así un ión  $\text{OH}^-$ , el cual a su vez ataca al carbono carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la serina. Este ataque genera un ácido que es liberado al medio mientras que la histidina dona el protón, que previamente sustrajo al agua, al oxígeno del residuo de serina recién liberado dejando a la enzima lista para un nuevo ciclo catalítico [Jaeger y col., 1998; Jaeger y col., 1999].



**FIGURA 3. Mecanismo químico de la hidrólisis de ésteres en el sitio activo de las lipasas.**

1) Activación del residuo nucleófilo de Ser y ataque nucleofílico al carbono carbonílico del enlace éster. 2) Formación del intermediario tetraédrico y reorganización electrónica previa a la liberación del motivo alcohólico del éster y la formación del intermediario acil-enzima. 3) Ataque por una molécula de agua activada al intermediario covalente acil-enzima y difusión del alcohol. 4) Hidrólisis del intermediario covalente y regeneración de la enzima (Arpigny y Jaeger, 1999).

**3.1.4 Lipasas del género *Bacillus***

Se han encontrado dos grupos de lipasas en el género *Bacillus*, las de alto peso molecular, pertenecientes a la subfamilia I.5, y las de bajo peso molecular que son parte de la subfamilia I.4. Dentro de esta última subfamilia, se encuentran las lipasas con menores pesos moleculares (19 a 20 kDa). Pertenecen a ella las

lipasas A y B de *Bacillus subtilis*, y las lipasas provenientes de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus circulans*.

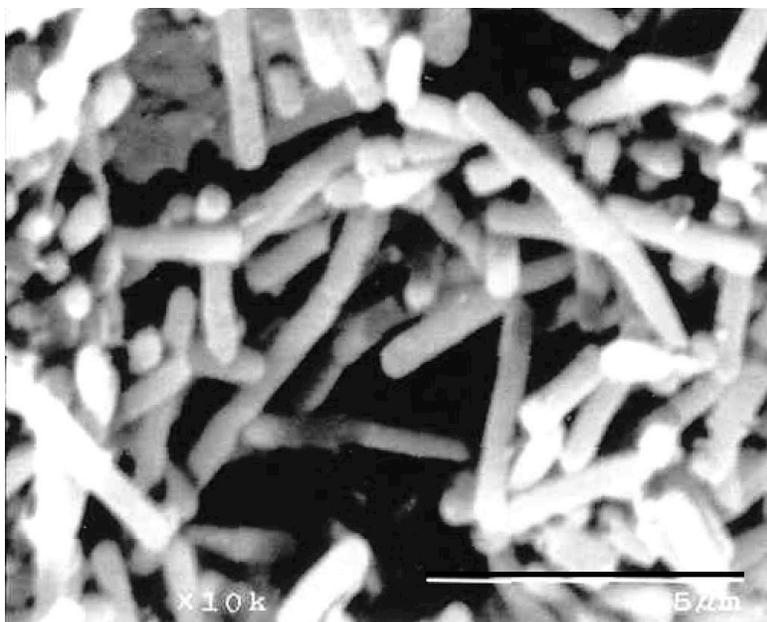
Dentro de esta subfamilia, la más estudiada y conocida es la lipasa A de *B. subtilis*. Esta lipasa es la única dentro de esta subfamilia que se ha cristalizado, elucidado su estructura tridimensional, y estudiado sus propiedades cinéticas. Aún cuando las demás lipasas de bajo peso molecular no han sido cristalizadas, muchas de ellas se han clonado en *Escherichia coli* y purificado, permitiendo estudiar su potencial catalítico [Harwood, 1992].

La lipasa A de *B. pumilus* es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis*, ambas comparten una identidad de secuencia cercana al 75%. Esta enorme identidad permite comparar a ambas lipasas en cuanto a estructura y propiedades catalíticas.

### **3.2 Lipasa de *B. pumilus* GMA1**

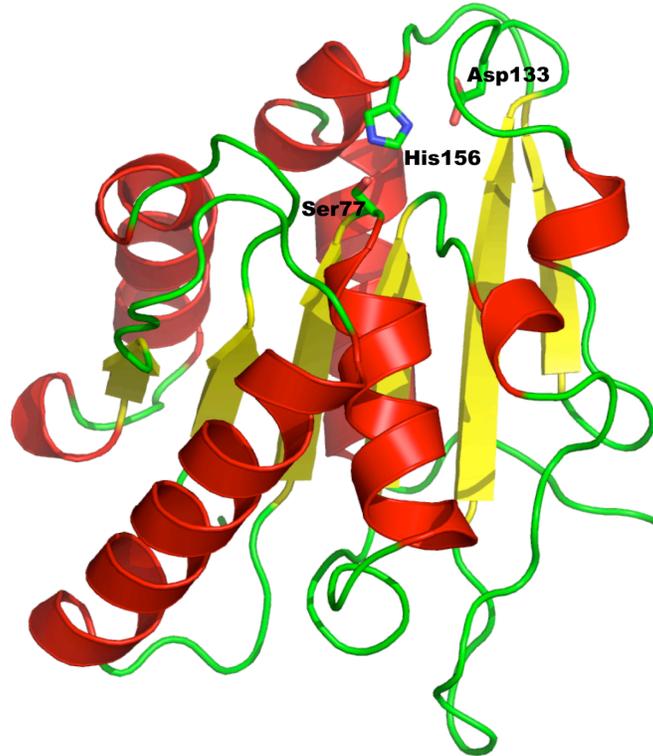
En 1995 se aisló de las aguas termales de Los Azufres, Michoacán, un microorganismo lipolítico. Éste fue identificado por métodos bioquímicos como *Bacillus pumilus* y la cepa se denominó GMA1 [Bustos, 1995].

Recientemente, se secuenció el ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) y su análisis confirmó que se trata de una cepa de *B. pumilus* (GenBank EU391538). Los reportes iniciales sobre el aislamiento del microorganismo señalan que éste produce una lipasa con características interesantes respecto a su pH (10.5) y temperatura óptima (50°C). Además, presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta y un peso molecular aproximado de 21 kDa [Bustos, 1998 ; Wong, 2001].



**FIGURA 4. *Bacillus pumilus* GMA1 a 10,000x.** La línea de escala representa 5  $\mu\text{m}$  (Wong, 2001).

Como se mencionó anteriormente, la lipasa A de *B. pumilus* GMA1 es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis* [Bustos, 1998]. Ambas lipasas poseen 181 residuos de aminoácidos en sus formas maduras y tienen un peso aproximado de 21 kDa. Por estas razones es factible suponer que ambas proteínas comparten el mismo plegamiento y las diferencias catalíticas que presentan deben estar relacionadas con los residuos de aminoácidos que no son idénticos. La lipasa A de *B. subtilis* presenta una estructura con el plegamiento clásico  $\alpha/\beta$  hidrolasa descrito para las lipasas, excepto por que sólo tiene 6 hebras  $\beta$  y 5 hélices  $\alpha$  (Figuras 2 y 5). En esta lipasa no se observa la presencia de tapa, por lo que el sitio activo se encuentra expuesto al disolvente. El sitio catalítico está conformado por la triada Ser77-Asp133-His156. La cavidad oxianiónica está formada por las amidas que corresponden a los residuos Ile12 y Met78.



**FIGURA 5. Modelo estructural de BpIA.** Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp133 e His156 (Mora, 2008).

### 3.2.1 Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de BpIAr

En el año 2008, Mora estudió los parámetros cinéticos y la estabilidad térmica de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 (BpIAr) y algunas de sus mutantes. Algunos de sus resultados se presentan en la Tabla 2.

Al aumentar la temperatura se observó una disminución considerable en la  $K_m$ , mientras que la  $k_{cat}$  no varió fuertemente, lo cual se traduce en un aumento considerable en la especificidad de la enzima hacia el sustrato debido al cambio de temperatura. Por otra parte, la estabilidad presentó una relación inversamente proporcional al aumento de temperatura, como era de esperarse.

**TABLA 2. Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de BplAr**

(Mora, 2008).

<i>Propiedades catalíticas</i>				<i>Estabilidad</i>	
T (°C)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	$k_{ie}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
20	726.48	86.28	0.119	0.000008	9120.4
25	400.67	51.10	0.127	0.000617	112.3
30	245.28	44.50	0.181	0.001525	45.5
35	97.56	45.51	0.466	0.002914	23.8
40	108.46	66.28	0.611	0.008981	7.7

Valores calculados para la hidrólisis de 4-nitrofenilacetato a pH 7.5 con 1% de Triton X100

 $k_{ie}$ : constante de desactivación térmica de la enzima $t_{1/2}$ : vida media de la enzima

### 3.3 Inmovilización de enzimas

Debido a las importantes aplicaciones biotecnológicas de las lipasas, ha sido necesario desarrollar métodos que permitan mejorar los procesos en los que estas enzimas son utilizadas. Para su uso rentable a nivel industrial se requiere que se encuentren en un estado que permita su fácil manejo y operación, y en algunos casos, su reutilización. Por otra parte, con la finalidad de mejorar las propiedades de estabilidad de las lipasas en condiciones extremas de temperatura y pH, presencia de disolventes orgánicos y detergentes, se han desarrollado diversos métodos físicos y químicos que permitan conferir a estas enzimas mayor resistencia a la desnaturalización. Los métodos más usados para este fin son la inmovilización por adsorción sobre soportes, la encapsulación con glicolípidos, la incorporación en polímeros y la modificación con polietilenglicol, entre otros [Coombs, 1992].

La inmovilización de enzimas es uno de estos métodos y se ha estudiado por más de 30 años. La definición de inmovilización incluye todo aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, organelos, células, etc., mediante su unión a un soporte [Barros y col.,1998]. A partir de la segunda mitad del siglo XX, se han buscado muchas formas de desarrollar enzimas inmovilizadas y por lo tanto insolubles en el medio de reacción para muchas aplicaciones distintas.

Entre algunos beneficios de utilizar enzimas inmovilizadas en lugar de las solubles están:

- a) Reducción de costos de producción mediante procesos de reutilización eficientes y controlables.
- b) Analitos estables para aplicaciones médicas y analíticas.
- c) Adsorbentes selectivos para purificación de proteínas y enzimas.
- d) Herramientas fundamentales para química de proteínas en fase sólida.
- e) Microdispositivos para producción controlada de fármacos.

Es imprescindible mencionar que, sin importar la forma en la que fueron preparadas, las enzimas inmovilizadas deben cumplir con dos funciones esenciales [Suan y col., 2004]:

- Las funciones no catalíticas, que incluyen la correcta y eficiente separación del medio de reacción y la reutilización del biocatalizador.
- Las funciones catalíticas, que comprenden la capacidad de la enzima de convertir los sustratos en los productos deseados en el tiempo requerido.

Existen cuatro categorías de interacción física entre la enzima y el soporte [Kourkoutas y col., 2004]:

- a) Unión sobre una superficie sólida.
- b) Atrapamiento en una matriz porosa.
- c) Agregación por floculación o con agentes entrecruzantes.
- d) Inclusión en membranas.

Después de la inmovilización, la estructura de las enzimas pierde flexibilidad, lo cual incide directamente en la disminución de la sensibilidad de la enzima al efecto negativo de la temperatura. Algunos estudios [Bastida y col., 1998; Fernández-Lafuente y col., 1998] sugieren que las lipasas son más activas en la interfase lípido-agua después de su inmovilización por adsorción. Por lo tanto, este procedimiento no sólo puede mejorar la estabilidad de la enzima y su fácil separación del medio de reacción, sino también la actividad enzimática.

Existen muchos estudios de inmovilización de lipasas con diferentes soportes, entre los que se encuentran: zeolita, Duolite, celulosa, Avicel, arcilla, caolín, dióxido de titanio, Sepharose, Sephadex, carbón activado, vidrios porosos y sílica gel [Zúñiga, 2004].

Existen materiales que naturalmente presentan poros, como el carbón activado y la zeolita. Esta última fue uno de los primeros materiales inorgánicos que se utilizó con el fin de inmovilizar enzimas. Estos soportes se han utilizado principalmente

para reconocer, discriminar y organizar moléculas con alta precisión. Sin embargo, la heterogeneidad y el tamaño de sus poros es una limitante para la inmovilización de enzimas, ya que la enzima inmovilizada queda en micro ambientes diferentes dependiendo del tamaño y profundidad de los poros.

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 ha sido inmovilizada en Accurel® MP1000 (polipropileno microporoso), obteniendo aumentos en la actividad lipolítica de hasta un 55% en relación a la enzima libre [Zúñiga, 2004]. En este trabajo decidimos inmovilizar la lipasa A de *B. pumilus* GMA1 recombinante (BplAr), en forma pura, en un material mesoporoso.

### **3.3.1 Materiales mesoporosos**

En 1990 Yanagisawa y colaboradores, reportaron la síntesis de materiales mesoporosos mediante la intercalación de cationes alquilmetilamonio, con cadenas de 12, 14, 16 o 18 carbonos, al silicato laminar kanemita. Al estudiar estos materiales por medio de difracción de rayos X, se determinó poco ordenamiento con respecto a los poros. El material se reportó como una estructura tridimensional en escala nanométrica y se le dio el nombre de FSM (material mesoporoso de hoja plegada).

Por otra parte, dos años después, se desarrolló una nueva clase de material por investigadores de la Corporación Mobil, quienes nombran M41S al material que tiene una estructura porosa ordenada a largo alcance, áreas específicas de 700 a 1000 m<sup>2</sup>/g y un volumen de poro de aproximadamente 1 mL/g [Beck y col., 1992].

Como parte de la familia M41S se encuentra el material MCM-41 (Mobil Composition of Matter), que presenta un arreglo hexagonal de poros con diámetro de entre 3 y 10 nm. Este material se ha utilizado para inmovilizar un gran número de enzimas, entre ellas la tripsina, el citocromo c y la HRP (peróxidasa de rábano blanco). Sin embargo, muchas enzimas de interés para la biotecnología, de un tamaño mayor al de los poros de este material, no podían ser inmovilizadas eficientemente en él.

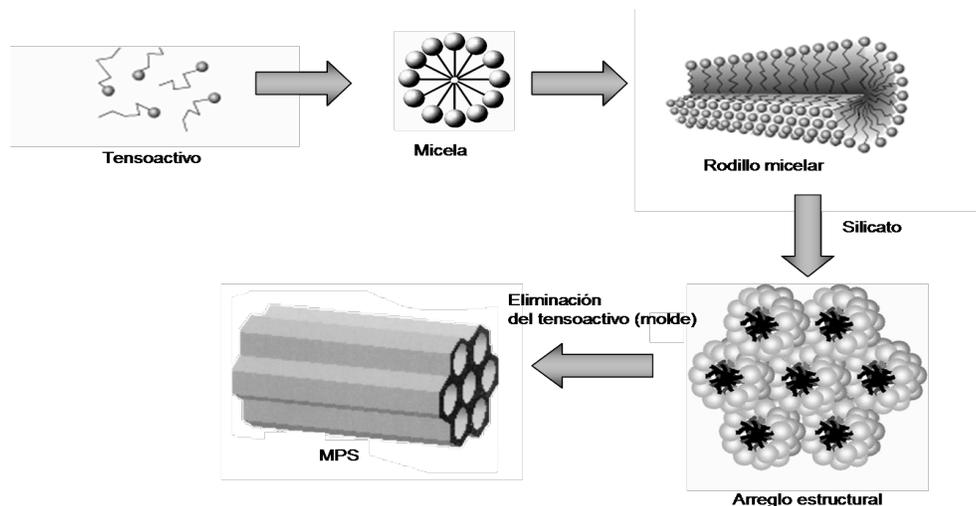
Zhao, en 1998, reporta una nueva familia de estructuras moleculares mesoporosas altamente ordenadas y con un tamaño considerablemente mayor al de MCM-41. Esta familia se conoce como Santa Barbara Amorphus (SBA). Se reportaron arreglos periódicos de poros ordenados con simetrías cúbicas, hexagonales y laminares, que se obtienen dependiendo del surfactante que se utilice.

### **3.3.2 Síntesis**

Para la formación de materiales mesoporosos es necesaria la presencia de un tensoactivo en solución, que es el agente formador de estructuras micelares. Los tensoactivos contienen un grupo hidrofílico en la cabeza y una cadena hidrofóbica, generalmente compuesta por más de diez átomos de carbono. Este carácter anfipático permite que se ensamblen cuando se encuentran en disolución.

Al momento de entrar en contacto con un producto químico inorgánico como fuente de sílice, se forma una red de sílice alrededor de las micelas de tensoactivo, la cual se solidifica por procesos térmicos para producir el sólido

mesoporoso (Figura 6). Los componentes inorgánicos, que a valores altos de pH se encuentran cargados negativamente, interactúan preferentemente con los grupos amonio de las cabezas de los tensoactivos, cargados positivamente, y condensan en un sólido formando una estructura continua.



**FIGURA 6. Ruta general para la formación de materiales mesoporosos.**

(Montiel, 2008)

Recientemente se han desarrollado materiales con poros de tamaño y profundidad homogéneos. Los materiales mesoporosos tienen poros en el rango de 20 a 300 Å de diámetro y tienen áreas superficiales enormes que proveen un gran número de sitios donde la adsorción puede ocurrir. En estos materiales el tamaño del poro y su profundidad pueden ser regulados durante el proceso de síntesis, por lo que el microambiente en que se encontrarán las enzimas inmovilizadas será relativamente homogéneo. Estos materiales están hechos con sílica, por lo que resultan insolubles tanto en medios acuosos como en medios orgánicos. Esta

propiedad hace de estos materiales una clase prometedora de soportes para la inmovilización de lipasas.

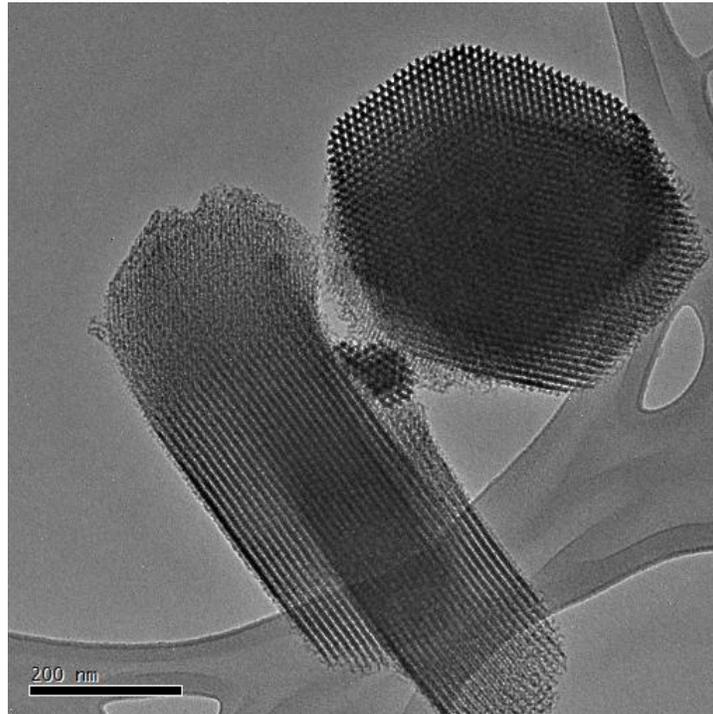
### **3.3.3 SBA-15**

Seis años después de la síntesis de las primeras nanopartículas mesoporosas de sílica, investigadores de la Universidad de California en Santa Barbara, liderados por Zhao, anunciaron la producción de nanopartículas de sílica con poros mucho más grandes que los sintetizados anteriormente [Zhao y col., 1998]. El material se nombró Santa Barbara Amorphus o SBA-15 y en un principio se planeó utilizarlo como malla molecular. Estas partículas tienen, al igual que MCM-41, arreglos hexagonales de los poros. Hoy, las nanopartículas de sílica tienen una cantidad importante de aplicaciones, entre las que se encuentran ejemplos médicos y biotecnológicos.

Dentro de los materiales mesoporosos conocidos y estudiados, el SBA-15 es una excelente opción para la inmovilización de lipasas debido a sus poros con paredes gruesas y tamaños uniformes cercanos a los 300 Å, así como a su alta estabilidad térmica [Montiel y col., 2007].

Una gran cantidad de proteínas, como el citocromo c han sido inmovilizadas en SBA-15 con alta eficiencia y actividad y sin limitaciones de difusión. Se ha sugerido que la alta actividad del citocromo c inmovilizado en SBA-15 se debe a la interacción de la proteína con la superficie del material mesoporoso. En este caso se propone que el ión Fe (III) cambia su *spin* de lento a rápido en la forma inmovilizada. Esto, según los autores, hace al citocromo c estable y activo por

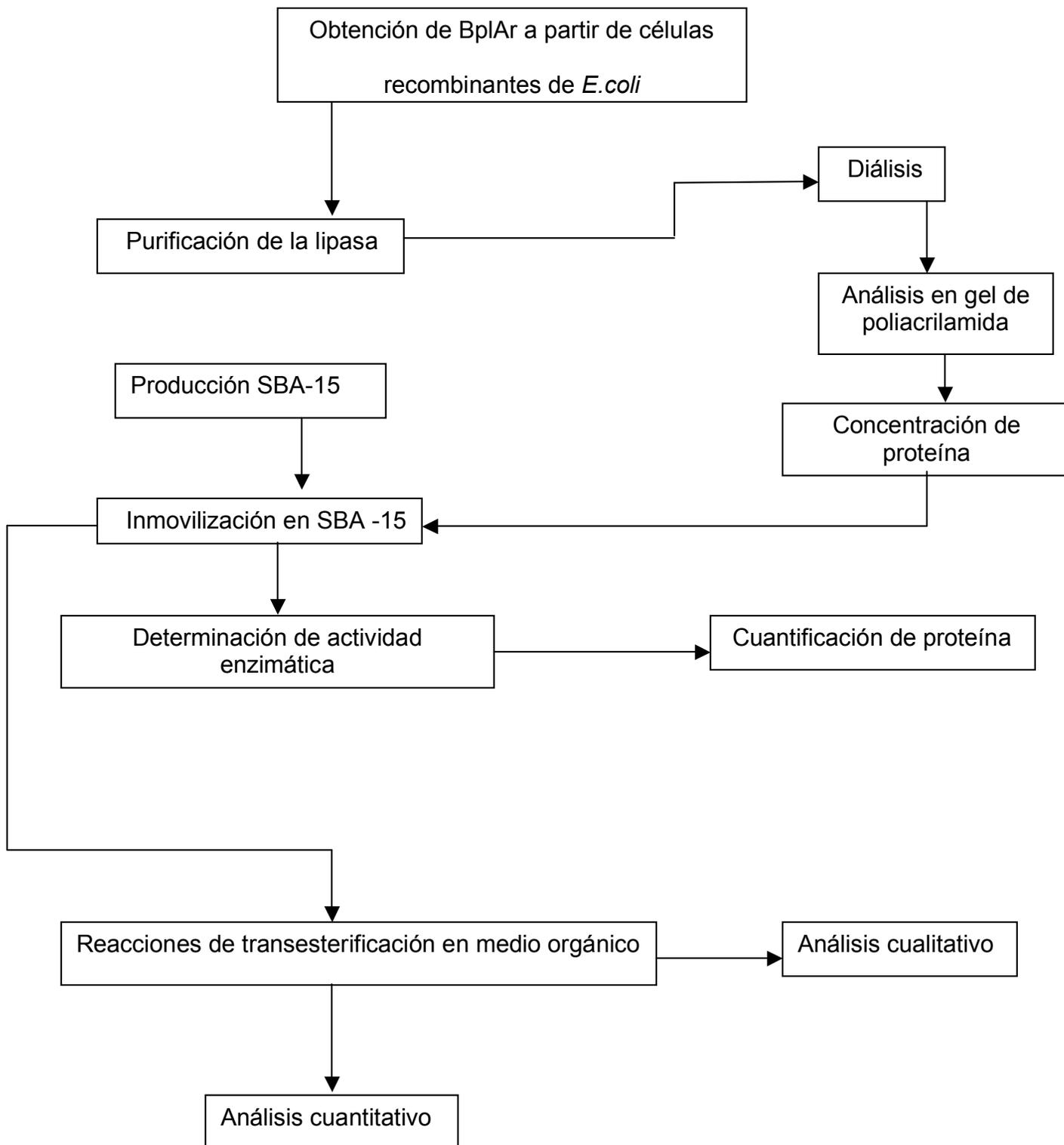
varios meses, incluso en condiciones normalmente desnaturalizantes [Montiel, 2007].



**FIGURA 7. Material mesoporoso SBA-15 (Santa Barbara Amorphous).**  
(Cortesía de la Dra. Carmina Montiel Pacheco, Instituto Mexicano del Petróleo).

# Capítulo 4. Materiales y métodos

## 4.1 Esquema general de trabajo



## 4.2 Reactivos

Acetato de Etilo	Sigma-Aldrich
Acetona	Sigma-Aldrich
Ácido benzoico	Sigma-Aldrich
Ácido caproico	Sigma-Aldrich
Ácido láurico	Sigma-Aldrich
Ácido oleico	Sigma-Aldrich
Ampicilina	Sigma-Aldrich
BCA (Ácido Bicinconínico)	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
Decanol	Merck
EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
1-feniletanol	Sigma-Aldrich
1-hexadecanol	Merck
Hexano	Merck
IPTG (Isopropil-b-D-tio-galactósido)	Sigma-Aldrich
Isooctano	Sigma-Aldrich
Malla molecular	Sigma-Aldrich
Medio LB (Luria Bertani)	Difco
Metanol	Merck
NaCl	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich

4-nitrofenilacetato	Sigma-Aldrich
4-nitrofenol	Sigma-Aldrich
CalB inmovilizada (Novozym 435)	NOVOZYM
Octadecanol	Merck
Octanol	Merck
Placas cromatográficas	Macherey-Nagel
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich
Pluronic 123	Sigma-Aldrich
tartrato dibásico de sodio dihidratado	Sigma-Aldrich
1-tetradecanol	Sigma-Aldrich
Tetraetilortosilicato	Sigma-Aldrich
Sílice	Sigma-Aldrich
Sulfato de cobre	Sigma-Aldrich
Vinil estearato	Sigma-Aldrich
Yodo	Sigma-Aldrich

### 4.3 Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo o descripción
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>

#### 4.4 Equipo

Equipo	Marca
pHmetro 713	Metrohm
Espectrofotómetro <i>Ultrospec</i> <sup>®</sup> 2000	Amersham-Pharmacia
Espectrofotómetro <i>CARY 400</i>	Varian
Sonicador <i>CV26</i>	Cole Parmer
Centrífuga <i>Avanti J-25I</i>	Beckman
Microcentrífuga <i>5417R</i>	Eppendorf
HPLC (Controlador <i>600S</i> , bomba <i>626</i> , detector dual de absorbancia <i>2487</i> , desgasificador en línea <i>AF</i> y colector de fracciones <i>III</i> )	Waters
Cromatógrafo de gases <i>C400</i>	PerkinElmer
Cromatógrafo de gases <i>8610C</i>	SRI

#### 4.5 Obtención de BpIAr a partir de células recombinantes de *E. coli*

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pETbpl, que contiene el gen que codifica para la BpIA, se sembró en una placa de medio LB con ampicilina (50 µg/mL) y se incubó a 37°C por 24 horas. Se transfirieron las colonias a medio LB líquido con ampicilina y se incubó a 37°C con agitación orbital de 200 r.p.m. durante toda la noche.

El cultivo fue utilizado para inocular 1 L de medio LB con ampicilina, que se incubó en las mismas condiciones, hasta alcanzar la fase exponencial (densidad óptica de 0.8).

Se agregó IPTG al medio de cultivo a una concentración final de 0.5 mM, y se continuó con la incubación por cuatro horas más en las mismas condiciones. Al transcurrir este tiempo, el medio se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.

La biomasa obtenida se rompió por ultrasonido a una amplitud de 30% y una potencia de 50 W. Posteriormente se centrifugó a 15,000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante.

#### **4.6 Purificación de la BpIAr por afinidad**

La purificación de la enzima recombinante se realizó en un equipo HPLC *Waters*, operado a través del programa *Empower*. La columna cromatográfica utilizada fue de afinidad por níquel (Protino<sup>®</sup> Ni-IDA, Macherey Nagel), metal afín a los residuos de histidina de la proteína recombinante. Durante la corrida cromatográfica se utilizó un flujo de 2 mL/min. Para acondicionar la columna se inyectaron 200 mL de agua destilada, 200 mL de NiSO<sub>4</sub> 10 mM y finalmente 200 mL del amortiguador de equilibrado (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7.5). Una vez inyectadas las soluciones mencionadas, se inyectó la fracción intracelular y se lavó la columna con 200 mL de amortiguador de equilibrado. Para la elusión de la proteína se hizo un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM con un amortiguador de elusión (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM, pH 7.5). Se recolectaron fracciones de 4 mL entre los 80 y los 120 minutos de la corrida, donde eluye la proteína pura y en concentraciones considerables [Mora, 2008]. Las fracciones recolectadas, se dializaron frente a un amortiguador de fosfato de potasio 20 mM a pH 7.5, realizando varios cambios, con el fin de

eliminar el imidazol presente en la muestra. Las fracciones dializadas se analizaron en gel de poliacrilamida para asegurar la pureza de la proteína obtenida.

#### **4.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se comprobó la pureza de las fracciones recolectadas empleando electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970). La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie R-250.

#### **4.8 Concentración de la proteína**

La proteína dializada se introdujo en una membrana para diálisis (corte de 12 kDa) y ésta se colocó sobre una cama de polietilenglicol. Se realizaron varios cambios de polietilenglicol hasta que el volumen se redujo aproximadamente a la tercera parte.

#### **4.9 Producción de SBA-15**

El SBA-15 se sintetizó usando Pluronic 123 como molde estructural de acuerdo al método reportado en la literatura [Zhao *et al.*, 1998]. Para este método, se disolvieron 4 g de P123 en 105 mL de agua destilada y 20 mL de HCl (37%). La solución se agitó por algunas horas y se adicionaron lentamente 11 mL de TeOS. La solución se incubó por 24 horas a 40°C y posteriormente a 100°C por otras 24

horas. El SBA-15 padre se filtró, se secó por 24 horas a 40°C y posteriormente se calcinó en presencia de aire a 550°C. La caracterización del material se llevó a cabo en el Instituto Mexicano del Petróleo con tamaño de poro promedio de 67Å (SBA-15/67) [ Montiel, 2007].

#### **4.10 Inmovilización de la proteína en SBA-15**

Las fracciones dializadas y concentradas se colocaron en contacto directo con 1 g de material mesoporoso SBA-15. La mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas a 4°C. Pasado este periodo, se centrifugó el material y se separó la fase acuosa para futuros experimentos. La fase sólida se lavó dos veces con 20 mL de amortiguador tris 5 mM pH 8, y dos veces más con 20 mL de acetona, centrifugando entre cada lavado. Se realizó un último lavado con 20 mL de hexano.

Después del último lavado, el material se secó a temperatura ambiente por 6 h para eliminar los restos de hexano. La enzima inmovilizada se almacenó a 4°C dentro de una cámara de humedad controlada ( $A_w = 0.15$ ).

#### **4.11 Actividad de la enzima inmovilizada**

La muestra se suspendió en amortiguador de fosfatos (fosfato de potasio 50 mM, 0.1% de Tritón X100) y se incubó a 30°C por un minuto. Se agregó como sustrato *p*-nitrofenil acetato 0.5 mM, y se agitó por 1 minuto. La reacción se detuvo en hielo y, en el caso de la determinación de la actividad de la enzima inmovilizada, se

centrifugó a 10,000 r.p.m. por 1 minuto a 4°C, separando el sobrenadante. Se midió un solo punto en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Se calculó la actividad de la enzima comparándola con a una curva de calibración de *p*-nitrofenol en el intervalo de 0 a 1 μM.

#### **4.12 Cuantificación de proteína**

Se midió la cantidad de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA). En el cual los iones Cu<sup>+</sup> 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 diluyeron 10 μL de la muestra en 90 μL de agua y se adicionó 1 mL de mezcla BCA-Cu<sup>2+</sup> (5g BCA, 8.55 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.8 g de tartrato dibásico de sodio dihidratado, 2 g NaOH, 4.73 g NaHCO<sub>3</sub> aforados a 500 mL con H<sub>2</sub>O). Se mezcló y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Se calculó la cantidad de proteína comparando con una curva de calibración con un estándar de albúmina bovina.

#### **4.13 Reacciones de síntesis y alcoholisis en medio orgánico**

Las reacciones se prepararon de acuerdo a la Tabla 3. Se utilizó siempre un blanco sin enzima tratado en las mismas condiciones, y a la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada (CalB) como referencia. En todos los casos se agregó malla molecular con el fin de evitar la presencia de agua en el medio.

**TABLA 3. Preparación de reacciones de síntesis en medio orgánico**

<b>Reactivos</b>	<b>Condiciones</b>
- Ácido caproico (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Hexano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	37°C x 48 horas, en agitación
- Ácido caproico (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Hexano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	50°C x 48 horas, en agitación
- Ácido láurico (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Hexano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	37°C x 48 horas, en agitación
- Ácido láurico (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Hexano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	50°C x 48 horas, en agitación
- Ácido caproico (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Isooctano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	37°C x 48 horas, en agitación
- Ácido caproico (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Isooctano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	50°C x 48 horas, en agitación
- Vinil estearato (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Isooctano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	37°C x 48 horas, en agitación
- Vinil estearato (0.27mmol) - 1-feniletanol ( 0.081mmol) - Isooctano (21.28 mmol) - Enzima (10 mg)	50°C x 48 horas, en agitación

#### **4.14 Análisis cualitativo de las muestras**

##### a) Cromatografía en capa fina

El análisis cualitativo de las reacciones realizadas se llevó a cabo por cromatografía en capa fina. La mezcla de eluyentes se adaptó a cada mezcla de reacción. Las placas cromatográficas se revelaron con luz ultravioleta, utilizando el

revelador incluido en las placas cromatográficas o en una cámara de sílice impregnada con  $I_2$ .

#### b) Cromatografía gases-masas

Con la finalidad de determinar la producción de los ésteres correspondientes a cada reacción, se llevó a cabo un análisis cromatográfico en un cromatógrafo de gases PerkinElmer C400, con un detector de espectrometría de masas. Se utilizó un flujo de 0.9 mL/min, un split de 50:1 y se utilizó una columna BDN01. La temperatura del puerto de inyección fue de 150°C, y la columna se sometió al siguiente ciclo de temperaturas: 15 minutos a 100°C; luego se elevó la temperatura a una velocidad de 10°C/min hasta 156°C y al alcanzar dicha temperatura, se elevó nuevamente la temperatura a una velocidad de 2°C/min hasta 220°C. A esta última temperatura se mantuvo la columna durante 25 minutos.

### **4.15 Análisis cuantitativo de las muestras**

#### a) Curva patrón de 1-feniletanol

Se realizó una curva patrón de 1-feniletanol, utilizando diferentes concentraciones conocidas del alcohol, siendo la más alta la concentración agregada a la mezcla de reacción al tiempo cero (0.081 mM).

Se utilizó un cromatógrafo SRI 8610C con una columna capilar AT-1000 de 30 m x 0.53 mm x 1  $\mu$ m (Grace Davison Discovery Sciences), la temperatura del puerto de inyección fue de 160°C, y la columna se sometió al siguiente ciclo de

temperaturas: 3 minutos a 120°C; luego se elevó la temperatura a una velocidad de 5°C/min hasta llegar a 180°C y se mantuvo por dos minutos mas, para después regresar a la temperatura inicial de 120°C.

#### b) Análisis de las muestras

Las mezclas de reacción se inyectaron en el cromatógrafo utilizando el mismo programa de temperatura que en el caso de la curva patrón.

Se realizó un análisis de las áreas bajo la curva de los picos correspondientes al alcohol, con el fin de determinar la cantidad de alcohol gastado en cada una de las reacciones.

# Capítulo 5. Resultados y discusión

## 5.1 Obtención de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1

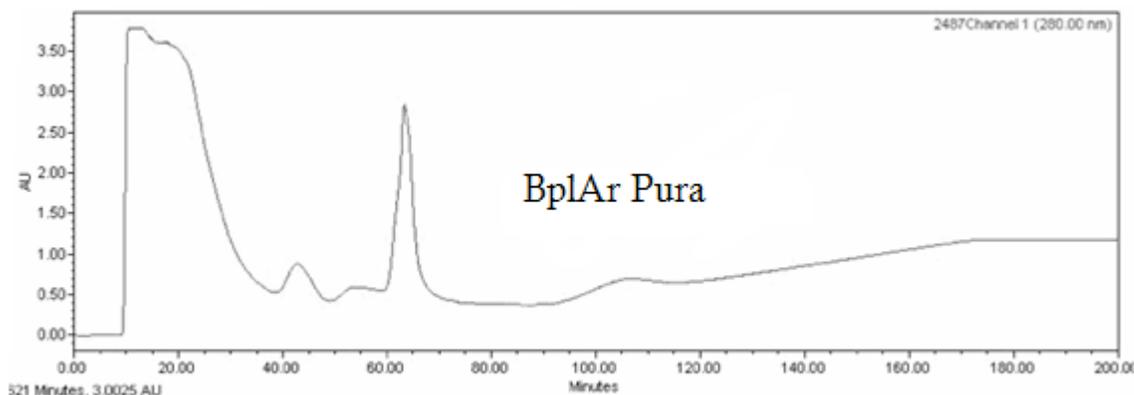
Células de *E. coli* BL21(DE3), previamente transformadas con un plásmido que contiene el gen que codifica para la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 fusionado a una etiqueta de His [Mora, 2008], se cultivaron en medio LB sólido con 50 µg/mL de ampicilina. La etiqueta de histidinas fusionada a la BpIA permite su posterior purificación por afinidad en un solo paso.

Las colonias obtenidas se transfirieron a 10 mL de caldo LB con ampicilina (50 µg/mL) y se incubaron con agitación de 200 r.p.m. a 37°C durante una noche. El cultivo anterior se utilizó para inocular 1 L del mismo medio de cultivo, que fue incubado en las mismas condiciones hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, es decir, una densidad óptica cercana a 0.8. Transcurrido este tiempo, la expresión de BpIAR se indujo mediante la adición de IPTG (0.5 mM) y su incubación durante 4 horas más. Posteriormente el cultivo se centrifugó 10 minutos a 10,000 r.p.m. y el paquete celular se resuspendió en amortiguador de sonicación. Las células se rompieron por sonicado a una amplitud de 30% y potencia de 50 W, en 10 pulsos de 15 segundos cada uno. El líquido resultante se centrifugó a 15,000 r.p.m. durante 15 minutos; se separaron los restos celulares y el sobrenadante se conservó a 4°C hasta su uso.

## 5.2 Purificación de la enzima

La purificación de la enzima se llevó a cabo de acuerdo al protocolo mencionado en el apartado de métodos. Al haber equilibrado la columna de afinidad para

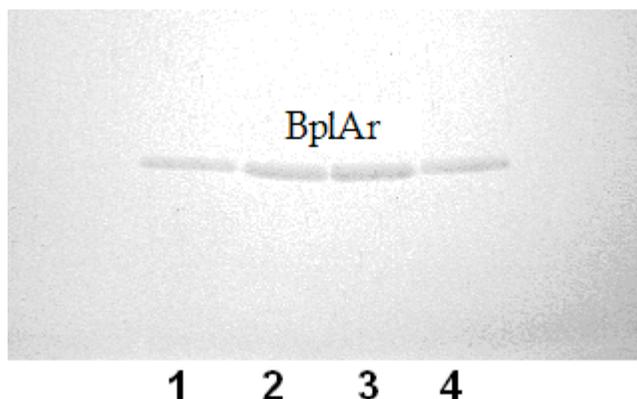
etiquetas de histidinas con solución amortiguadora, el extracto intracelular obtenido (10 mL) se inyectó a la columna. Una vez unida la proteína a la columna, la lipasa se eluyó con un gradiente de imidazol para lograr su separación de la matriz (Figura 8). Se recolectaron fracciones de 4 mL entre los 80 y los 120 minutos de la corrida. Para eliminar el imidazol presente en las muestras, las fracciones recolectadas fueron dializadas frente un amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.5, durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, el amortiguador se cambió dos veces más cada 6 horas.



**FIGURA 8. Cromatograma de la purificación de BplAr por columna de afinidad (Ni).** HPLC (Waters); columna 1.1 x 16.4 con resina Protino Ni-IDA (Macherey-Nagel); velocidad de flujo de 1 mL/min, a temperatura ambiente (~22°C); gradiente de elución, 20 a 500 mM de imidazol en 90 min.

### 5.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para confirmar la pureza de la proteína después de la diálisis, se realizó un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970), realizando la tinción con azul de Coomassie R-250 (Figura 9).



**FIGURA 9. Electroforesis SDS-PAGE.** Confirmación de la pureza de la proteína. **Carril 1:** Marcador de BpIAr previamente purificada (Mora, 2008). **Carriles 2,3 y 4:** BpIAr pura.

El análisis por electroforesis de las fracciones eluidas con el gradiente de imidazol mostró una sola banda en cada uno de los carriles, lo que permitió confirmar que los distintos pasos de la purificación habían sido exitosos, como lo demostró previamente Mora (2008).

### 5.4 Concentración de la proteína

La proteína pura se dializó contra un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 para eliminar el imidazol. Posteriormente estas membranas de diálisis fueron colocadas en una cama de polietilenglicol y mantenidas en refrigeración por una hora. Esto

con el fin de eliminar el exceso de agua presente. Una vez reducido el volumen a aproximadamente 10 mL (una tercera parte del volumen original), se recuperó el extracto.

### **5.5 Producción de SBA-15**

Siguiendo el protocolo especificado en la parte de métodos fue posible la obtención del material mesoporoso SBA-15, un polvo fino de color blanco, que fue almacenado durante el tiempo total de los experimentos en una cámara de humedad y temperaturas controladas ( $A_w = 0.15$ ,  $T = 4^\circ\text{C}$ ).

La caracterización del material se hizo en el Instituto Mexicano del Petróleo, encontrando que se trataba de un material ordenado en una estructura hexagonal, con una constante de rejilla (*lattice*) de 107.8 Å típica de la estructura de SBA-15 [Montiel, 2007].

### **5.6 Cuantificación y actividad de la enzima**

Según el protocolo mencionado en el capítulo correspondiente a los métodos, la cuantificación de proteína y la actividad fueron determinadas en las diferentes etapas de obtención e inmovilización de la enzima con el fin de determinar el rendimiento del proceso. En la Tabla 4 se presenta un resumen de estas determinaciones.

**TABLA 4. Purificación de BplAr**

Etapa	Vol.	Conc.	Proteína total	Actividad	Actividad específica	Actividad total	Rendimiento	Factor de purificación
	mL	mg/mL	mg	U/mL	U/mg	U	%	
Sobrenadante del sonicado	10	9.37	93.7	141730	15130	1417300	100	1
Proteína purificada dializada y concentrada	10	6.73	67.3	98940	14700	989400	69.8	1.4

La pérdida de proteína durante el proceso de purificación de la enzima fue relativamente poca, como lo indica el alto porcentaje de rendimiento en el proceso. La metodología indicada permite obtener valores altos de proteína aún después de someterla a varios pasos para la obtención de la misma.

### **5.7 Inmovilización en SBA-15**

La proteína concentrada (10 mL, 6.73 mg de proteína/mL) se colocó en contacto directo con 1 g de material mesoporoso SBA-15, se mantuvo en agitación por 24 horas a 4°C. Al transcurrir este tiempo, se centrifugó a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C con el fin de separar el sobrenadante de la fase sólida. La fase líquida se almacenó a 4°C con el fin de medir la eficiencia de la inmovilización. El precipitado se lavó y secó como se describe en el capítulo Materiales y métodos.

La determinación de la cantidad de proteína y de actividad de la enzima inmovilizada en el material mesoporoso se determinó de forma separada. Como se menciona en el apartado de métodos, el hecho de tener la proteína atrapada en un sólido, nos obligó a modificar el método de determinación de actividad, incluyendo una operación de centrifugación del extracto después de la reacción.

La cantidad de proteína unida al material mesoporoso se determinó por diferencia (cantidad de proteína pura, dializada y concentrada menos fase acuosa de la inmovilización). Mediante un balance de materia se asumió que el resto de proteína se encontraba unida al SBA-15. En la Tabla 4 se muestran los valores del rendimiento de la inmovilización de la enzima.

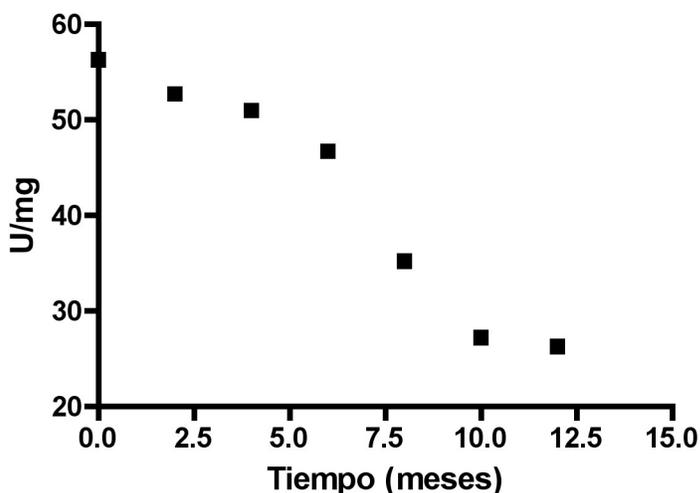
**TABLA 5. Cantidad de proteína y actividad en la enzima inmovilizada**

	<b>Cantidad</b>	<b>Actividad</b>	<b>Conc. Proteína</b>	<b>Proteína Total</b>	<b>Actividad total</b>
		U/g ó U/ml	mg/g ó mg/ml	Mg	U
<b>Enzima pura</b>	10 ml	98940	6.73	67.3	989400
<b>Material seco</b>	1 g	577000	34.9	34.9	577000
<b>Sobrenadante</b>	9 ml	36200	3.6	32.4	353000

La Tabla 5 muestra que se logró inmovilizar un 58.31% de la actividad inicial, mientras que en el sobrenadante quedó un 35.57% de ésta. Los datos anteriores indican que un 6.11% de la actividad inicial se perdió durante la inmovilización. Esta pérdida puede deberse a la desnaturalización de la enzima, a una enzima inmovilizada con sitios activos inaccesibles o a cambios estructurales de la enzima que redujeron su actividad de manera global.

## 5.8 Estabilidad de la enzima inmovilizada

Con el fin de determinar la estabilidad de la enzima inmovilizada con respecto al tiempo, la actividad de ésta se midió cada 2 meses. La pérdida de actividad en relación al tiempo transcurrido se presenta en la Figura 10.



**FIGURA 10. Estabilidad de la enzima inmovilizada**

La pérdida de actividad en la enzima inmovilizada no presenta un patrón determinado. Aún así, se puede observar que las unidades de actividad perdidas en los últimos meses fueron mayores. En un periodo de 14 meses, la enzima

perdió un 53.28% de su actividad inicial. Esto nos habla de una buena estabilidad de la enzima en las condiciones de almacenamiento antes mencionadas (4°C en una cámara de humedad controlada  $A_w = 0.15$ ).

## **5.9 Reacciones de alcoholisis y síntesis en medio orgánico.**

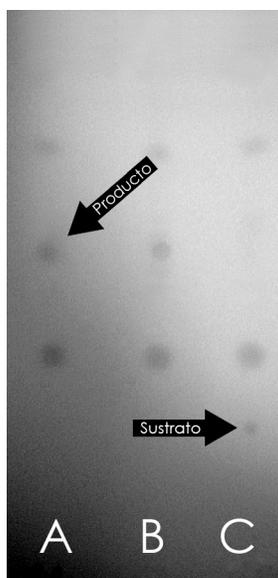
### **Preparación de las muestras**

Las muestras se prepararon con las concentraciones y condiciones que se indican en la Tabla 3 del apartado de Materiales y métodos. Al transcurrir las 48 h de incubación, las reacciones se conservaron a una temperatura de 4°C con el fin de frenar la acción enzimática hasta su análisis, unos minutos después.

#### **5.9.1 Análisis cualitativo**

a) Cromatografía en capa fina.

Después del tiempo de reacción, se analizó por cromatografía en capa fina cada una de las reacciones. Con el fin de lograr una separación óptima de los componentes de la reacción se utilizaron diferentes mezclas de acetato de etilo y hexano como eluyentes. Las placas se revelaron con luz ultravioleta, utilizando el revelador incluido, o en una cámara de sílice y yodo. En todos los casos se comparó la acción de BpIA inmovilizada con la de CalB, también inmovilizada (Novozym 435).



**FIGURA 11. Cromatografía en capa fina.** Reacción de ácido láurico + 1-feniletanol usando hexano como disolvente, a 37°C x 48 h. Eluyente: hexano: acetato de etilo (50:50), revelado en cámara de yodo y sílice. **A:** Reacción catalizada por BplA. **B:** Reacción catalizada por CalB. **C:** Control, ausencia de catalizador.

Mediante este método fue posible determinar la formación de productos en las reacciones de estudio gracias a la aparición o desaparición de eluatos.

#### b) Cromatografía gases-masas

Con el objetivo de determinar de forma cualitativa la presencia de los ésteres formados en cada reacción se realizó un análisis cromatográfico acoplado a un detector de gases/masas como se describe en el capítulo Materiales y métodos.

**Reacciones de síntesis en medio orgánico utilizando ácido caproico como sustrato**

**TABLA 6. Análisis cromatográfico de las reacciones de síntesis en medio orgánico utilizando como sustrato ácido caproico**

<b>Reactivos</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Resultados<sup>a</sup></b>
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Hexano - BplA	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 18 min
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Isooctano - BplA	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 18 min
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Hexano - BplA	50°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 18 min
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Isooctano - BplA	50°C en agitación por 48 horas	No hay pico de producto
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Hexano - CalB	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 18 min
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Isooctano - CalB	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 18 min
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Hexano - CalB	50°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 18 min
- Ácido caproico - 1-feniletanol - Isooctano - CalB	50°C en agitación por 48 horas	No hay pico de producto

a: Valores referidos al tiempo de elusión del producto de la reacción en estudio.

**Reacciones de síntesis en medio orgánico utilizando ácido láurico como sustrato**

**TABLA 7. Análisis cromatográfico de las reacciones de síntesis en medio orgánico utilizando como sustrato ácido láurico**

<b>Reactivos</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Resultados<sup>a</sup></b>
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Hexano - BplA	37°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Isooctano - BplA	37°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Hexano - BplA	50°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Isooctano - BplA	50°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Hexano - CalB	37°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Isooctano - CalB	37°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Hexano - CalB	50°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min
- Ácido láurico - 1-feniletanol - Isooctano - CalB	50°C en agitación por 48 horas.	Pico de producto en 42 min

a: Valores referidos al tiempo de elusión del producto de la reacción en estudio.

**Reacciones de alcoholisis en medio orgánico utilizando vinil estearato como sustrato**

**TABLA 8. Análisis cromatográfico de las reacciones de alcoholisis en medio orgánico utilizando como sustrato vinil estearato**

<b>Reactivos</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Resultados<sup>a</sup></b>
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Hexano - BplA	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Isooctano - BplA	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Hexano - BplA	50°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Isooctano - BplA	50°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Hexano - CalB	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Isooctano - CalB	37°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Hexano - CalB	50°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min
- Vinil estearato - 1-feniletanol - Isooctano - CalB	50°C en agitación por 48 horas	Pico de producto en 75 min

a: Valores referidos al tiempo de elusión del producto de la reacción en estudio.

En las Tablas 6,7 y 8 se presentan los resultados de las reacciones realizadas con ácido caproico, ácido láurico y vinil estearato respectivamente. En todos los casos se estudió la misma reacción catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* (CalB) inmovilizada (Novozym 435) y una reacción en ausencia de catalizador se utilizó como control. Los disolventes utilizados fueron hexano e isooctano, y las temperaturas 37 y 50°C.

Gracias a la detección de los picos a los que se hace referencia en las tablas anteriores se pudo definir, de una forma cualitativa, la presencia de los ésteres producidos correspondientes a cada una de las reacciones. De forma global, es posible decir que la enzima BplAr inmovilizada en el material mesoporoso SBA-15, en los medios orgánicos probados realiza las reacciones de síntesis y alcoholisis esperadas. Los productos esperados no fueron detectados en presencia de los dos catalizadores estudiados, en las reacciones incubadas a 50°C con isooctano como disolvente y ácido caproico como sustrato. Por esta razón se decidió estudiar cuantitativamente las reacciones en condiciones de temperatura y disolventes que permitieran la producción de los compuestos de interés, es decir, isooctano como disolvente y una temperatura de incubación de 37°C.

La presencia de los picos correspondientes a los productos esperados sugiere que la naturaleza de los disolventes utilizados no afecta la catálisis de las reacciones estudiadas de una forma significativa. En consecuencia, es factible estudiar más a fondo, en trabajos posteriores, el desempeño de la enzima en nuevos medios orgánicos y con condiciones de temperatura y tiempo específicos para cada uno de ellos.

La enzima BplAr utilizada en las condiciones de estudio del presente trabajo, es capaz de utilizar alcoholes secundarios con actividad óptica, como lo es el 1-feniletanol, lo que sugiere que esta enzima podría tener propiedades enantioselectivas interesantes, que pueden ser estudiadas más adelante, utilizando esta información como base.

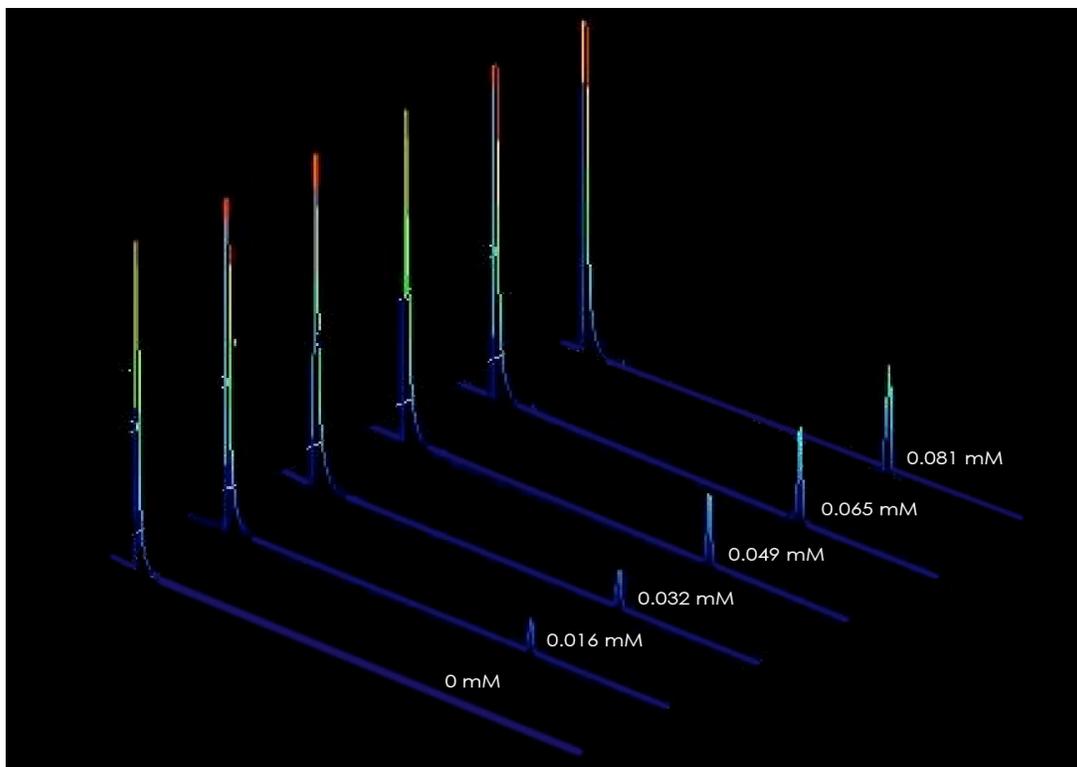
### **5.9.2 Análisis Cuantitativo**

Para poder hacer una comparación real entre las dos enzimas estudiadas, en todos los experimentos que se mencionan a continuación, se utilizaron 10 unidades de actividad enzimática de ambas lipasas, medidas para la hidrólisis del sustrato cromogénico *p*-nitrofenilacetato.

#### **a) Curva patrón de 1-feniletanol**

Debido a la ausencia de estándares de los ésteres formados, la estrategia para la cuantificación se basó en determinar la cantidad de alcohol presente en las muestras después del tiempo de reacción. Para hacer esto posible, la preparación de una curva patrón de 1-feniletanol fue necesaria.

Concentraciones conocidas del alcohol, teniendo como máximo aquella utilizada en las reacciones de síntesis y alcoholisis en el tiempo cero, fueron inyectadas en el cromatógrafo bajo el programa de temperaturas especificado en el capítulo Materiales y métodos.

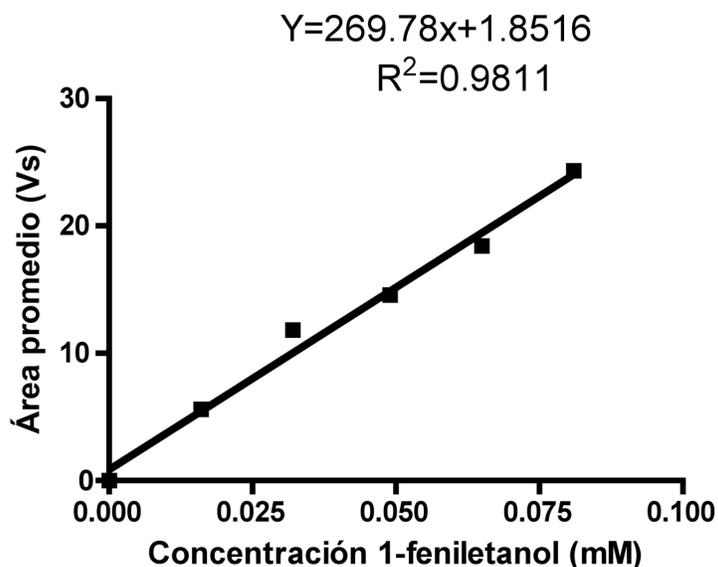


**FIGURA 12. Cromatogramas de la curva patrón de 1-feniletanol.**

Concentraciones desde 0 mM hasta 0.081 mM de 1-feniletanol en isooctano.

Fue observada una relación directamente proporcional entre la concentración de alcohol y el área de cada uno de los picos (Figura 12). Gracias a esta relación, se logró obtener una ecuación de la recta que permitió en pasos posteriores la cuantificación de los ésteres producidos en función de la misma.

Considerando que en el caso de las tres reacciones estudiadas la estequiometría es 1 a 1, se asumió que los moles de alcohol perdidos durante el tiempo de reacción corresponde de forma directamente proporcional los moles de éster formados. Cabe mencionar que se incluyeron controles de alcohol en los ensayos de incubación para verificar que el alcohol no se pierde durante la misma.

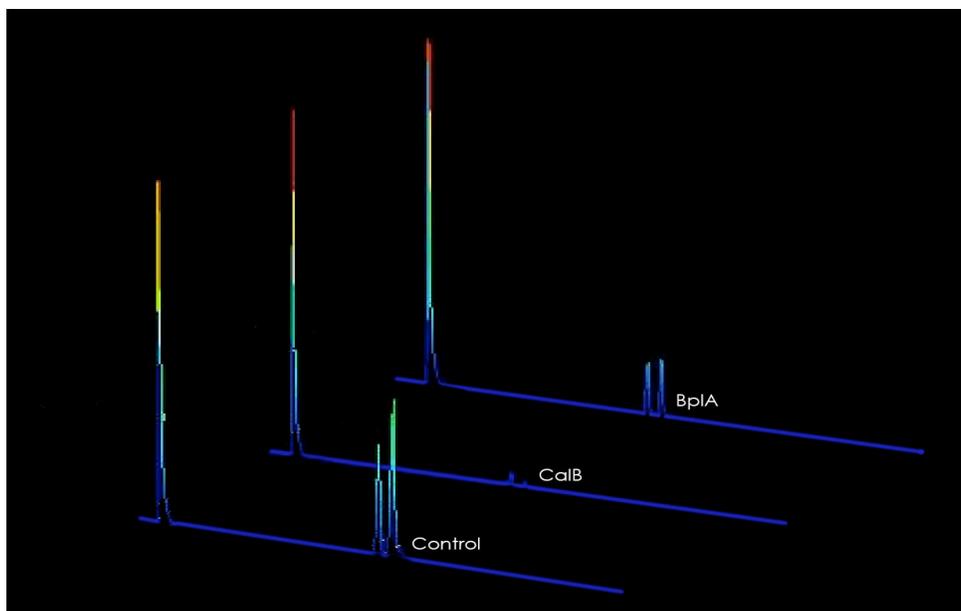


**FIGURA 13. Curva patrón de 1-feniletanol**

El coeficiente de correlación obtenido ( $R^2 = 0.981$ ) es un valor aceptable que nos permite asegurar que los resultados obtenidos a partir de la ecuación de la recta serán cercanos al valor real. A partir de la ecuación obtenida se extrapolaron los datos resultantes en cada una de las muestras para conocer la concentración de alcohol que había en cada mezcla de reacción después del tiempo de incubación.

b) Cuantificación del éster producido a partir del ácido caproico.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas de reacción se centrifugaron a 10,000 r.p.m. por 5 minutos para lograr la separación de la fase sólida. Después, se inyectaron por duplicado utilizando el mismo programa que se utilizó al hacer la curva patrón (Figura 12).



**FIGURA 14. Cromatogramas de la reacción de síntesis en medio orgánico con ácido caproico como sustrato. A:** Reacción control, en ausencia de catalizador. **B:** Reacción catalizada por CalB. **C:** Reacción catalizada por BpIA.

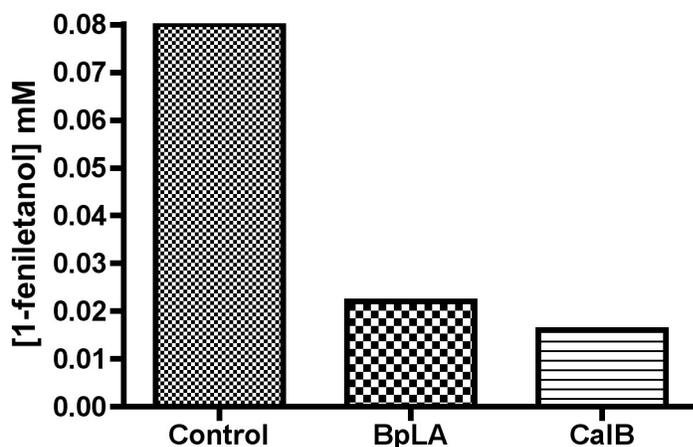
El ácido caproico, al ser mucho más volátil que el láurico o el vinil estearato, se pudo observar en los cromatogramas como un pico en el minuto 16, un minuto después del pico correspondiente al alcohol. La cuantificación en este caso se realizó de la misma manera, considerando únicamente el área de los picos correspondientes al alcohol.

**TABLA 9. Áreas obtenidas a partir de los picos correspondientes al 1-feniletanol en la reacción de síntesis en medio orgánico, utilizando ácido caproico como sustrato**

	Área promedio	Conc. inicial	Conc. final	Alcohol utilizado	Alcohol utilizado
	Vs	mM	mM	mM	%
Control	23.70	0.081	0.081	0	0
BpIA	8.32	0.081	0.024	0.057	70.37
CalB	6.70	0.081	0.018	0.063	77.77

Relación de eficiencia de catálisis de BpIA respecto a CalB: **90.47%**

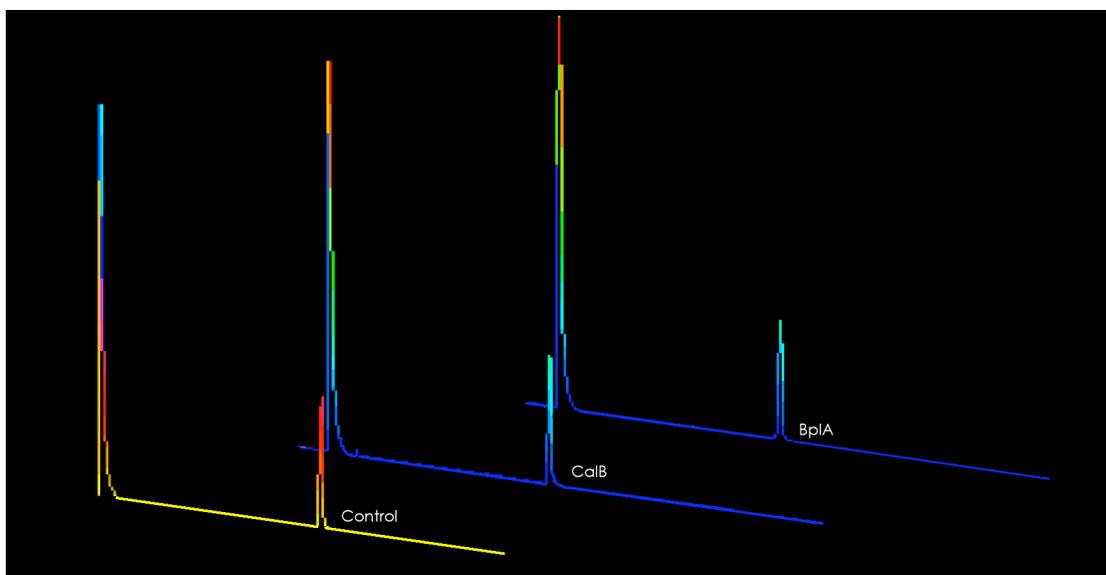
Si consideramos el porcentaje de conversión de CalB como el 100% en esta reacción, el desempeño de la lipasa BpLA es del 90.47% con respecto a la enzima comercial de alta actividad lipolítica. Esto nos habla de un excelente desempeño de la lipasa de *B. pumilus* en esta reacción.



**FIGURA 15. Concentración de alcohol en el medio de reacción, después del tiempo de incubación.** Concentración de 1-feniletanol (mM), encontrada en el medio de reacción, al final del tiempo de incubación.

c) Cuantificación del éster producido a partir de ácido láurico.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas de reacción se centrifugaron a 10, 000 r.p.m. por 5 minutos para lograr la separación de la fase sólida. Después se inyectaron por duplicado utilizando el mismo programa que se utilizó al hacer la curva patrón.



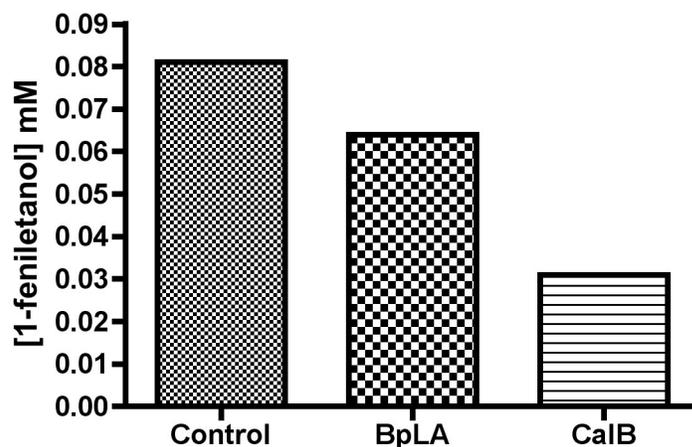
**FIGURA 16. Cromatogramas de la reacción de síntesis en medio orgánico con ácido láurico como sustrato. A:** Reacción control, en ausencia de catalizador. **B:** Reacción catalizada por CalB. **C:** Reacción catalizada por BplA.

En todos los casos se observó la aparición del disolvente cerca del primer minuto de la corrida y el pico correspondiente al alcohol (minuto 15) fue claro en todos los casos. Nuevamente se determinó la cantidad de alcohol presente en la muestra después de las 48 horas de reacción. Los datos de esta tabla indican que, si consideramos el porcentaje de conversión de CalB como el 100%, el desempeño de BplA es de 27.59% en esas condiciones de reacción.

**TABLA 10. Áreas obtenidas a partir de los picos correspondientes al 1-feniletanol en la reacción de síntesis en medio orgánico, utilizando ácido láurico como sustrato**

	Área promedio	Conc. inicial	Conc. Final	Alcohol utilizado	Alcohol utilizado
	Vs	mM	mM	mM	%
Control	24.05	0.081	0.081	0.000	0.00
BplA	18.84	0.081	0.063	0.017	21.49
CalB	10.21	0.081	0.031	0.049	77.87

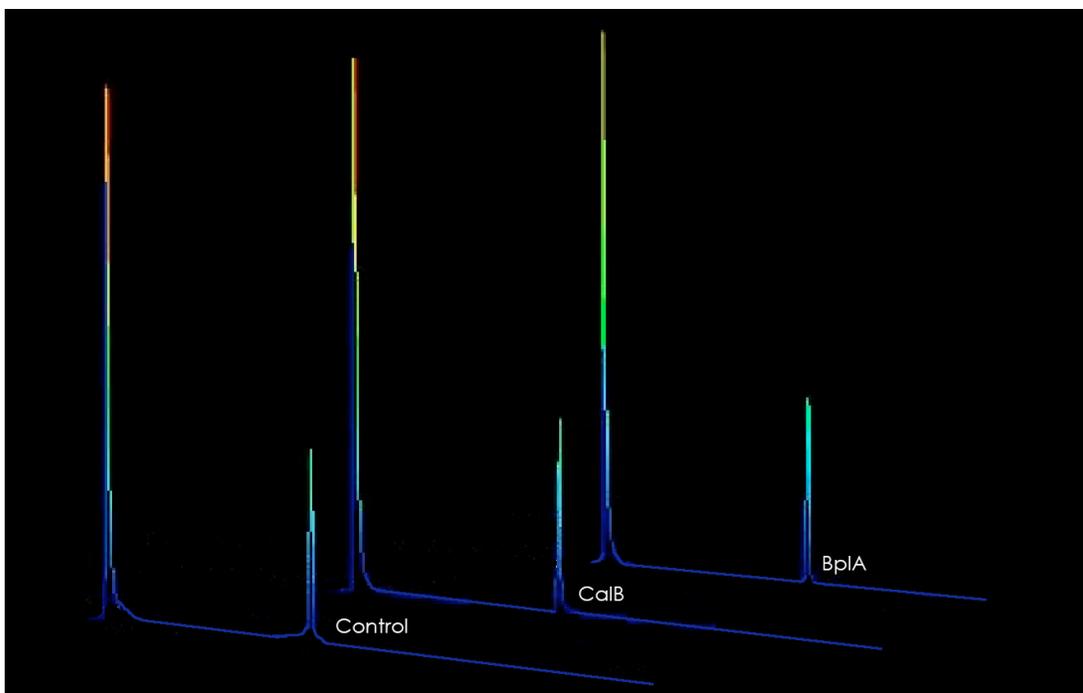
Relación de eficiencia de catálisis de BplAr con CalB: **27.59%**



**FIGURA 17. Concentración de alcohol en el medio de reacción, después del tiempo de incubación.** Concentración de 1-feniletanol (mM), encontrada en el medio de reacción, al final del tiempo de incubación.

d) Cuantificación del éster producido a partir de vinil estearato

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas de reacción se centrifugaron a 10, 000 r.p.m. por 5 minutos para lograr la separación de la fase sólida. Después se inyectaron por duplicado utilizando el mismo programa que se utilizó al hacer la curva patrón.



**FIGURA 18. Cromatogramas de la reacción de alcoholisis en medio orgánico con vinil estearato como sustrato. A:** Reacción control, en ausencia de catalizador. **B:** Reacción catalizada por CalB. **C:** Reacción catalizada por BplA.

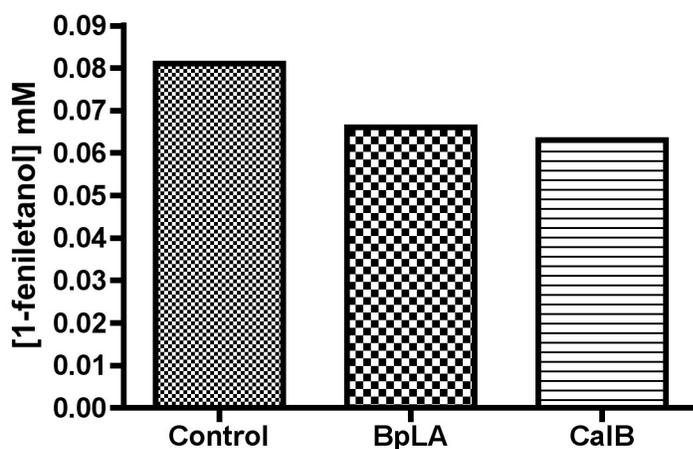
De la misma forma en que se realizó en los casos anteriores, se calcularon las dimensiones de las áreas de cada pico. Como en el caso del ácido láurico, en estos cromatogramas solamente se logró observar el pico correspondiente al disolvente y uno correspondiente al alcohol (Figura 18).

**TABLA 11. Áreas obtenidas a partir de los picos correspondientes al 1-feniletanol en la reacción de alcoholisis en medio orgánico, utilizando ácido caproico como sustrato.**

	Área promedio	Conc. inicial	Conc. final	Alcohol utilizado	Alcohol utilizado
	Vs	mM	mM	mM	%
Control	23.35	0.081	0.081	0	0
BplA	19.65	0.081	0.066	0.015	19.09
CalB	18.84	0.081	0.063	0.017	26.82

Relación de eficiencia de catálisis de BplAr con CalB: **71.17 %**

Aún cuando el porcentaje de alcohol perdido en la reacción de alcoholisis con vinil estearato es muy poco incluso para CalB, y considerando a éste como el 100% de conversión, el desempeño de la lipasa en estudio es del 71.17% con respecto a CalB.



**Figura 19. Concentración de alcohol en el medio de reacción después del tiempo de incubación.** Concentración de 1-feniletanol (mM), encontrada en el medio de reacción, al final del tiempo de incubación.

En la Tabla 12 se presenta un resumen del desempeño de la lipasa BpLA en las diferentes reacciones estudiadas, y se hace un comparativo con el desempeño de la lipasa CalB. Se considera en todos los casos el consumo de 1-feniletanol por CalB como el 100 %.

**TABLA 12. Resumen del desempeño de BpIAr en relación a CalB en las reacciones estudiadas**

<b>Reacción</b>	<b>BpIA</b> (% de transformación)	<b>CalB</b> (% de transformación)	<b>Relación (%)</b>
Ácido caproico + 1-feniletanol	70.37	77.77	<b>90.47</b>
Ácido láurico + 1-feniletanol	21.49	77.87	<b>27.59</b>
Vinil estearato + 1-feniletanol	19.09	26.82	<b>71.17</b>

Aun cuando en todos los casos la actividad de CalB fue mayor, considerando que se trata de la enzima lipolítica por excelencia, podemos considerar un buen desempeño de BpIAr con respecto a la misma, sobretodo al hablar de la reacción de síntesis con ácido caproico y la alcoholisis con vinil estearato.

Esto podría parecer un resultado desalentador, pero existen muchas otras cuestiones que vale la pena analizar antes de decidir sobre el uso de un catalizador u otro. Por ejemplo, la estabilidad, el reuso, la enantioselectividad, la regioselectividad, la quimioselectividad, etc. BpIA ha sido utilizada exitosamente para la desacetilación de compuestos de interés biotecnológico que CalB no pudo hidrolizar, como la amirina y la epicatequina [Ruiz, 2007].

Es importante mencionar que en los últimos años, una cantidad enorme de reacciones catalizadas por lipasas en medios no convencionales ha sido publicada por científicos alrededor del mundo (esterificaciones, hidrólisis y alcoholisis). Durante este tiempo, se han propuesto diferentes sistemas de reacción, utilizando sistemas monofásicos y bifásicos [Rendón y col., 2001]. Los problemas mayoritarios para este tipo de reacciones son el bajo equilibrio en la conversión de

triglicéridos y la baja selectividad del proceso para un grado específico de esterificación, ya que generalmente estos productos son mezclas complejas de mono, di y triglicéridos. Para aumentar la síntesis selectiva se han utilizado múltiples métodos, entre ellos, la ingeniería de disolventes. En numerosos artículos se ha señalado que la polaridad del disolvente es uno de los factores más importantes en la selectividad de las reacciones catalizadas por lipasas y se ha observado que la polaridad del disolvente tiene una gran influencia en las reacciones catalíticas. Las estrategias de la ingeniería de disolventes se basan en realizar mezclas binarias de disolventes utilizados, en reacciones catalizadas por lipasas, y en medir cuantitativamente la formación de los productos en cada una de ellas. De esta forma es posible determinar la mezcla de disolventes orgánicos más conveniente para la reacción. Estas estrategias se pueden utilizar para definir, en las reacciones estudiadas en este trabajo, la mezcla de disolventes ideal para lograr mejores eficiencias de reacción.

# Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

## 6.1 Conclusiones

- Se sintetizó el material mesoporoso SBA-15.
- Se expresó y purificó BplAr con un rendimiento de 69.77%.
- Se inmovilizó a la enzima recombinante en el material mesoporoso SBA-15 con un rendimiento de 58.31%.
- La estabilidad de la enzima inmovilizada es relativamente alta. Sin embargo, es posible explorar otras condiciones ya que a lo largo de un periodo de 14 meses de almacenamiento a 4°C y  $A_w$  de 0.15 catalizador, perdió el 53% de su actividad inicial.
- La enzima inmovilizada en SBA-15 es capaz de realizar reacciones de síntesis de ésteres en medios orgánicos, así como alcoholisis típicas de las lipasas.
- La enzima inmovilizada en SBA-15 es capaz de utilizar alcoholes secundarios para realizar reacciones de alcoholisis.
- La mayor eficiencia de reacción de la BplAr inmovilizada en SBA-15 se presentó en la síntesis del éster el ácido de cadena más corta (caproico), lo que confirma la preferencia por este tipo de ácidos de las lipasas de esta familia.
- La reacción de alcoholisis en medio orgánico se logró con una menor eficiencia por parte de ambas enzimas.

## **6.2 Perspectivas**

- Estudiar la enantioselectividad de BplAr inmovilizada en SBA-15, mediante cromatografía en fase quiral.
- Estudiar la promiscuidad catalítica de esta lipasa en medio orgánico frente a carbonatos orgánicos, tioésteres y amidas.
- Explorar mezclas de disolventes que permitan el incremento del rendimiento de las reacciones. Igualmente es importante probar con disolventes del tipo de los líquidos iónicos para evaluar el potencial de dicha enzima en éstos.

# Referencias

1. Arpigny, J., Jaeger, K. (1999) "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties". *Biochem. J.* 343, 177-183.
2. Barros, R., Wehtje, E., Garcia, F., Adlercreutz, P. (1998) "Physical characterization of porous materials and correlation with the activity of immobilized enzyme in organic medium". *Biocat. Biotransf.* 16, 67-85.
3. Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R. (1998) "A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports". *Biotchnol. Bioeng.* 58, 486-493.
4. Beck, J., Vartuli, C., Roth, W., Leonowicz, M., Kresge, C. Schmitt, K. Chu, C. Olson, D., Sheppard, E., McGullen, S., Higgins, J., Schlenker, J. (1992) "A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates". *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10834-10843.
5. Bustos, I. (1995) "Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo". Tesis licenciatura, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM. México D.F.
6. Bustos, I. (1998) "Análisis del gen que codifica para la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1". Tesis maestría en biotecnología, UACPyP-CCH y Facultad de Química, UNAM. México D.F.

7. Cernia, E., Delfini, M., Di Cocco, E., Palocci, C. Soro, S. (2002) "Investigation of lipase-catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use of NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction". *Bioorg. Chem.* 30,276-284.
8. Chen, H., Hsiao, K., Wu, S., Wang, K. (1995) "Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*". *Biotechnol. Lett.* 17,305-308.
9. Coombs, J., (1992) "Dictionary of biotechnology". Ed. Stockton Press, Gran Bretaña.
10. Derewenda, Z., Derewenda, U., Dodson, G. (1991) "The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase at 1.9 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 227,818-839.
11. Fernandez-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Guisan, G.M. (1998) "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports". *Chem. Phys. Lipids* 93,185-189.
12. Harwood, C. (1992) "*Bacillus subtilis* and its relatives molecular, cytological and industrial workhorses". *TIBECH* 10,247-256.

13. He, J., Xu, Y., Ma, H., Zhang, Q., Evans, D., Duan, X. (2006) "Effect of surface hydrophobicity/ hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase". *J. Colloid Interface Sci.* 298,780-786.
14. Ibarra, A. (2004) "Clonación y expresión de la lipasa termófila y alcalófila de *Bacillus pumilus* GMA1". Tesis licenciatura, Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
15. Jaeger, K.E., Dijkstra, B. W., Reetz, M.T. (1999) "Bacterial biocatalysts: biology, three dimensional structures and biotechnological application of lipases". *Annu. Rev. Microbiol.* 53,315-351.
16. Jaeger, K., Reetz, M.T. (1998) "Microbial lipases from versatile tools for biotechnology". *Trends Biotechnol.* 16,396-403.
17. Korokoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. (2004) "Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review". *Food Microbiol.* 52,377-397.
18. Laemmli, U. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227,680-685.
19. Lanser, A.C., Manthey, L.K., Hou, C.T. (2001) "Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein". *Curr. Microbiol.* 44,336-340.

20. Li, C., Hassler, M., Bugg, T. (2008) "Catalytic promiscuity in the  $\alpha/\beta$  -hydrolase superfamily: hydroxamic acid formation, C-C bond formation, ester and thioester hydrolysis in the C-C hydrolase family". *ChemBioChem* 9,71-76.
21. Masse, L., Kennedy, K., Chous P. (2001) "The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse waste water". *Technol. Biotechnol.* 76,629-635.
22. Montiel, C., Aburto, J., Terrés, E., Domínguez, J. (2007) "Immobilization of chloroperoxidase on silica-based materials for 4,6-dimethyldibenzothiophene oxidation". *J. Mol. Cat. B.* 48,90-98.
23. Montiel, C. (2008) "Estudio de la oxidación biocatalítica de compuestos heteroatómicos por la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en medio orgánico". Tesis doctorado. Instituto Mexicano del Petróleo. México D.F.
24. Mora, R. (2008) "Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1". Tesis maestría en bioquímica. Facultad de Química. México D.F.
25. Nath, A., Atkins, W.M. (2007) "A quantitative index of substrate promiscuity" *Biochemistry* 47,157-166.

26. Rendón, X., López-Munguía, A., Castillo, E. (2001) "Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein". *JAOCS* 78,1061-1066.
27. Ryoo, R. and Kim, J. M. (1995) "Structural order in MCM-41 controlled by shifting silicate polymerization equilibrium". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 7,711.
28. Rotticci, D., Torbjorn, N., Hult, K., Martinelle, M. (2000) "An active-site titration method for lipases". *Biochim. Biophys. Acta* 1483,132-140.
29. Rsool, S., Sarojini, J., Syed, R., Maqbool, Q., Verma, V., Koul, S. (2005) "Molecular cloning of enantioselective ester hydrolase from *Bacillus pumilus* DBRL-191". *FEMS Microbiol. Lett.* 294,113-120.
30. Ruiz, K. (2007) "Uso de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 en biocatálisis". Tesis licenciatura, Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
31. Schmidt-Dannert, C. (1999) "Recombinant microbial lipases for biotechnological applications". *Bioorgan. Med. Chem.* 7,2123-2130.
32. Suan, C., Roji, M. (2004) "Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor". *J. Mol. Cat. B.* 28,111-119.
33. Vinu, A., Hartmann, M. (2004) "Direct synthesis and spectroscopic evidence of framework Co(II) ions in SBA-15 mesoporous molecular sieves". *Chem. Lett.* 33,588-589.

34. Wong, P. (2001) "Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1 : Producción fermentativa y algunas propiedades". Tesis licenciatura, Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México D.F.

35. Zhao, D., Freng, J., Huo, Q., Melosh, N. (1998) "Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores". Science 279,548-552.

36. Zhao, D., Huo, Q., Feng, J., Melosh, N., Chimelka, B., Stucky, G. (1998) "Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures". J. Am. Chem. Soc. 120,6024-6036.

37. Zuñiga, V.H. (2004) "Inmovilización de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1". Tesis licenciatura, Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM, México D.F.