



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE
Bacillus pumilus AISLADO DE UN
PRODUCTO LÁCTEO TRADICIONAL
MEXICANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

LCQ. MAYRA PATRICIA ALCÁNTARA SOL

TUTORA: DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH



MÉXICO, D.F.

2009

Este trabajo se desarrolló en dos laboratorios: en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, conjunto “E”, de la UNAM; y en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, edificio de investigación, de la UNAM.

El **COMITÉ TUTORAL** que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM

PRESENTA: Mayra Patricia Alcántara Sol

ASESORA: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Vo. Bo. Asesor _____

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE	Dr. Agustín López-Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM
VOCAL	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
SECRETARIO	Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM
SUPLENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
SUPLENTE	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Patricia y David Guillermo, a quienes amo inmensamente y les tengo un agradecimiento eterno por todas las oportunidades que me han dado en esta vida, desde tener la vida misma... hasta llegar a esta etapa tan importante en mi formación, que es haber obtenido el grado de maestría.

Por compartir mis sueños e ilusiones y haberse esforzado en darme las herramientas necesarias para poder lograrlos.

Por ser un gran ejemplo y haberme enseñado a valorar cada instante de vida acercándome a lo más maravilloso, que es Dios, quien me ha dado grandes bendiciones.

A Carlos Eduardo por ser el amor, la luz y la razón en mi universo. Por ser la fuerza que me impulsa a ser constante y a perseverar por esos sueños e ilusiones y por compartir las alegrías en todo momento.

También a mis hermanos David Miguel, Gisela, Judith Artemisa, Carlos Adrian y Raúl Alejandro, con quienes he crecido y compartido etapas maravillosas.

A Milán y a Niza por alegrar mi espíritu y corazón.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** por ...

La familia que me ama y apoya inmensamente
Los amigos que estuvieron conmigo a cada instante
Los profesores que me compartieron de su conocimiento
Y por todos aquellos que estuvieron de una forma u otra
involucrados durante el desarrollo de este trabajo
al darme su apoyo, comprensión y paciencia
Por sus bendiciones... ¡Gracias!

También quiero agradecer....

A mi asesora la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por demostrarme su confianza al darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y por su apoyo y consejos prácticos durante la realización del mismo.

A mi Comité Tutoral por sus acertadas opiniones sobre el desarrollo del proyecto.

Al Jurado de Examen por la revisión de tesis y sugerencias que la enriquecieron.

Un reconocimiento especial y todo mi agradecimiento al Dr. Ismael Bustos Jaimes por su apoyo y supervisión durante todo el desarrollo de este proyecto, por la revisión del escrito y por su confianza en mí.

A mis padres Patricia y David Guillermo porque el esfuerzo también fue de ustedes, porque me dieron su confianza, su apoyo, su entusiasmo y estuvieron conmigo siempre pendientes, por su AMOR...

A Carlos Eduardo porque esto es el resultado de la experiencia que representas para mí y todo es posible con tu amistad, tu apoyo, tu presencia, tu amor. Por tu comprensión y paciencia y por la maravillosa genialidad de tu presencia.

A mis abuelos María del Socorro, Carmela y Miguel por las bendiciones que me dieron al tenerme siempre presente en sus oraciones y por el gran amor que me demuestran.

A los tíos y primos que estuvieron pendientes.

A los amigos de toda la vida Cae, Deni, Ely-Olivia, Hypi, Juan, Koko y Omar por su interés, por su apoyo y por preguntar aunque no entendieran. Por la amistad que traspasa tiempo y distancia.

A mis compañeros de laboratorio Lalo, Rodrigo, Vladimir, Laura, Jesica, Toño, Bere, Paloma, Mirna, Karina, Israel, Vero (G y H), Abraham, Eliana, Cyndi, Linda, Denisse, Pili, Aidé, Katia, Nayeli, quienes me apoyaron en estudios, en tareas, en experimentos, momentos de relajación, por compartirme de su sana alegría y lo mas importante por su amistad.

A los Biologos escorpionólogos, arcnólogos y palpigradólogos y agredados Carlos, Mariana, Alex, Valentina y Hector, por compartir anécdotas, palabras de aliento, su alegría, momentos de esparcimiento y por que me brindaron su amistad incondicional.

Al Dr. Oscar Francke Ballvé por su interés en mi avance, prestación de recursos y espacio en su laboratorio y por soportarnos un poquito.

A los siempre amigos, los buenos LCQ's: Jud, Galeano, Lila, Lalo, Monsy y Aarón, que de una u otra forma hicieron gala de su presencia, cooperación, interés e incentivo.

Además agradezco y reconozco...

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

Al Programa de Becas del CONACYT y al Programa de Fomento a la Graduación de los alumnos de Posgrado de la UNAM de la Coordinación de Estudios de Posgrado por el apoyo económico durante estos años y meses.

A Lety por llevar todos los trámites y estar al pendiente.

A la Dra. Hilda Calderón por su asesoría y apoyo en el manejo del cromatógrafo de gases.

A La Dra. Patricia Severiano por su apoyo en el análisis estadístico.

A la M. en C. Carolina Peña por su ayuda en la determinación del punto isoelectrico.

Y a los que me faltó nombrar...

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Lipasas.....	1
1.1.1. Estructura tridimensional.....	2
1.1.2. Mecanismo catalítico.....	4
1.1.3. Clasificación de lipasas bacterianas.....	6
1.1.4. Fuentes de obtención.....	9
1.1.5. Aplicación industrial.....	10
1.2. Lipasas del género <i>Bacillus</i>	11
1.3. Manufactura de quesos.....	16
1.4. Microorganismo de la lipasa en estudio.....	21
1.4.1. <i>Bacillus pumilus</i> QC.....	21
1.4.2. <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general.....	23
2.2. Objetivos particulares.....	23
3. MÉTODOS Y MATERIALES.....	24
3.1. Sustancias y materiales.....	24
3.2. Desarrollo experimental.....	24
3.2.1. Reactivación de <i>Bacillus pumilus</i> QC.....	25
3.2.2. Ensayos de actividad enzimática en caja Petri.....	26
3.2.3. Identificación de la bacteria.....	26
3.2.4. Secuenciación.....	27
3.2.5. Sobre-expresión de la lipasa.....	33
3.2.6. Purificación.....	37
3.2.7. Cuantificación de proteína.....	39
3.2.8. Determinación de peso molecular y punto isoeléctrico.....	40
3.2.9. Ensayos de actividad enzimática.....	41

3.2.9.1.	Ensayos cinéticos.....	41
3.2.9.2.	Ensayos de hidrólisis de grasa butírica.....	43
4.	RESULTADOS.....	46
4.1.	Reactivación de <i>Bacillus pumilus</i> QC.....	46
4.2.	Actividad enzimática en caja Petri.....	46
4.3.	Identificación de la bacteria.....	47
4.4.	Secuenciación.....	49
4.4.1.	Región V3 del gen 16s ARNr.....	49
4.4.2.	Región que codifica para la lipasa.....	53
4.5.	Expresión de la lipasa.....	58
4.6.	Purificación.....	61
4.7.	Determinación de peso molecular y punto isoeléctrico.....	63
4.8.	Ensayos cinéticos.....	65
4.8.1.	Constantes cinéticas.....	66
4.8.2.	Especificidad de sustrato.....	69
4.8.3.	Estabilidad de sustratos y enzimas.....	71
4.9.	Hidrólisis de grasa butírica.....	72
4.10.	Modelo estructural 3D de la lipasa recombinante.....	77
5.	CONCLUSIONES.....	81
6.	ANEXO I. Protocolos.....	83
7.	ANEXO II. Análisis de secuencias.....	101
	REFERENCIAS.....	112

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1- 1. Propiedades bioquímicas de lipasas del género <i>Bacillus</i>	14
Tabla 1- 2. Principales ácidos grasos en la grasa de leche bovina.	17
Tabla 1- 3. Clasificación taxonómica de <i>Bacillus pumilus</i>	21
Tabla 3- 1. Tabla de ecuaciones usadas en la cuantificación de ADN.	28
Tabla 3- 2. Formulación de la reacción de amplificación de la región V3 de la subunidad 16s ribosomal.	29
Tabla 3- 3. Condiciones de los ciclos de reacción en la amplificación de la región v3 del gen 16s ARNr.	29
Tabla 3- 4. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación de la región V3 de la subunidad 16s ribosomal.	30
Tabla 3- 5. Formulación de la mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>lipA</i> , que codifica para la lipasa madura.	30
Tabla 3- 6. Condiciones de los ciclos de reacción para la amplificación del gen <i>lipA</i> , que codifica para la lipasa madura.	31
Tabla 3- 7. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen <i>lipA</i>	31
Tabla 3- 8. Secuencias de corte de las enzimas de restricción <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	34
Tabla 3- 9. Curva patrón con solución estándar de albúmina sérica bovina.	40
Tabla 3- 10. Amortiguadores utilizados en los ensayos de actividad lipolítica.	42
Tabla 3- 11. Emulsiones de hidrólisis lipolítica y tiempo de reacción de cada una.	43
Tabla 3- 12. Programación del horno del cromatógrafo de gases.	45
Tabla 4- 1. Resultados de la galería API 50 CH.	48
Tabla 4- 2. Secuencia de nucleótidos perteneciente a la región V3 de la subunidad 16s ribosomal de <i>B. pumilus</i> QC.	50
Tabla 4- 3. Resultados de la comparación de la secuencia obtenida de la región v3 de la subunidad 16s ribosomal ARN de <i>B. pumilus</i> QC con ayuda del programa BLAST.	51
Tabla 4- 4. Secuencia de nucleótidos presentes en la región V3 de la subunidad 16s ribosomal de <i>B. pumilus</i> GMA1.	52
Tabla 4- 5. Secuencia de nucleótidos del gen <i>lipA</i> y la correspondiente secuencia putativa de aminoácidos de la lipasa madura de <i>Bacillus pumilus</i> QC, <i>LipAQC</i>	54

Tabla 4- 6. Comparación de la secuencia correspondiente a la lipasa madura LipAQC de Bacillus pumilus QC. Datos tomados de la Figura 7.7 en el ANEXO II.....	55
Tabla 4- 7. Parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes ensayados a 20°C.....	66
Tabla 4- 8. Parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes en los ensayos de especificidad de sustrato ensayados en amortiguador de citratos 50 mM pH 5.5 a 20°C.....	69
Tabla 4- 10. Porcentaje en peso de hidrólisis lipolítica (cantidad de cada ácido graso liberado con respecto a su total presente en cada muestra).	74

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- 1. Presentación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa.	4
Figura 1- 2. Mecanismo de reacción de Lipasas.	6
Figura 1- 3. Estructura tridimensional de la lipasa LipA de <i>B. subtilis</i>	12
Figura 1- 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de lipasas maduras de distintas especies de <i>Bacillus</i>	15
Figura 1- 5. Estructura de los triacilglicerolos. R: $-(CH_2)_n-CH_3$	17
Figura 4- 1 Colonias de <i>B. pumilus</i> aislado de queso Cotija que muestran halo de actividad enzimática.	47
Figura 4- 2. Gel de Agarosa al 1% que muestra las bandas de los productos de amplificación de la región v3 del gen 16s ARNr de <i>B. pumilus</i> QC y <i>B. pumilus</i> GMA1.	50
Figura 4- 3. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de la región V3 de la subunidad ribosomal 16S de <i>Bacillus pumilus</i> QC y <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 mostrando una identidad del 100%.	52
Figura 4- 4. Gel de Agarosa al 1% que muestra la banda del producto de amplificación del gen <i>lipA</i> de <i>B. pumilus</i> QC, que codifica para la lipasa madura.	53
Figura 4- 5. Alineación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las lipasas maduras LipAQC y LipAGMA1 correspondientes a las cepas <i>B. pumilus</i> QC y <i>B. pumilus</i> GMA1 respectivamente.	56
Figura 4- 6. Relación evolutiva de 18 secuencias de lipasas maduras.	57
Figura 4- 7. Halo de actividad lipolítica de la transformante BL21/PET+lipAQC.	59
Figura 4- 8. Comparación en las secuencias de nucleótidos del gen <i>lipA</i> de <i>B. pumilus</i> QC y el plásmido pET+LipAQC.	60
Figura 4- 9. Purificación de la lipasa recombinante LipAQC-6H.	62
Figura 4- 10. Gel SDS-PAGE que muestra los valores de PM de las lipasas recombinantes de <i>B. pumilus</i> QC y <i>B. pumilus</i> GMA1.	64
Figura 4- 11. Gel IEF que muestra los valores de pI de las lipasas recombinantes de <i>B. pumilus</i> QC y <i>B. pumilus</i> GMA1.	64
Figura 4- 12. Ejemplo de un ajuste de datos realizado con el programa Encora v.1.2., correspondiente a la curva de progreso de una reacción de hidrólisis de pNFA por LipAQC-6H en amortiguador de citratos	50

mM pH 5.5 a 20°C.....	65
Figura 4- 13. Comparación de los parámetros cinéticos medidos con pNFA a 20°C en diferente amortiguador.....	68
Figura 4- 14. Comparación de los parámetros cinéticos medidos con pNF-ésteres de distinta longitud de cadena a 20°C en amortiguador de citratos 50 mM a pH 5.5.....	70
Figura 4- 15. Estabilidad de las enzimas a las diferentes condiciones y tiempos de reacción.....	72
Figura 4- 16. Grafica del porcentaje en peso de hidrólisis lipolítica (cantidad de cada ácido graso libre con respecto a su total presente en cada muestra).	75
Figura 4- 17. Porcentaje en peso de hidrólisis lipolítica (cantidad de cada ácido graso liberado con respecto a su total presente en cada muestra).	76
Figura 4- 18. (A) Evolución del radio de giro durante la dinámica molecular. (B) Evolución de la energía total del sistema durante la dinámica molecular.....	78
Figura 4- 19. Modelo de la estructura tridimensional de la lipasa recombinante LipAQC-6H.....	79
Figura 4- 20. Superposición de los modelos tridimensionales de las proteínas LipAQC-6H (verde) y LipAGMA1-6H (azul claro).	80

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
AGT	Ácidos grasos totales
Amp	Ampicilina
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Medio de infusión cerebro corazón
<i>bplA</i>	Gen que codifica para la lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
ΔI	Cambio en la fuerza iónica
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
ej.	Ejemplo
IEF	Enfoque isoeléctrico
IPTG	β -D-tiogalactósido de isopropilo
LB	Medio Luria-Bertani
<i>lipA</i>	Gen que codifica para la lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> QC
LipAGMA1	Lipasa nativa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
LipAGMA1-6H	Lipasa recombinante de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1
LipAQC	Lipasa nativa de <i>Bacillus pumilus</i> QC
LipAQC-6H	Lipasa recombinante de <i>Bacillus pumilus</i> QC
Kan	Kanamicina
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pET+lipAQC	Vector pET-22b+ + gen <i>lipA</i>
pETbpl	Vector pET-22b+ + gen <i>bplA</i>
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
pNF	<i>p</i> -nitrofenol
pNFA	<i>p</i> -nitrofenil acetato
pNFB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
pNFD	<i>p</i> -nitrofenil decanoato
pNFL	<i>p</i> -nitrofenil laurato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturalizante SDS
TM	Temperatura de disociación

RESUMEN

Las lipasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicerolos para liberar ácidos grasos y glicerol en una interfase agua-lípido. Las de origen microbiano son de importancia industrial y biotecnológica, ya que tienen un gran potencial de aplicación en áreas como alimentos, farmacéutica, agronomía, química, etc. Particularmente en la industria de productos lácteos, las lipasas desempeñan un papel importante en la maduración de quesos, ya que los ácidos grasos liberados por la acción hidrolítica de estas enzimas contribuyen en la aparición de sabores y olores característicos.

En 2006, García-Saturnino reportó la presencia de una cepa de *Bacillus pumilus* con marcada actividad lipolítica, en un aislado de queso Cotija, un producto lácteo tradicional mexicano, proveniente del municipio de Santa María del Oro Jalisco, México. Sin embargo la actividad lipolítica de este microorganismo no había sido caracterizada.

El presente trabajo tiene por objetivo desarrollar la caracterización bioquímica de la lipasa de *Bacillus pumilus* QC, denominada así por el medio del que fue aislado, el queso Cotija.

La región que codifica para una lipasa madura de *Bacillus pumilus* QC fue amplificada, secuenciada, clonada y sobre-expresada en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3). El producto correspondiente, la lipasa recombinante LipAQC-6H (con 6 residuos de His en el extremo C-terminal) fue purificado y caracterizado.

La secuencia silvestre del gen *lipA* consta de 543 pares de bases y codifica para la lipasa madura, una proteína de 181 aminoácidos. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la lipasa, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos, revela la presencia del pentapéptido consenso Ala-X₁-Ser-X₂-Gly característico de las lipasas del género *Bacillus*. Una búsqueda con BLAST dentro de la base de datos de proteínas revela una identidad de 96 % de LipAQC con la lipasa de *B. pumilus* GMA1.

La caracterización de la actividad lipolítica de la lipasa recombinante consistió en determinar: los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , usando *p*-nitrofenil acetato como sustrato; la especificidad de sustrato hacia *p*-nitrofenil ésteres de distinta longitud de cadena; y el perfil de ácidos grasos liberados por la hidrólisis lipolítica de grasa butírica. Dichos parámetros fueron comparados con los que presenta la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1, LipAGMA1-6H, bajo las mismas condiciones de reacción.

El análisis de la actividad lipolítica de LipAQC-6H indica que, a pesar de que la lipasa interactúa con sustratos con un amplio rango de longitud de cadena (C2:0-C18:0), ésta presenta una marcada preferencia por sustratos de *p*-nitrofenil ésteres de longitud de cadena corta (C4:0 y C6:0), lo cual coincide con lo observado en el perfil de ácidos grasos obtenido a partir de la hidrólisis de grasa butírica.

La caracterización bioquímica de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* QC y su comparación con la de *B. pumilus* GMA1 puede contribuir a comprender su posible potencial en aplicaciones industriales y/o biotecnológicas.

ABSTRACT

Lipases belong to an enzymatic group that catalyzes the hydrolysis of triacylglycerides, liberating fatty acids and glycerol, in the lipid-water interphase. Microbial lipases have industrial and biotechnological relevance; they have enormous potential applications in areas such as food, pharmaceutical, agronomy, chemical, etc. Particularly, in the dairy industry, lipases play an important role in cheese ripening, because they contribute to the characteristic flavor of cheese.

García-Saturnino (2006) reported the presence of a strain of *Bacillus pumilus* isolated from Cotija cheese (a Mexican traditional product from Santa María del Oro, Jalisco) with a significant lipolytic activity. However, its lipolytic activity has not been characterized.

The purpose of this investigation is to perform the biochemical characterization of the lipase produced by *Bacillus pumilus* QC, named after Cotija cheese.

The region encoding a mature lipase of *Bacillus pumilus* QC was amplified, sequenced, cloned and over expressed in *Escherichia coli* (BL21) cells. The corresponding product, the recombinant lipase LipAQC-6H (with six His residues in the C-terminal region) was purified and characterized.

The wild-type sequence of gen *lipA* has 543 base pairs and codes for a mature lipase, a 181 amino acids protein. The sequence analysis of the amino acids of the lipase, deduced from the nucleotide sequence, reveals the presence of the Ala-X₁-Ser-X₂-Gly pentapeptide consensus, characteristic of the lipases from *Bacillus*. A BLAST search within the sequences in the data bases reveals an identity of 96% of LipAQC with the lipase of *B. pumilus* GMA1.

The characterization of the lipolytic activity of the recombinant lipase consisted in the determination of: the kinetic parameters k_{cat} and K_m , with *p*-nitrophenyl acetate as substrate; the substrate specificity to *p*-nitrophenyl esters with different chain length; and the fatty acid profile obtained from the lipolytic hydrolysis of milk fat. Its properties were compared to those of the recombinant lipase from *B. pumilus* GMA1, LipAGMA1-6H under the same reaction conditions.

Despite that the enzyme interacts with substrates displaying a wide range of chain lengths (C2:0-C18:0), the analysis of the lipolytic activity of LipAQC-6H indicates, a marked preference for short-chain *p*-nitrophenyl esters substrates (C4:0 and C6:0), in accordance with the fatty acid profile obtained from the milk fat hydrolysis.

The biochemical characterization of the recombinant lipase from *B. pumilus* QC and its comparison with the one from *B. pumilus* GMA1, may help to understand its potential in industrial and biotechnological applications.

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas [triacilglicerol éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3)] constituyen un grupo de enzimas que degradan los triacilgliceroles, para liberar ácidos grasos y glicerol. Las lipasas son las únicas en catalizar la hidrólisis de grasas en una interfase agua-lípido y la reacción inversa en un medio no acuoso [1].

Las lipasas se encuentran en todo tipo de sistemas biológicos como animales, plantas y microorganismos. Estos últimos y sus enzimas se han utilizado para diversos procesos industriales, médicos, ambientales y biotecnológicos, dado que en contraste con las de plantas y animales, las lipasas microbianas extracelulares pueden ser producidas en gran cantidad por fermentación [2].

Las lipasas presentan un gran potencial biotecnológico, ya que pueden catalizar reacciones de hidrólisis/síntesis dependiendo de las condiciones que presente el medio de reacción. La variedad de aplicaciones industriales generadas en los últimos años es el resultado de la investigación de la relación función-estructura y de la forma en como efectúan su catálisis (propiedades catalíticas). Por lo que, la caracterización bioquímica de las lipasas es necesaria para que éstas puedan ser utilizadas más eficientemente [1,3].

Las lipasas han sido utilizadas extensamente en la industria de lácteos para potencializar el sabor a queso, acelerar la maduración de quesos, hidrolizar la grasa de la leche y crema, y manufacturar productos con sabor a queso. Las lipasas empleadas pueden ser de animales o microorganismos. La elección de estas enzimas es crítica dado que el perfil final de los ácidos grasos liberados se debe a su selectividad y consecuentemente dicta el sabor y aroma del producto resultante [4]. La hidrólisis de la grasa de leche durante la maduración de los quesos, se debe a las enzimas lipolíticas endógenas (Lipoproteína de la leche, LPL, o las secretadas al medio por los microorganismos presentes), y dependiendo de la variedad del queso, a las enzimas exógenas adicionadas [5].

1.1. Lipasas.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster carboxílicos de triacilgliceroles produciendo ácidos grasos y glicerol [6,7]. Los sustratos naturales de las lipasas son triacilgliceroles con un largo de cadena superior a diez átomos de

carbono, los cuales tienen baja solubilidad en agua, por lo que la reacción es catalizada en una interfase agua-lípido (activación interfacial) [7,12]. Las lipasas actúan en diferentes posiciones de los enlaces éster y en condiciones distintas, por lo que también son liberados, monoglicéridos o diglicéridos con diferencias en las posiciones finales de esterificación [8].

En condiciones de baja actividad acuosa, las lipasas poseen la habilidad para llevar a cabo la reacción inversa, permitiendo la síntesis de ésteres (esterificación), a partir de alcoholes y ácidos grasos libres, también pueden realizar reacciones de alcoholólisis o transesterificación, a partir de alcoholes y ésteres [2,7].

Las lipasas tienen un amplio rango de sustratos, sin embargo son altamente específicas en catálisis quimio-, regio- y enantioselectiva. El potencial catalítico de las lipasas puede ser incrementado y resultar más selectivo mediante técnicas como ingeniería genética y evolución dirigida [7]. Las aplicaciones biotecnológicas que se han establecido exitosamente usando lipasas son la síntesis de biopolímeros, la producción de biodiesel, de fármacos enantiopuros, agroquímicos y compuestos con propiedades saborizantes [9].

Los genes de muchas enzimas lipolíticas de bacterias han sido identificados, clonados, expresados y las enzimas correspondientes se han caracterizado. La secuencia de las lipasas revela un pentapéptido altamente conservado, el cual consiste en Gly-X₁-Ser-X₂-Gly. Muchas de estas enzimas han sido cristalizadas y su estructura tridimensional característica se ha determinado, mostrando un patrón de plegamiento conservado, llamado α/β hidrolasa [10].

1.1.1. Estructura tridimensional.

Los estudios realizados a principios de los 90s con cristalografía de rayos X ayudaron a elucidar la estructura de las lipasas y a comprender su funcionalidad. El patrón común de plegamiento de todas las lipasas es una estructura α/β abierta también llamada α/β hidrolasa por su presencia en este tipo de enzimas [11]. La familia de enzimas con plegamiento α/β hidrolasa están relacionadas estructuralmente con diversas funciones catalíticas. Los miembros de esta familia incluyen acetilcolinesterasas, lipasas, tioesterasas, serina carboxipeptidasas, prolina iminopeptidasas, prolina oligopeptidasas, haloalcano deshalogenasas, haloperoxidasas, epóxido hidrolasas, hidroxonitrilo liasas y otras [10].

El plegamiento α/β hidrolasa típico consiste de una hoja β central formada por ocho hebras β mayoritariamente paralelas, con la segunda hebra (β_2) antiparalela al resto, rodeada de seis hélices α (Figura 1- 1). La hoja β central se curva en forma de medio barril y presenta un torcimiento tal que la primera (β_1) y la última hebra (β_8) están orientadas en un ángulo de aproximadamente 90° . Las hebras paralelas β_3 a β_8 están unidas por hélices α localizadas alrededor de la hoja β central, donde la primera (α_A) y última hélice (α_F) se localizan a un lado de la hoja β central, mientras el resto de las hélices se localizan en el lado opuesto de la hoja [10]. La curvatura de la hoja β central puede variar significativamente a través de las distintas enzimas, al igual que la posición espacial de las hélices α [12].

La estructura de las lipasas conocidas hasta ahora obedece al plegamiento α/β hidrolasa con algunas variaciones. Las lipasas de *B. glumae*, *B. cepacia* y *C. viscosum* tienen 6 hebras paralelas en la hoja β central. La lipasa de *S. exfoliatus* presenta el plegamiento completo con una hebra β antiparalela adicional como β_9 . Sin embargo la mayor variación se ha encontrado en las lipasas más pequeñas de *Bacillus* y las lipasas con mayor peso molecular de las especies de *Staphylococcus* [12].

El sitio activo de las enzimas con un plegamiento α/β hidrolasa consiste de tres residuos: un residuo nucleofílico que puede ser serina, cisteína o aspártico, un residuo ácido que puede ser aspártico o glutámico y un residuo invariable de histidina, siempre en este orden en la secuencia de aminoácidos [12]. Dichos residuos de la triada catalítica están posicionados en asas que son las mejor conservadas dentro del plegamiento. El residuo nucleofílico del sitio catalítico (Ser, Cys o Asp) se localiza en una asa cerrada entre la hoja β_5 y la siguiente hélice α_C , un motivo estructural llamado el “codo nucleofílico”, que permite el ataque eficiente del nucleófilo al sustrato. Un aspecto importante del sitio activo es el arreglo espacial de los formadores de puentes de hidrógeno, que conforman la “cavidad oxianiónica”, que estabiliza el estado de transición del oxianión de la reacción catalizada [10]. El residuo ácido catalítico (Asp o Glu) está localizado en el asa que conecta la hebra β_7 con la hélice α_E , mientras que la histidina catalítica se encuentra en un asa que sigue a la hebra β_8 de la hoja central.

En casi todas las lipasas estudiadas el centro catalítico está cubierto por una o más vueltas superficiales. El largo y complejidad de esta estructura anfipática llamada “tapa”, depende de cada enzima [12,13,14]. Este subdominio se encuentra en el lado carboxílico de la hoja β central, el cual tiene un papel importante en la definición de la forma y en la accesibilidad del sustrato a la enzima. La elucidación de la estructura

tridimensional de algunas lipasas revela que la activación interfacial se debe a este dominio o “tapa” que cubre el sitio activo [10,14]. La tapa puede consistir de una o dos hélices α cortas o una región de asa. En ausencia de la interfase agua-lípido el sitio activo se encuentra cubierto por la tapa, sin embargo, en la presencia de sustratos hidrofóbicos, la tapa se abre, permitiendo que los residuos catalíticos tengan acceso al sustrato. Sin embargo, no todas las lipasas presentan esta activación interfacial, notables excepciones son las lipasas de 19 kDa de *B. subtilis* y *B. pumilus* y la lipasa pancreática de cerdo, estas lipasas carecen de una tapa que cubra el sitio activo en la ausencia de una interfase agua-lípido [12].

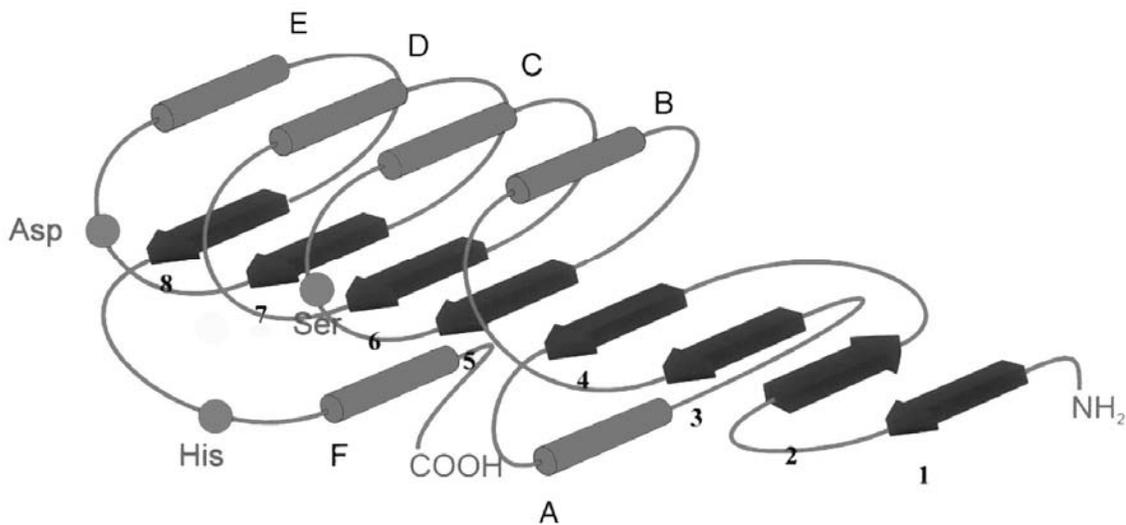


Figura 1- 1. Presentación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa. Las hebras β (1-8) se presentan como flechas, las hélices α (A-F) se indican por cilindros. La posición relativa de los residuos de la triada catalítica (nucleófilo-histidina-ácido) se indica por círculos [15].

1.1.2. Mecanismo catalítico.

Las lipasas son capaces de catalizar reacciones tanto en sistemas acuosos (hidrólisis) como en medios orgánicos (transesterificación y síntesis). En las reacciones de hidrólisis, actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los triacilglicerolos para liberar ácidos grasos y glicerol. La actividad de estas enzimas recae principalmente en la triada catalítica formada por el residuo nucleofílico, Ser (perteneciente al conservado pentapéptido consenso Gly-X-Ser-X-Gly), el residuo ácido (Asp o Glu) y el residuo de Histidina [16]. Esta triada catalítica es similar a la observada en las proteasas de serina, y por lo tanto, la catálisis procede en una manera similar a éstas [12].

El mecanismo para la hidrólisis o formación de ésteres es esencialmente el mismo para lipasas y esterasas y se puede describir en cuatro pasos, como se muestra en la Figura 1- 2. Primero el sustrato se asocia a la enzima formando un complejo no covalente enzima-sustrato. La nucleofilicidad del residuo de Ser de la triada catalítica es aumentada por la transferencia del protón del grupo hidroxilo al anillo de imidazol de la His catalítica, dejando a la Ser con carga negativa. Dicha transferencia es facilitada por la presencia del ácido catalítico (Asp o Glu) que por su carga negativa estabiliza la protonación de la His adyacente. Esto es seguido por el ataque del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del residuo nucleofílico de serina activado sobre el carbono del carbonilo del enlace éster susceptible del sustrato para formar el primer intermediario tetraédrico. Este intermediario se caracteriza por una carga negativa en el átomo de oxígeno del carbonilo del enlace éster y cuatro átomos ligados al átomo de carbono del carbonilo con un arreglo tetraédrico. El intermediario es estabilizado por el macro dipolo de la hélice α C y los puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo cargado negativamente (oxianión) y al menos dos grupos NH- de cadenas laterales, lo que se conoce como cavidad oxianiónica. En esta etapa el componente ácido del sustrato es esterificado a la serina nucleofílica formando un complejo covalente acilo-enzima y el componente alcohol es liberado. La siguiente etapa es el paso de deacilación, en la que ocurre el ataque de un nucleófilo (agua en hidrólisis o alcohol en alcoholisis) al intermediario covalente. La histidina catalítica activa la molécula de agua tomando un protón de ésta dejando un ion OH^- , el cual ataca al átomo de carbono del carbonilo del grupo acilo covalentemente ligado a la Ser. Un segundo intermediario tetraédrico negativamente cargado se forma y estabiliza por las interacciones de la cavidad oxianiónica. Entonces, la His dona un protón al átomo de oxígeno del residuo de Ser activada liberando al componente acilo formando un ácido carboxílico o un éster. Después de la difusión del producto, la enzima libre está disponible para otro ciclo de catálisis [12,15].

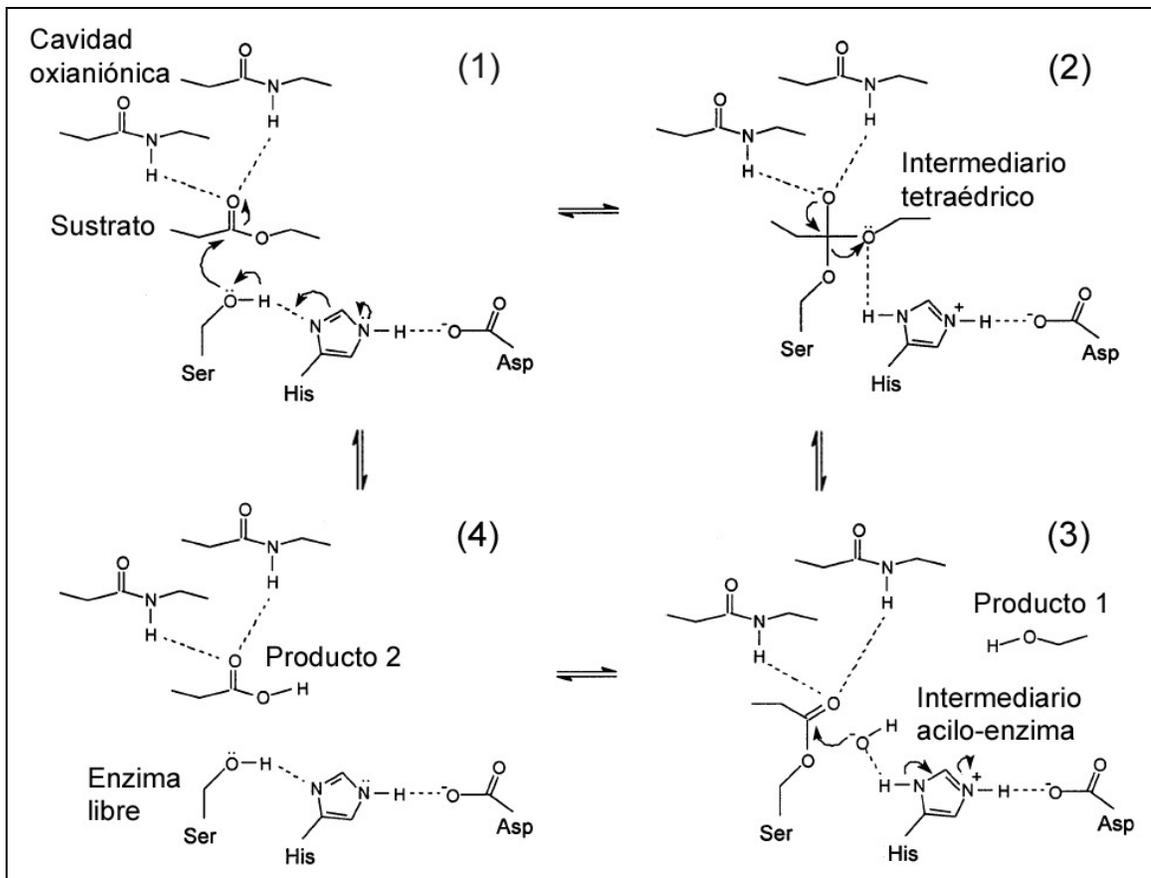


Figura 1- 2. Mecanismo de reacción de Lipasas. (1) Asociación del sustrato, activación del residuo nucleofílico de Ser por la His adyacente y ataque nucleofílico del carbono carbonilo del sustrato por el O⁻ del grupo hidroxilo de Ser. (2) Intermediario tetraédrico estabilizado por interacciones con dos grupos NH-. (3) Se libera la molécula de alcohol. El ion OH⁻ de la molécula de agua activada por la His catalítica desarrolla un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo del intermediario covalente acilo-enzima. (4) El residuo de His dona un protón al átomo de oxígeno de la Ser. El producto acilo es liberado. Imagen modificada de Jaeger y col., 1999.

1.1.3. Clasificación de lipasas bacterianas.

Jaeger y col. (1999) Introdujeron dos criterios para considerar a una enzima lipolítica como lipasa “verdadera” [11,12]:

- Ser activada cuando se encuentre en presencia de una interfase, es decir, su actividad debe incrementarse notablemente cuando el sustrato forma una emulsión, fenómeno denominado activación interfásial;
- Presentar un oligopéptido que cubra el sitio activo de la enzima denominado “tapa”, que al contacto con la interfase sea desplazado del mismo y permita la entrada del sustrato para llevar a cabo la catálisis.

De acuerdo con la especificidad de sustrato las lipasas pueden clasificarse en 3 grupos [7,17,18]:

- **Lipasas inespecíficas:** hidrolizan el enlace éster de cualquier posición en el triacilglicerol sin importar la saturación ni longitud de la cadena con velocidades de conversión muy similares. Estas enzimas pueden hidrolizar totalmente el sustrato.
- **Lipasas específicas de acuerdo a posición:** sólo rompen los enlaces en las posiciones 1 y 3 de triacilglicéridos y producen 2,3-diglicéridos y 2-monoglicéridos. Después de un periodo largo el residuo de ácido graso en el 2-monoglicérido migra a la posición número 1 y genera 1-monoglicérido, que es hidrolizado fácilmente.
- **Lipasas específicas de acuerdo a ácidos grasos:** lipasas que discriminan con base en la longitud y saturación de cadena del ácido graso.

Arpigny y Jaeger (1999) con el propósito de contribuir a una rápida identificación y una fácil caracterización de enzimas lipolíticas provenientes de bacterias clasificaron más de 50 esterasas y lipasas de bacterias agrupándolas en 8 familias con base en la comparación de los motivos de las secuencias de aminoácidos (homología) y algunas propiedades biológicas fundamentales de estas enzimas, sin embargo se han hecho varias extensiones a la clasificación original [6,11].

Familia I: Comprende a las lipasas verdaderas, las cuales incluyen aquellas provenientes de *Pseudomonas*, organismos Gram-positivos y algunas otras lipasas. Es dividida en 7 subfamilias:

- Subfamilia I.1: el peso molecular aproximado es de 30-32 kDa, además de ser secretadas por la vía tipo II.
- Subfamilia I.2: presentan un peso molecular de aproximadamente 33 kDa debido a una inserción en la secuencia de aminoácidos que forma una doble hoja β -antiparalela en la superficie de la molécula.
- Subfamilia I.3: se caracterizan por un peso molecular mayor al de las subfamilias I.1 y I.2, (*Pseudomonas fluorescens*, 50 kDa; *Serratia marcescens*, 65 kDa) y la ausencia de un péptido señal y de residuos de cisteína. La secreción de este tipo de enzimas ocurre en un solo paso a través de la vía tipo I (también llamada exportador ABC).

- Subfamilia I.4: lipasas conocidas de *Bacillus*, las cuales tienen en común que en el pentapéptido consenso el primer residuo de Gly es remplazado por un residuo de Ala, quedando Ala-X₁-Ser-X₂-Gly. Son las lipasas mas pequeñas (aproximadamente 20 kDa) conocidas hasta ahora, y comparten poca similitud de secuencia (15%) con las otras lipasas de *Bacillus*.
- Subfamilia I.5: la similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas lipasas es más del 91%, con masas moleculares de aproximadamente 45 kDa. Poseen 2 residuos de cisteína que participan en la formación de un enlace disulfuro responsable de la estabilidad térmica de la enzima.
- Subfamilia I.6: con peso molecular de aproximadamente 75 kDa. Las lipasas de *Staphylococcus* presentan gran similitud en su secuencia de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas, además de ser secretadas como precursoras de las proteínas maduras. Entre las lipasas verdaderas, la de *Staphylococcus hyicus* es la única que presenta una actividad fosfolipídica considerable.
- Subfamilia I.7: su región central presenta una similitud de aproximadamente 50%, comparadas con las lipasas de *Bacillus subtilis* y las de la subfamilia I.2. Sin embargo no hay similitud entre la lipasa de *Streptomyces cinnamoneus* y otras de *Streptomyces* conocidas hasta ahora.

Familia II (GDSSL): las esterases que lo conforman no presentan el pentapéptido convencional sobre el residuo de la serina, sino que presentan un motivo de secuencia Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)], el cual yace mucho más cerca del N-terminal que en otras enzimas lipolíticas.

Familia III: Exhiben un plegamiento auténtico de α/β hidrolasa y contienen una triada catalítica típica. Muestran aproximadamente un 20% de similitud en su secuencia de aminoácidos con las isoformas intracelulares y plasmáticas del PAF-AH (“Platelet-activating-factor acetylhidrolase”) humano, las cuales son proteínas monoméricas.

Familia IV (HSL): la integran lipasas de bacterias, que exhiben una considerable similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a la HSL de mamíferos (lipasas sensibles a hormonas). Éstas presentan una relativa alta actividad a bajas temperaturas (menos de 15 °C).

Familia V: Proceden de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*), psicrófilas (*Moraxella sp.*, *Psychrobacter immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Estas proteínas comparten una similitud significativa en su secuencia de aminoácidos (20-25%) con

enzimas no lipolíticas llamadas epóxido hidrolasas, deshalogenasas y haloperoxidasas, las cuales poseen una estructura α/β hidrolasa así como la triada catalítica.

Familia VI: las enzimas de esta familia son las esterasas más pequeñas conocidas actualmente con un peso molecular de aproximadamente 23-26 kDa. Exhiben una similitud en la secuencia de aminoácidos de aproximadamente 40% con lisofosfolipasas eucarióticas (fosfolipasas A_2 independientes de Ca^{2+}).

Familia VII: son esterasas de bacterias con un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, que comparten un 40% de similitud y 30% de identidad en la secuencia de aminoácidos con acetilcolina esterasas eucarióticas y carboxilesterasas de hígado e intestino.

Familia VIII: está formada por enzimas de aproximadamente 380 residuos y muestran una considerable similitud con varias β -lactamasas clase C. El sitio activo de estas esterasas involucra un motivo conservado de Ser- X_1 - X_2 -Lys en la parte N-terminal. Sin embargo Kim y col. (1994) han sugerido que en el sitio activo se presenta una secuencia Gly- X_1 - X_2 -Gly, por lo que es necesaria más información estructural para describir claramente esta familia de esterasas.

1.1.4. Fuentes de obtención.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por plantas, animales y microorganismos [11]. Las lipasas de origen microbiano, principalmente bacteriales y fúngicas, representan la clase más ampliamente empleadas en aplicaciones biotecnológicas a causa de la variedad de actividades catalíticas disponibles, la versatilidad de sus aplicaciones, la facilidad de su producción en masa y de su manipulación genética [9].

Las lipasas de bacterias son en su mayoría extracelulares y su producción es influenciada por factores nutricionales y fisicoquímicos como temperatura, pH, fuentes de nitrógeno y carbono, presencia de lípidos, sales inorgánicas, agitación y concentración de oxígeno disuelto. Las lipasas se producen generalmente en la presencia de una fuente de lípidos como aceite o cualquier otro inductor como triacilglicerol, ácidos grasos, ésteres hidrolizables, tweens, sales biliares y glicerol [7].

A pesar de las numerosas fuentes disponibles de bacterias productoras de lipasas, sólo unas pocas son explotadas comercialmente, ya sean silvestres o recombinantes. De éstas los géneros de mayor importancia son: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas*.

Cabe señalar que cepas taxonómicamente cercanas pueden producir lipasas de diferentes tipos. Para muchas de las aplicaciones comerciales de las enzimas es necesario un cierto grado de pureza dependiendo de la aplicación final (ej. Industria farmacéutica o de cosméticos) [7].

1.1.5. Aplicación industrial.

Las lipasas representan un grupo extremadamente versátil de enzimas bacterianas extracelulares que son capaces de desarrollar una variedad de reacciones importantes. El papel fisiológico de las lipasas es hidrolizar los enlaces éster carboxílicos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. En adición a su función natural las lipasas pueden catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos. Esta versatilidad hace a las lipasas enzimas con aplicaciones potenciales en la industria de alimentos, detergentes, farmacéuticos, agroquímicos, pieles, textiles, cosméticos, perfumería, papel, uso como biosensor y en bioremediación [9].

Las lipasas aisladas de diferentes microorganismos han sido estudiados extensamente y con base en sus propiedades (peso molecular, pH y temperatura óptima, estabilidad, especificidad de sustrato, etc.) usadas en varias industrias. Las lipasas son valiosos biocatalizadores a causa de su alta estabilidad en solventes orgánicos, especificidad de sustrato y el comportamiento químico-, regio- y enantioespecífico que usualmente presenta su catálisis [9].

Hasan y col. (2006) resumen algunas de las aplicaciones de lipasas en diferentes industrias:

Industria de los detergentes: La aplicación más importante para lipasas hidrolíticas es su adición a detergentes, los cuales son utilizados principalmente en hogares y lavanderías industriales. En 1994, Novo Nordisk introdujo la primera lipasa recombinante, *Lipolase* proveniente del hongo *Thermomyces lanuginosus* y que fue expresada en *Aspergillus oryzae*. En 1995, dos lipasas bacterianas fueron introducidas al mercado, *Lumafast* proveniente de *Pseudomonas mendocina* y *Lipomax* procedente de *Pseudomonas alcaligenes*, ambas producidas por Genecor Internacional [9].

Industria alimenticia: La modificación de grasas y aceites tiene gran potencial como sustitutos de productos como la mantequilla de cacao. La posición, longitud y grado de insaturación de los triacilgliceroles influyen fuertemente, no sólo en las propiedades físicas, sino también en el valor nutricional de los alimentos. Además, los

ácidos grasos producidos por la acción hidrolítica de lipasas, pueden determinar la aparición de sabores y olores deseables o desagradables. Por ejemplo, en la industria láctea se usan lipasas para la hidrólisis de la grasa de leche, la aceleración en la maduración de algunos quesos y la modificación de grasa en crema y mantequilla. Se han desarrollado preparaciones de lipasas microbianas para la manufactura industrial de queso: *Mucor meihei* (Piccnate, Gist-Brocades; Palatase M, Novo Nordisk), *A. niger* y *A. oryzae* (Palatase A, Novo Nordisk; Lipase AP, Amano; Flavour AGE, Chr. Hansen) y muchas otras [9].

Industria farmacéutica: La lipasa de *Candida rugosa* ha sido usada para sintetizar lovastatina, un medicamento que disminuye los niveles de colesterol. La lipasa de *Serratia marcescens* es utilizada en la hidrólisis asimétrica del 3-fenilglicinato, el cual es un intermediario clave en la síntesis de clorhidrato de diltiazem, un vasodilatador ampliamente usado [9].

Industria del papel: El "pitch" es una resina de la madera compuesta de triacilglicerol y ceras que causa pegajosidad en el proceso de obtención de papel, dando como resultados un papel disperejo y con huecos. Para evitarlo Nippon Paper Industries en Japón, desarrolló un método que controla esta resina utilizando la lipasa de *Candida rugosa* que hidroliza más del 90% de los triacilglicerol presentes [9].

Industria cosmética: Algunos derivados de retinol usados en productos para el cuidado de la piel, son preparados por reacciones catalíticas de lipasas inmovilizadas. La lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* es utilizada como biocatalizador para producción emolientes con mejor calidad [9].

Producción de biodisel: La lipasa inmovilizada de *P. cepacia* es usada en la transesterificación de aceite de soya con metanol y etanol en la búsqueda de fuentes alternativas de combustible. *Novozym 435* ha sido utilizada también en la producción de este biodisel. *Novozym 435* y *Lipozyme IM* han sido usadas en la preparación de etil ésteres de ácidos grasos de aceite de ricino [9].

1.2. Lipasas del género *Bacillus*.

Dentro del género *Bacillus* están clasificados los bacilos aerobios capaces de formar endoesporas y que presentan un gran número de especies debido a cierta ambigüedad en su clasificación original. Son bacilos largos, formadores de endoesporas, presentan reacción de Gram positiva y reacción catalasa positiva. Se ha reconocido como un género normalmente no patógeno para el humano.

Bacillus subtilis es tal vez la bacteria más estudiada después de *Escherichia coli*. Su genoma, proteoma y secretoma ha sido estudiado en gran detalle. Las lipasas producidas y secretadas por *B. subtilis* tienen sustancial interés biotecnológico y han sido identificadas, clonadas y caracterizadas.

La lipasa LipA de *B. subtilis* es codificada por el gen *lipA*, el cual ha sido clonado, expresado y la correspondiente enzima de 19 kDa purificada y cristalizada. Ésta es la primera estructura tridimensional (3D) determinada para la familia de lipasas I.4 [19]. Su estructura 3D, como se puede ver en la Figura 1- 3, revela un plegamiento α/β hidrolasa compacto con 6 hebras β paralelas (carece de las 2 primeras hebras β de el plegamiento canónico) acomodadas en una hoja β central rodeada por 5 hélices α , dos de un lado de la hoja central y las otras 3 en el lado opuesto [20]. El sitio activo de LipA formado por los residuos Ser77, Asp133 e His 156 (los cuales se encuentran cercanos en la estructura) al igual que los residuos que forman la cavidad oxianiónica (Ile12, Met78) se encuentran en posiciones similares a las observadas en otras lipasas de estructura conocida. Sin embargo, no se encuentra presente el dominio de la “tapa” y el nucleófilo del sitio activo (Ser77) se encuentra expuesto [19,21].

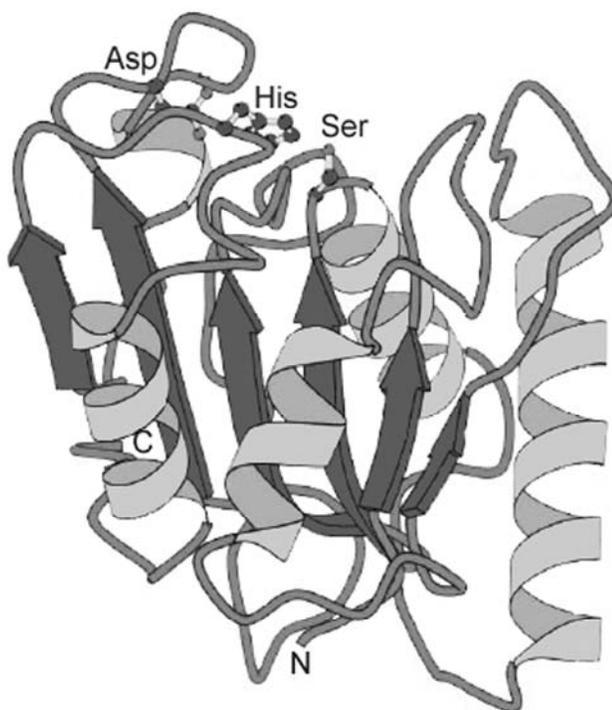


Figura 1- 3. Estructura tridimensional de la lipasa LipA de *B. subtilis*. Se indican los residuos de la triada catalítica conformada por Ser77, Asp 133 e His 156. Las letras N y C indican los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente [21].

Varias publicaciones describen la clonación, expresión, purificación y caracterización bioquímica de las lipasas de especies de *Bacillus*. La purificación de las lipasas de *Bacillus* para su caracterización bioquímica y estudios cristalográficos es difícil, principalmente debido al mecanismo regulador de su síntesis, el cual suele dar como resultado bajos niveles de producción. La purificación de muchas lipasas de *Bacillus* se complica aún más por el uso de sustratos hidrofóbicos como inductores para la producción de la lipasa. El problema de baja producción y dificultades asociadas con los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas puede ser aliviado por la sobre-expresión de los genes que codifican las lipasas de *Bacillus* como proteínas recombinantes en sistemas de expresión eficientes, seguido por la purificación por cromatografía de afinidad [6].

Una comparación de las lipasas maduras pertenecientes a la subfamilia I.4, producidas por *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, revela proteínas de 181 aminoácidos, las cuales comparten una identidad en la secuencia de aminoácidos del 80%. Las lipasas de *B. licheniformis* y *B. pumilus* tienen una identidad en la secuencia de aminoácidos de 96%. El análisis computacional y los datos experimentales de estas lipasas sugieren que son proteínas extremadamente básicas con valores de pI superiores a 9.2 y pesos moleculares (PM) de aproximadamente 19 kDa. Es notable que estas lipasas carecen de residuos de cisteína, implicando la ausencia de puentes disulfuro que estabilicen la molécula. La retención completa de la actividad en presencia de agentes reductores como DTT y 2-mercaptoetanol confirman esta ausencia. Esto sugiere que estas proteínas asumen una estructura terciaria flexible que puede facilitar cambios conformacionales. Estas lipasas son termolábiles y su actividad decrece significativamente a temperaturas mayores de 45°C sin embargo exhiben una actividad óptima en condiciones alcalinas, con un máximo a valores de pH entre 9.5 y 12 [6].

Las lipasas de *B. thermocatenulatus*, *B. stearothermophilus* y *B. thermoleovorans* constituyen un grupo adicional de lipasas del mismo género, la subfamilia I.5. Los genes de las lipasas de esta subfamilia codifican para proteínas maduras de 388 residuos de aminoácidos. La similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas lipasas de *Bacillus* es más del 91% con masas moleculares de aproximadamente 43 kDa y valores de pI de 6.2. Estas lipasas poseen dos residuos de cisteína en las posiciones 64 y 295. El tratamiento de estas lipasas con β -mercaptoetanol o DTT reduce la actividad de las lipasas en un 15%, tal vez debido a que el puente disulfuro contribuye a la estabilización. Este grupo de lipasas es

termoestable y retiene actividad a temperaturas mayores de 50°C. Y a pesar de su alta identidad en la secuencia de aminoácidos (mayor al 91%) estas muestran diferentes valores de pH óptimo. La lipasa de *B. thermocatenulatus* exhibe máxima actividad a pH 8.5, la lipasa de *B. stearothermophilus* a pH 9.5, mientras la de *B. thermoleovorans* tiene máxima actividad a pH 7.5 [6].

En la Tabla 1- 1 se resumen características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género *Bacillus*, en la cual se observa que son enzimas alcalófilas.

Tabla 1- 1. Propiedades bioquímicas de lipasas del género *Bacillus* [¡Error! Marcador no definido.].

Lipasas de <i>Bacillus</i>	Masa Molecular (kDa)	Punto isoeléctrico	pH óptimo	Temperatura de estabilidad
<u>Subfamilia I.4</u>				
<i>B. licheniformis</i>	19.2	9.46	10-11.5	<45
<i>B. subtilis</i>	19.3	9.25	10	<45
<i>B. pumilus</i>	19.3	9.43	9.5-10	<45
<u>Subfamilia I.5</u>				
<i>B. thermocatenulatus</i>	43.2	6.37	8.5	>50
<i>B. thermoleovorans</i>	43.1	6.19	7.5	>50
<i>B. stearothermophilus</i>	43.2	6.15	9.5	>50

A pesar de la poca identidad (menos del 15%) en la secuencia de estas dos familias de lipasas de *Bacillus* (I.4 y I.5), a diferencia de las lipasas de otros géneros que presentan el pentapéptido conservado de Gly-X-Ser-X-Gly alrededor de la serina nucleofílica activa, el pentapéptido consenso encontrado en las lipasas de *Bacillus* es Ala-X₁-Ser-X₂-Gly. Donde un residuo de Ala reemplaza el primer residuo de Gly, X₁ es un residuo de His en ambas familias, pero X₂ es Met y Gln en la subfamilia I.4 y I.5 respectivamente [6]. En la Figura 1- 4 se muestra un alineamiento de algunas secuencias de lipasas de éstas familias.

Subfamilia I.4

```

B. pumilus AEHNPVVMVHGIGGASYNFFSIKSYLATQGWDRNQLYAIDFDIKTGNNRNNPRLSRFVK 60
B. licheniformis AEHNPVVMVHGIGGASYNFASIKSYLVGQGWDRNQLFAIDFDIKTGNNRNNPRLSRFVK 60
B. subtilis AEHNPVVMVHGIGGASFNFAGIKSYLVSQWRSRDKLYAVDFWDKGTNYNNGPVLRSRFVQ 60
*****:*****:*. *****. ***.:*:*:** *****
B. pumilus DVLDKGTAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGDKIENVVTTIGGANGLVSSRALPGTDPN 120
B. licheniformis DVLDKGTAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGDKIENVIPIGGANGLVSSRALPGTDPN 120
B. subtilis KVLDKETGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGNKVANVTVGGANRLTTGKALPGTDPN 120
.***:*****:*****:*****:*. **.:** *.:** *****
B. pumilus QKILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGARNILIHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGGQNTN 181
B. licheniformis QKILYTSVYSSADLIVVNSLSRLIGARNVLIHGVGHIGLLTSSQVKGYIKEGLNGGGQNTN 181
B. subtilis QKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNGGGQNTN 181
*****:*****:*. ***** ***** ***** ***** *****

```

Subfamilia I.5

```

B. thermocatenulatus ASPRANDAPIVLLHGFTGWGREEMLGFKYWGGVVRGDIQWLNDNGYRRTYTLAVGPLSSNW 60
B. thermoleovorans AASRANDAPIVLLHGFTGWGREEMFGFKYWGGVVRGDIQWLNDNGYRRTYTLAVGPLSSNW 60
B. stearothermophilus ASPRANDAPIVLLHGFTGWGREEMLGFKYWGGVVRGDIQWLNDNGYRRTYTLAVGPLSSNW 60
*. *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B. thermocatenulatus DRACEAYAQLVGGTVDYGAHAHAAKHGHARFGRTYPGLLPELKRGGRVHIIAHSQGQTAR 120
B. thermoleovorans DRACEAYAQLVGGTVDYGAHAHAAKHGHARFGRTYPGLLPELKRGGRIHIIAHSQGQTAR 120
B. stearothermophilus DRACEAYAQLVGGTVDYGAHAANDGHARFGRTYPGLLPELKRGGRVHIIAHSQGQTAR 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B. thermocatenulatus MLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHFVLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFTRDF 180
B. thermoleovorans MLVSLLENGSQEEREYAKAHNVLSPLFEGGHHFVLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFTRDF 180
B. stearothermophilus MLVSLLENGSQEEREYAKEHNVLSPLFEGGHRFVLSVTTIATPHDGTTLVNMVDFTRDF 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B. thermocatenulatus FDLQKAVLKAAAVASNVPYTSQVYDFKLDQWGLRRQPGESFDHYFERLKRSPVWTSTDTA 240
B. thermoleovorans FDLQKAVLEAAAVASNVPYTSQVYDFKLDQWGLRRQPGESFDHYFERLKRSPVWTSTDTA 240
B. stearothermophilus FDLQKAVLEAAAVASNAPYTSSEIYDFKLDQWGLRREPESFDHYFERLKRSPVWTSTDTA 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
B. thermocatenulatus RYDLSIPGAEKLNQWVQASPNYYLSFSTERTHRGALTGNYPPELGMNFAVVCAPFLG 300
B. thermoleovorans RYDLSVSGAEKLNQWVQASPNYYLSFATERTYRGALTGNYPPELGMNFAVVCAPFLG 300
B. stearothermophilus RYDLSVPGAETLNRWVKASPNYYLSFSTERTYRGALTGNYPPELGMNFAVVCAPFLG 300
*****:*. **.*. **.:** *****:*****:*****:*****:*****:*****
B. thermocatenulatus SYRNEALGIDDRWLENDGIVNTVSMNGPKRGSDDRIVPYDGLTKKGVWMDMGTGCVNDHLE 360
B. thermoleovorans SYRNPTLGIIDDRWLENDGIVNTVSMNGPKRGSDDRIVPYDGLTKKGVWMDMGTYNVDHLE 360
B. stearothermophilus SYRNAALGIDSHWLGNDGIVNTISMNGPKRGSNDRIVPYDGLTKKGVWMDMGTYKVDHLE 360
**** :****.:** *****:*****:*****:*****:*****:***** :*****
B. thermocatenulatus VIGVDPNPSFDIRAFYLRLAEQLASLRP 388
B. thermoleovorans IIGVDPNPSFDIRAFYLRLAEQLASLRP 388
B. stearothermophilus VIGVDPNPSFNIRAFYLRLAEQLASLRP 388
:*****:*****:*****:*****

```

Figura 1- 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de lipasas maduras de distintas especies de *Bacillus*. La alineación se realizó con CLUSTALW. El asterisco (*) indica identidad de aminoácidos en todas las secuencias mostradas. El punto (.) y dos puntos (:) denotan identidad de aminoácidos en al menos dos secuencias. El pentapéptido conservado se muestra resaltado y subrayado. Las secuencias de aminoácidos fueron tomadas de la base de datos GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y se han seguido los siguientes números de acceso: *B. pumilus* (A34992), *B. licheniformis* (AJ297356), *B. subtilis* (M74010), *B. thermocatenulatus* (X95309), *B. thermoleovorans* (AF134840), *B. stearothermophilus* (U78785) [6].

La posición de los residuos del sitio catalítico de LipA de *B. subtilis* es Ser77, Asp133 e His 156, la cual coincide con la presentada por las lipasas de *B. pumilus* y *B. licheniformis*. Dicha posición es confirmada por la estructura tridimensional de LipA que muestra la cercanía de estos residuos formando la triada catalítica [21]. Con base en la similitud en la secuencia de aminoácidos y el modelo estructural de varias lipasas, la posición putativa de la triada catalítica para las lipasa de *B. thermocatenulatus*, *B. stearothermophilus* y *B. thermoleovorans* es Ser-113, Asp-317 e His-358 [22].

Como ya se mencionó, no todas las lipasas presentan activación interfacial. Hay lipasas que carecen de la tapa que cubre el sitio activo y no muestran activación en interfase agua-lípido. Esto aplica para las lipasas de *B. subtilis* y *B. pumilus*, las cuales son las mas pequeñas que se conocen [23].

Se ha encontrado un péptido señal de 31 residuos de aminoácidos en LipA de *B. subtilis*, de 34 aminoácidos en la lipasa de *B. pumilus* B26 y de 29 aminoácidos en la enzima de *B. thermocatenulatus* [21,24,25]. Dicho péptido señal es cortado durante o inmediatamente después de la translocación de la proteína vía la ruta Sec [23]. Todas las lipasas de *Bacillus* presentan pH óptimos alcalinos e hidrolizan preferencialmente sustratos con ácidos grasos de cadena-corta y media [20,24].

Se han aislado lipasas para uso industrial de distintas especies del género *Bacillus* dentro de las cuales se encuentran aquellas provenientes de *B. subtilis*, *B. thermoleovorans* (*Geobacillus thermoleovorans*), *B. thermocatenulatus* y *B. coagulans*.

1.3. Manufactura de quesos.

Enzimas obtenidas de fuentes animales, plantas y microorganismos han sido usadas desde la antigüedad para la manufactura de queso y otros alimentos [26].

La leche bovina típicamente tiene entre 3.5- 5% de grasa en forma de glóbulos emulsificados, con un diámetro de entre 0.1 a 10 μ m. Por lo tanto, la leche puede ser descrita como una emulsión lípido-en-agua conformada por glóbulos de grasa dispersos. Estos glóbulos son rodeados y estabilizados por una membrana delgada [5].

La grasa de la leche está compuesta principalmente por triacilgliceroles, los cuales representan el 98% de la fracción lipídica total. El 2% restante lo comprenden diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides y trazas de vitaminas solubles en grasa, A, D, E y K [27].

En los lípidos de la leche de rumiantes existe una amplia variedad de ácidos grasos y han sido identificados mas de 400 distintos en la grasa de leche bovina. Sin embargo, sólo 10 ácidos grasos son de importancia cuantitativa: ácido butanoico, (C4:0), ácido hexanoico (C6:0), ácido octanoico (C8:0), ácido decanoico (C10:0), ácido dodecanoico (C12:0), ácido tetradecanoico (C14:0), ácido hexadecanoico (C16:0), ácido octadecanoico (C18:0), ácido *cis*-9-octadecenoico (C18:1), ácido *cis*, *cis*-9,12-octadecadienoico (C18:2), y ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C18:3). Los ácidos hexadecanoico y octadecanoico son los más abundantes, comprendiendo el 25 y 27% del total de los lípidos respectivamente, en la grasa de leche bovina [26,5].

Algunas de las características más notables del perfil de ácidos grasos, que presentan los lípidos de leche bovina, incluye el alto nivel de ácido butanoico (y de hecho en las únicas grasas que se encuentra este ácido es en la de rumiantes [27]) y otros ácidos grasos de cadena corta, así como los bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados y el hecho de que estos lípidos sean ricos en ácidos grasos de cadena mediana [5]. Los principales ácidos grasos presentes en la grasa de la leche de vaca se presentan en la Tabla 1- 2.

Tabla 1- 2. Principales ácidos grasos en la grasa de leche bovina. Porcentaje en peso del total de la fracción lipídica [27].

Ácidos grasos	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20-22
%	3.3	1.6	1.3	3.0	3.1	9.5	26.3	2.3	14.6	29.8	2.4	0.8	trazas

La posición de los ácidos grasos en los triacilgliceroles no es aleatoria, la posición “sn” de los ácidos grasos denota su posición en el esqueleto de glicerol. Los ácidos grasos pueden ser esterificados en las posiciones 1, 2 ó 3, como se muestra en la Figura 1- 5. Los C4:0 y C6:0 se localizan predominantemente localizados en las posiciones sn-3 y sn-,1 respectivamente. Conforme el largo de cadena incrementa hacia C16:0, aumenta la proporción de esterificación en la posición sn-2. C18:0 generalmente se localiza en la posición sn-1 mientras los ácidos grasos insaturados se esterifican en la sn-1 y sn-3 [5].

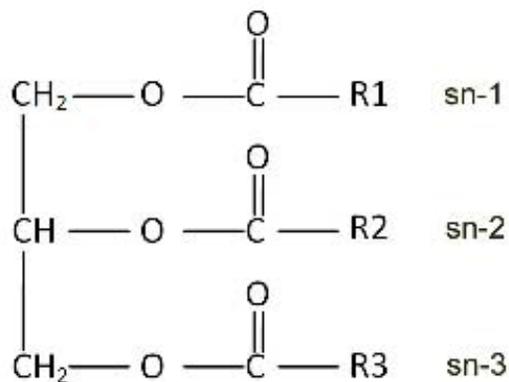


Figura 1- 5. Estructura de los triacilgliceroles. R: $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$.

Las características individuales (sabor, aroma, textura) de los diferentes tipos de quesos son el resultado de una serie de cambios bioquímicos que ocurren en el cuajo durante la maduración a causa de la acción de microorganismos y enzimas de diferentes fuentes [27]. Los numerosos compuestos involucrados en el desarrollo del aroma y sabor de los quesos son derivados de las principales rutas metabólicas (glicólisis, lipólisis, proteólisis y metabolismo de citrato) seguidas por reacciones secundarias sobre los compuestos producidos en estas primeras reacciones (ej. desaminación, descarboxilación, desulfurilación de aminoácidos, β oxidación de ácidos grasos) [28].

La grasa de la leche es esencial para el desarrollo del sabor correcto en quesos durante la maduración, lo que se ha demostrado en estudios con quesos hechos a partir de leche en la que la grasa original fue reemplazada por otros lípidos. Estos quesos no desarrollaron el sabor correcto [5].

La hidrólisis enzimática de los triacilgliceroles presentes en los lípidos de la leche, conocida como lipólisis, resulta en la formación de ácidos grasos y glicerol, monoglicéridos o diglicéridos, y es esencial en el desarrollo del sabor en algunas variedades de quesos. Las lipasas en el queso son originadas por seis fuentes posibles: 1) leche, 2) renina, 3) cultivos iniciadores, 4) cultivos adjuntos a los iniciadores, 5) bacterias no iniciadoras y posiblemente, 6) la adición de lipasas exógenas en el queso [5].

Los ácidos grasos liberados a causa de la lipólisis contribuyen directamente al sabor del queso aportando cada uno una nota característica de sabor, los de cadena corta y media (C4:0-C12:0) proporcionan un sabor deseable, suave y penetrante, mientras que los de cadena media y larga (C12 y C14) tienden a impartir un sabor desagradable y jabonoso en el producto [9,29]. Los ácidos grasos libres también sirven como sustratos en una serie de reacciones catabólicas posteriores, permitiendo la producción de otros compuestos (metabolitos secundarios) que dan sabor y aroma, tales como, metil cetonas, lactonas, ésteres, aldehidos y alcoholes secundarios [5].

La teoría sugiere que el sabor característico de un queso se debe al balance de sabores aportados por un número de compuestos, los cuales deben estar presentes en ciertos niveles y en la correcta proporción, para producir el sabor típico de una variedad dada. Para algunas variedades de queso, se reconocen compuestos específicos como los de mayor contribución al sabor, es decir, el sabor está dominado por compuestos particulares [5].

En el caso de quesos italianos duros como el Romano, el Parmesano y el Provolone, los ácidos grasos libres son los que contribuyen significativamente al sabor. De estas tres variedades italianas, el queso Romano tiene una concentración relativamente alta de ácidos grasos libres (ácido butanoico 175.6 mg/kg, ácido hexadecanoico 78.5 mg/kg y ácidos grasos de 18 carbonos 122.4 mg/kg de queso), el Parmesano la más alta (ácido butanoico 100.5 mg/kg, ácido hexadecanoico 389.6 mg/kg y ácido oleico 347.1 mg/kg de queso), mientras el Provolone contiene niveles intermedios. Los altos niveles de ácido butanoico y ácido hexanoico detectados en queso Limburger están relacionados con el desarrollo del fuerte aroma característico de éste. El queso Mozzarella presenta bajas concentraciones de ácidos grasos libres, lo cual es asociado con su sabor suave. Para los quesos madurados por hongos las metil cetonas son importantes en la contribución del sabor [5].

El papel de ácidos grasos libres en el sabor de queso Cheddar y variedades similares es mucho menos aparente que con las variedades ya mencionadas. Se han reportado bajas concentraciones de ácidos grasos libres en Edam y Colby, los cuales tienen baja intensidad de sabor. Sin embargo, el ácido butanoico parece estar presente en concentraciones suficientemente altas para contribuir al sabor de estos quesos, con un papel menos significativo de otros ácidos grasos libres [5].

Los cambios que ocurren durante la maduración de los quesos, y por ende el sabor, el aroma y la textura, son influenciados por el proceso de manufactura, el cual determina la composición, especialmente la humedad, contenido de NaCl, pH y microorganismos presentes [27].

Las diferentes mezclas de cultivos producen ácido a diferentes velocidades, sin embargo, valores de pH dentro del rango de 5- 6.5 son comunes en la leche después de 6 h de inoculación. El NaCl tiene efecto en la estabilidad y actividad de enzimas microbianas en el ambiente del queso. La maduración del queso se retarda a altas concentraciones de sal. En los quesos la concentración de sal varía de 0.7% a 7% [27].

La leche contiene una lipasa endógena (LPL, lipoprotein Lipase), la cual normalmente no alcanza su actividad total en la leche, dado que más del 90% se encuentra asociada con micelas de caseína en compartimentos distintos al de la grasa, que se encuentra en globulos rodeados por una lipoproteína de membrana (MFGM, milk fat globule membrane). LPL puede ser inactivada extensamente durante la pasteurización y/o puede perderse durante el desuerado de la cuajada, por lo que, representa poca importancia en el proceso de maduración [5,27].

Dado que las enzimas son directamente responsables por muchos de los cambios que ocurren durante la maduración es razonable asumir que ésta pueda ser acelerada por la adición de enzimas exógenas. Con el objetivo de acelerar la maduración, algunos productores de queso han experimentado con la adición de enzimas exógenas, usualmente proteinasas, peptidasas y lipasas a la cuajada [27].

La renina o preparaciones crudas de esterasas pregastricas (PGE, pregastric esterases) son normalmente usadas en la producción de queso Romano, Provolone y otros quesos italianos. La lipasa de *R. miehei* también puede ser usada para quesos italianos, sin embargo es menos efectivo que PGE. Se ha reportado que lipasas de *P. roqueforti* o *P. candidum* también son satisfactorias. Una cepa de *A. oryzae* secreta una lipasa que tiene una especificidad excepcionalmente alta por ácidos C6-C8, esta lipasa comercializada como FlavourAge (Chr. Hansen's, Milwaukee, Wisconsin) es utilizada para acelerar la maduración de queso Cheddar [27].

La grasa de la leche sujeta a lipólisis (LMF, lipolysed milkfat) ha llegado a ser un ingrediente importante en la industria de alimentos. Hay varias aplicaciones reales y potenciales como, aditivo en productos de panadería, cereales, dulces, productos lácteos y gran variedad de otros productos (salsas, aderezos, sazonadores). Bajo condiciones específicas de procesado, la LMF puede exhibir un intenso sabor a queso, en este caso suele usarse en quesos modificados por enzimas [27].

Los ácidos grasos libres de cadena corta juegan un papel crucial en la impartición de sabor a queso. Los ácidos grasos libres de cadena larga también son de importancia, pero su concentración no debe exceder a cierto umbral a fin de evitar sabores jabonosos. Así que la relación entre ácidos grasos de cadena corta y larga en su forma libre es un parámetro importante, el cual depende en gran medida de las enzimas utilizadas [30].

Los procesos modernos de elaboración de productos hechos a partir de leche, involucran la pasteurización (72°C por 15min) de ésta para destruir los microorganismos sensibles al calor. Sin embargo, el deterioro de la leche post-pasteurizada y de productos lácteos está asociado con la presencia de especies de *Bacillus*, ya que pueden sobrevivir a la pasteurización mediante la formación de esporas. Muchas especies de *Bacillus* han sido aisladas de leche, como *B. brevis*, *B. circulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Además, la presencia de patógenos como *B. cereus* puede presentar riesgo de intoxicación y enfermedades. El deterioro de la leche por especies de *Bacillus* se debe

en primer lugar a la producción de proteasas y lipasas [31,32].

1.4. Microorganismo de la lipasa en estudio.

1.4.1. *Bacillus pumilus* QC.

En 2006, Garcia-Saturnino logró aislar una bacteria con actividad lipolítica de una muestra de queso Cotija, un producto tradicional mexicano, tomada de Santa María del Oro, Jalisco [33]. Esta bacteria identificada como *Bacillus pumilus*, fue descrita como una colonia grande, lisa, redonda y de color amarillo opaco. La morfología observada al microscopio la describe como bacilos largos Gram positivos. Su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1- 3. Es catalasa positiva y presenta buena actividad lipolítica al ser sembrada en agar-tributirina (1%) tanto a 37°C como a 4°C, ya que se logran observar halos de actividad al ser incubada a esas temperaturas, dando un coeficiente de tamaño en relación al diámetro del halo y de la colonia de 0.35 y 0.23, respectivamente. Sin embargo, su actividad lipolítica no fue estudiada.

En este trabajo, a esta cepa de *Bacillus pumilus* se le denomina QC por el medio del que fue aislada, el queso Cotija.

Tabla 1- 3. Clasificación taxonómica de *Bacillus pumilus* [34].

Dominio	Bacteria
Phylum	Firmicutes – Gram positivas
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>pumilus</i>

1.4.2. *Bacillus pumilus* GMA1.

En este estudio, para fines comparativos de los resultados en los ensayos realizados, se ocupó la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1, denominada en este trabajo como LipAGMA1-6H.

En 1995, Bustos-Jaimes llevó a cabo el aislamiento de un microorganismo lipolítico, en las aguas termales de Los Azufres, Michoacán. El microorganismo encontrado fue identificado como *Bacillus pumilus* y la cepa se denominó GMA1. Además, se encontró que el microorganismo produce una lipasa con características interesantes de pH y temperatura óptimos, siendo de 10.5 y 50°C, respectivamente [35].

B. pumilus GMA1 es un bacilo largo Gram positivo, capaz de crecer a 50°C produciendo lipólisis de tributirina en placa de agar, también crece a 20°C, no creciendo a 5°C ni a 80°C, presenta formación de esporas terminales y subterminales. En placa a 24 h forma una colonia amarilla pálida de 2.0 a 4.0 mm de diámetro, circular convexa, con bordes mellados, superficie lisa, de aspecto cremoso y textura poco viscosa. Es una bacteria aerobia. Además, presenta actividades xilanolítica y proteolítica [35].

La lipasa de *B. pumilus* GMA1 (BpIA) es homóloga a LipA de *B. subtilis*, presenta un péptido señal de 31 aminoácidos que se pierde durante la secreción al medio extracelular. La lipasa madura, denominada en este estudio LipAGMA1, consta de 181 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa [36]. Su estructura se ha modelado a partir de los datos cristalográficos reportados para LipA dada su homología y alto porcentaje de similitud, 80%. Los residuos pertenecientes a la triada catalítica son Ser77, Asp133 e His156 y presenta el pentapéptido consenso característico Ala-X₁-Ser-X₂-Gly [37].

Se han realizado estudios para la determinación de las propiedades cinéticas de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1, la cual se obtuvo por clonación y sobre-expresado de la lipasa madura en células de *E. coli* BL21, siendo purificada mediante cromatografía de afinidad [37].

El estudio de lipasas se ha extendido debido a las aplicaciones potenciales de estas enzimas en distintos campos de la industria, así como en la investigación. Las lipasas provenientes de microorganismos no patógenos presentan ventajas de manipulación sobre lipasas de microorganismos patógenos, por lo que las lipasas de *Bacillus pumilus* representan una opción de gran utilidad.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *B. pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano.

2.2. Objetivos particulares.

- Obtener la secuencia de la región que codifica para la lipasa.
- Expresar la lipasa por clonación, para determinar:
 - su peso molecular.
 - su punto isoeléctrico.
 - los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m .
- Obtener el perfil de ácidos grasos producidos por hidrólisis de grasa butírica.
- Comparar la actividad enzimática con la de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 bajo condiciones experimentales similares.

3. MÉTODOS Y MATERIALES.

En este capítulo se especifican las sustancias y los equipos utilizados, así como los procedimientos seguidos para lograr la caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de la lipasa de *Bacillus pumilus*.

3.1. Sustancias y materiales.

El microorganismo de estudio es la bacteria *Bacillus pumilus* aislada de un producto lácteo tradicional mexicano, queso Cotija, producido en el municipio de Santa María del Oro, Jalisco [33], al cual se le denominó *B. pumilus* QC, por el medio del que fue aislado. La cepa se encuentra preservada en chaquiras a -70°C en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

La cepa de *Bacillus pumilus* GMA1 fue proporcionada por la Dra. Amelia Farrés González-Saravia en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

La transformante pETbpl, ocupada para la producción de LipAGMA1-6H, fue proporcionada por el Dr. Ismael Bustos Jaimes en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Las sustancias y el equipo utilizado en cada procedimiento se especifican en la descripción de cada procedimiento y en el ANEXO I de protocolos, capítulo 5.

3.2. Desarrollo experimental.

El desarrollo experimental se realizó en dos laboratorios: en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, conjunto "E", de la UNAM, y en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, edificio de investigación, de la UNAM, teniendo que seguir las normas y reglamentos establecidos por cada Departamento y laboratorio.

Además el análisis por cromatografía de gases se llevó a cabo en el Laboratorio 321 del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química, conjunto "E", de la UNAM.

El desarrollo experimental general que se siguió se presenta en el diagrama de flujo de la Figura 3- 1. En las secciones siguientes se describen los procedimientos llevados a cabo y dicha información se apoya con el ANEXO I.

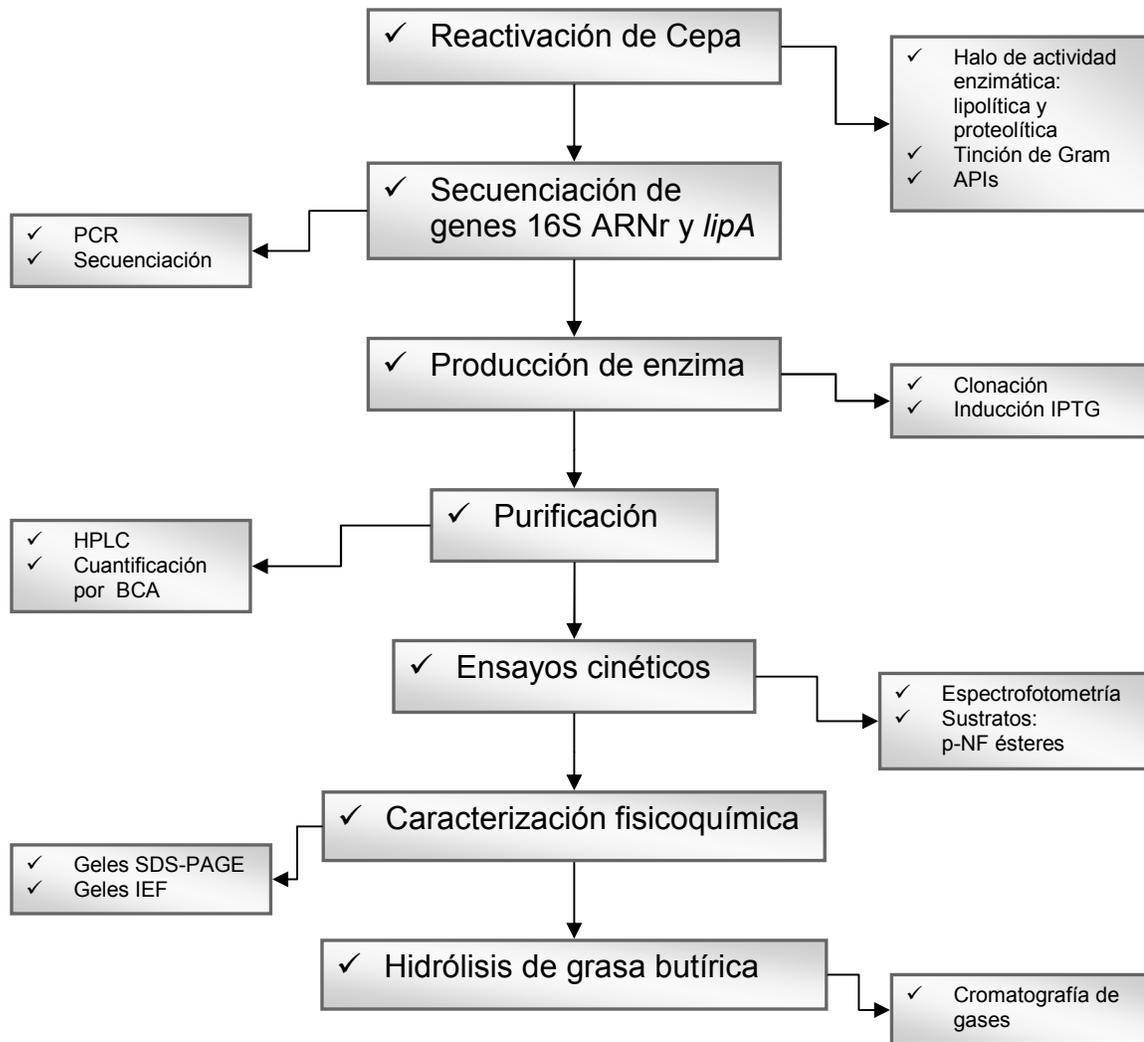


Figura 3- 1. Diagrama de flujo del desarrollo experimental general.

3.2.1. Reactivación de *Bacillus pumilus* QC.

El microorganismo en estudio, *Bacillus pumilus* QC [33] se conserva en un tubo con glicerol (15%) y chaquiras a -70°C , por lo que fue necesaria su reactivación. La metodología de reactivación de la bacteria, previa a su inoculación en otros medios para su utilización, consistió en tomar una chaquiras con un asa estéril y depositarla en un tubo para centrífuga de volumen de 15 mL conteniendo 10 mL de caldo nutritivo, preparado como lo indica el fabricante y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm durante toda la noche.

Los medios utilizados en cada etapa varían dependiendo de la técnica a seguir. En el ANEXO I se especifican los protocolos para la preparación de medios utilizados en cada procedimiento.

3.2.2. Ensayos de actividad enzimática en caja Petri.

Se determinó la actividad lipolítica y proteolítica del microorganismo por ensayos de difusión en agar. Se utilizó agar-tributirina (1%) para la detección de la actividad lipolítica y agar-leche-descremada (1.5%) para la proteolítica. La formulación de los medios se muestra en el ANEXO I.

Una vez reactivado el microorganismo en caldo nutritivo, al que se le hace una tinción selectiva (Tinción de Gram) como se explica más adelante, se siembra en cajas Petri con los medios indicados, utilizando un asa estéril mediante la técnica de dilución por estría a fin de poder obtener colonias aisladas. Las cajas se incubaron en forma invertida en una estufa a 37°C durante toda la noche.

La actividad positiva (degradación del sustrato) se distingue como halos claros de actividad, dado que el medio es opaco, éstos se observan como zonas translucidas alrededor de las colonias, por lo que es necesario obtener colonias aisladas a fin de tener una mejor apreciación de los resultados.

3.2.3. Corroboración de la identificación de la bacteria.

Se hicieron estudios para comprobar la pureza y la identidad del microorganismo después de la reactivación para su utilización. La determinación de la actividad enzimática junto con la caracterización microscópica, las pruebas bioquímicas y la identificación por métodos moleculares, sirvieron para tal fin.

Caracterización microscópica.

La caracterización microscópica del microorganismo se hizo tiñendo un frotis de las colonias aisladas en caja Petri mediante el método de tinción de Gram y la posterior observación al microscopio. El frotis se hizo de colonias aisladas de las cajas de actividad lipolítica y proteolítica después de 20 h de crecimiento. La preparación de los reactivos y el protocolo para la tinción se presenta en el ANEXO I. Al observar con el microscopio las bacterias Gram (+) de *Bacillus pumilus* se deben distinguir bacilos largos de color púrpura.

Pruebas bioquímicas.

Para la comprobación de la identidad del microorganismo se hicieron pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos y derivados (heterosidos, polialcoholes, ácidos urónicos) utilizando las galerías API 50 CH (bioMérieux), las cuales se componen de 50 microtubos. La galería de investigación API 50 CH se adapta a la identificación de *Bacillus* al usar el medio API 50 CHB/E que permite el estudio del metabolismo de 49 sustratos en los microorganismos. Las galerías fueron inoculadas con el microorganismo e incubadas a 37°C durante 24 y 48 h, tiempos en los que se observa el color de cada microtubo. Los resultados se interpretan como: positivos (+) al presentarse un cambio de color; negativos (-) al no haber cambio; e indeterminado (?) si el cambio no es definido. El sistema de identificación de la bacteria consiste en la asociación de los resultados obtenidos de la galería de pruebas bioquímicas con la base de datos del programa ApiLAB Plus (bioMérieux, v.3.3.3).

El ensayo se aplica a una solución concentrada de 4 diferentes colonias aisladas de la caja con agar-tributirina, las cuales se hacen crecer en caldo nutritivo y al final se juntan para obtener una densidad óptica igual al número de McFarland ($DO_{600}=0.468$) como se describe en el ANEXO I y entonces se sigue el procedimiento que indica el instructivo del *kit*.

3.2.4. Secuenciación.

Como otra prueba para comprobar la identidad del microorganismo y para obtener la secuencia de la lipasa de interés, se hizo una secuenciación de la región V3 de la subunidad 16s ribosomal y de la región que codifica para la lipasa madura (el gen *lipA* por su homología con el gen de la lipasa de *B. subtilis*) de *B. pumilus* QC, para lo cual se siguieron los pasos que se mencionan en esta sección.

También, a modo de control y dado que no se había reportado, se hizo la secuenciación de la región V3 del gen 16s de de la bacteria *Bacillus pumilus* GMA1. La secuenciación del gen *lipA* de *B. pumilus* GMA1 ya ha sido reportada por Bustos-Jaimes (número de acceso GenBank: EU552794) [34,36,37].

Extracción de ADN.

La extracción del ADN se realizó según el protocolo del método de extracción con fenol-cloroformo-isoamílico que se describe en el ANEXO I. Las células utilizadas en la extracción del ADN empleado para las reacciones de amplificación, tanto de *B. pumilus* QC como de *B. pumilus* GMA1, fueron reactivadas en medio BHI.

Cuantificación de ADN.

La determinación de la cantidad y pureza del ADN extraído (en relación a la proteína presente) se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia de la solución a 260 nm y 280 nm, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro Agilent 8453E con celda de cuarzo de 15 μ L. Se tomó una alícuota de la solución de ADN extraído y se midió la absorbancia a las longitudes de onda mencionadas, entonces con la aplicación de las ecuaciones presentadas en la Tabla 3- 1 se determinó la concentración de ADN presente en el extracto y la pureza del mismo con respecto a la contaminación por proteínas.

Tabla 3- 1. Fórmulas usadas en la cuantificación de ADN.

Cuantificación de:	Ecuación
Concentración	$[ADN] = (Abs_{260nm}) \left(\frac{\text{conversión}}{\text{espectrofotométrica}} \right) (\text{volumen reducido}) (\text{factor de dilución})$
Pureza	$P = Abs_{260\text{ nm}} / Abs_{280\text{ nm}}$

Conversión espectrofotométrica, 1 unidad A_{260nm} de ADN de doble hélice= 50 μ g/mL; volumen reducido de celda= 5.

El valor deseado de la relación $Abs_{260\text{ nm}} / Abs_{280\text{ nm}}$, para la pureza, debe estar entre 1.8 y 2. Las unidades de la concentración de ADN se dan en μ g/mL.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con el ADN extraído se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) para amplificar las secuencias deseadas con el uso de un termociclador Techne modelo FTGENE2D.

Amplificación región V3 del gen 16s ARNr: La Tabla 3- 2 muestra la formulación para preparar la mezcla de reacción de la amplificación de la región V3 del gen 16s ribosomal (ARNr) y la Tabla 3- 3 muestra las condiciones a las que se llevó a cabo la reacción [38]. La secuencia de los cebadores universales utilizados y su temperatura de disociación (TM) se muestran en la Tabla 3- 4 [39]. El tamaño del amplicón esperado es de aproximadamente 200 pares de bases (pb).

Tabla 3- 2. Formulación de la reacción de amplificación de la región V3 de la subunidad 16s ARNr.

Reactivos	Concentración estándar	Concentración final	Volumen (μL)
Amortiguador para Taq	10X	1X	5
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM	2.5
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	4
Cebador 338f	20 mM	0.4 mM	1
Cebador 518r	20 mM	0.4 mM	1
Taq polimerasa	5 U/ μl	2 U/reacción	0.4
ADN molde	-	500 ng/reacción	-
Agua desionizada	-	c.b.p. 50 μl	-

c.b.p.: cuanto baste para.

La cantidad de ADN molde que se utiliza depende de la concentración de la solución de ADN, pero se agrega lo suficiente para tener 500 ng por cada reacción de amplificación de 50 μL . También se adiciona la cantidad necesaria de agua (c.b.p.) para completar los 50 μL de la reacción. Para obtener cantidad suficiente de producto de amplificación se realizan dos reacciones de 50 μL cada una para cada muestra de ADN.

Tabla 3- 3. Condiciones de los ciclos de reacción en la amplificación de la región v3 del gen 16s ARNr.

Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
1	94	5
20	94	1
	65	1
	72	3
10	94	1
	55	1
	72	3
1	72	10

Tabla 3- 4. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación de la región V3 de la subunidad 16s ARNr.

Cebador	Secuencia	Posición	TM (°C)
338f	5'- act cct acg gga ggc agc ag -3'	338- 357	58
518r	5'- att acc gcg gct gct gg -3'	518- 534	52

Amplificación de la región codificante de la lipasa madura: La formulación de la reacción y las condiciones de reacción que se utilizan para la amplificación de la región que codifica para la lipasa madura, gen *lipA*, se presentan en la Tabla 3- 5 y la Tabla 3- 6 respectivamente [37]. Los cebadores utilizados incorporan en el gen amplificado sitios de restricción en los extremos N-terminal y C-terminal para facilitar su manejo. Las secuencias de éstos se muestran en la Tabla 3- 7, donde se indican resaltado en negritas los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* correspondientes a cada uno [37]. El tamaño del amplicón que se espera obtener es de aproximadamente 570 pb.

Tabla 3- 5. Formulación de la mezcla de reacción para la amplificación del gen *lipA*, que codifica para la lipasa madura.

Reactivos	Concentración estándar	Concentración final	Volumen (µL)
Amortiguador para Taq	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	2
Cebador FBP	50 µM	1 µM	0.5
Cebador RBPXhoI	50 µM	1 µM	0.5
Taq polimerasa	5 U/µl	1.5 U/reacción	0.3
ADN molde	-	500 ng/reacción	-
Agua desionizada	-	c.b.p. 25 µL	-

c.b.p.: cuanto baste para.

La cantidad de ADN molde utilizado depende de la concentración de la solución de ADN, pero se adiciona lo suficiente para tener 500 ng por cada reacción de amplificación de 25 µl. También, se adiciona la cantidad necesaria de agua para completar los 25 µl de la reacción. Para obtener cantidad suficiente del producto de amplificación la reacción de PCR (25 µL) se llevó a cabo por cuadruplicado.

Tabla 3- 6. Condiciones de los ciclos de reacción para la amplificación del gen *lipA*, que codifica para la lipasa madura.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	3
30	95	1
	48	1
	72	1
1	72	1

Tabla 3- 7. Secuencia de los cebadores utilizados en la amplificación del gen *lipA*.

Cebador	Secuencia	TM (°C)
FBP (<i>NdeI</i>) ¹	5'- gga att cca* tat ggc tga gca taa tcc -3'	58
RBP (<i>XhoI</i>) ²	5'- ata gta ggc c*tc gag att cgt att ttg tcc -3'	60

1: N-terminal; 2: C-terminal; negritas: sitios de restricción de cada cebador; asterisco (*): sitio de corte en la secuencia de restricción correspondiente.

La polimerasa utilizada en todas las reacciones es la Platinum Taq de la marca Invitrogen, así como el amortiguador para Taq y la solución de MgCl₂ ocupados. El agua es desionizada, filtrada, esterilizada y ajustada a pH 8.

Visualización de los resultados.

Después que se ha hecho la PCR se verifica que se haya amplificado la secuencia de interés mediante una electroforesis en gel del producto de la reacción. Se preparó un gel de agarosa (Invitrogen) al 1% con 3 µL de bromuro de etidio (Invitrogen, 10 mg/mL) y se cubrió con amortiguador TAE 1X (Invitrogen, 10X) en la cámara de electroforesis. Para comprobar la correcta amplificación se cargaron en el gel alícuotas de 5 µL del producto de amplificación con 3 µL de amortiguador de cargado y un marcador de pesos moleculares de 50 pb (Fermentas, O'RangeRuler) como referencia para detectar el tamaño del amplicón. Se hizo pasar una corriente de 100 V y se dejó correr aproximadamente 45 minutos, hasta que el primer colorante utilizado como indicador hubo migrado a ¾ del gel.

Las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio se visualizan con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV). En una reacción de amplificación eficiente debe verse una única banda correspondiente al tamaño del amplicón esperado.

Purificación del amplicón.

Para la purificación del amplicón, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (como se describe anteriormente) de todo el producto, el cual se cargó completamente en un pozo grande y se cortó la banda correspondiente. La purificación se realizó directamente de la banda cortada del gel utilizando el *kit* de purificación “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) como indica el manual. El ADN purificado se recuperó en 50 μ L de agua pH 8, la misma ocupada en la reacción de amplificación.

El producto purificado se visualiza corriendo nuevamente una electroforesis en gel de agarosa al 1%, de una pequeña alícuota de 5 μ L, para comprobar la recuperación del producto y su pureza.

Secuenciación.

Los amplicones ya purificados se enviaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los cebadores empleados como referencia en la secuenciación fueron el 518r para la región V3 del gen 16s y el FBP para el gen *lipA*.

Análisis de secuencias.

La determinación de la identidad del microorganismo se hizo mediante la comparación de la secuencia de la región v3 del gen 16S ARNr con las reportadas en bases de datos con ayuda del BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) [34]. De la misma forma se comparó la secuencia de la lipasa madura con otras ya reportadas incluyendo la de *B. pumilus* GMA1, además se utiliza el programa CLUSTAL W [40].

También se realizó un análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos de la lipasa madura con algunas otras de la familia I de la clasificación de lipasas según Arpigny y Jaeger (1999). Éste análisis se llevó a cabo con el programa MEGA4 [41] utilizando el método Neighbor-Joinin. El árbol consenso se infirió con 1000 réplicas. Las distancias evolutivas se obtuvieron ajustando el método con base en la matriz JTT y las unidades representan el número esperado de sustituciones de aminoácidos bajo el modelo usado.

3.2.5. Sobre-expresión de la lipasa.

A fin de obtener una cantidad suficiente con la pureza necesaria de la lipasa madura de *B. pumilus* QC, la cual se denominó LipAQC, ésta se sobre-expresó como proteína recombinante con una cola adicional de seis histidinas en un hospedero de *E. coli* BL21. Se ocupó una alícuota del mismo ADN amplificado enviado a secuenciar para la clonación del gen *lipA*. El procedimiento de clonación seguido se muestra a continuación.

Clonación del gen.

Se utilizó el “TOPO TA Cloning Kit for Sequencing” (Invitrogen) para la clonación del gen *lipA* de acuerdo al procedimiento que se indica en el manual del usuario. El producto de PCR, dado que no es ocupado inmediatamente después de la amplificación, primero es tratado para adicionar una adenina al extremo 3' como indica el *kit*, antes de ser introducido al vector pCR4-TOPO (3956 pb, ANEXO II) para obtener el plásmido pCR4-lipAQC. La reacción de ligación se prepara como indica el proveedor manteniéndola en hielo y una vez hecha se adiciona a las células quimiocompetentes One Shot TOP10 y se deja reposar en hielo durante 5 min. Entonces la mezcla se expone a choque térmico a 42°C utilizando un termomixer por 30 seg e inmediatamente se regresa al hielo donde se le adicionan 250 µL de medio S.O.C (incluido en el *kit*). Después de una hora de incubación a 37°C en estufa se toman dos volúmenes de la solución de células, 25 µL y 50 µL, los cuales son dispersados con un asa estéril sobre cajas Petri conteniendo agar Luria-Bertani (LB) con kanamicina (Kan, 100 µg/mL), preparado como se indica en el ANEXO I. Las cajas se incuban en una estufa a 37°C durante toda la noche.

Las colonias aisladas de las transformantes obtenidas, TOP10/pCR4-lipAQC, se tomaron por picadura y se inocularon en tubos de ensayo (15 mL) con 5 mL de medio LB-Kan(100 µg/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación de 180 rpm. Se prepararon glicerolos en tubos de 2 mL, cada uno de los tubos con 900 µL del medio inoculado y 100 µL de glicerol al 80%, los tubos se etiquetaron y se guardaron a -70°C.

Purificación del plásmido pCR4-lipAQC.

Para la extracción y purificación del vector clonado se usó el “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Quiagen). A partir de un cultivo de transformantes en 10 mL de medio LB con antibiótico (LB-Kan) se cosecharon las células por centrifugación y se trataron como se indica en el protocolo del *kit*. La extracción correcta y purificación del vector se

verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando una alícuota de 8µL y dado que el plásmido a detectar se encuentra súper-enrollado el desplazamiento de éste a través del gel no es predecible.

Digestión de plásmidos.

El vector pCR4-lipAQC ya purificado se trató con enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, cuya secuencia de corte se presenta en la Tabla 3- 8, a fin de obtener la secuencia de interés (inserto) el gen *lipA*. El procedimiento se muestra en el ANEXO I. El vector pET-22b(+) (5493 pb, Novagen, ANEXO II), el portador final para la expresión del gen, también se sometió a una reacción de digestión con las mismas enzimas de restricción. El inserto se separó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Con lo anterior también se comprobó la presencia del inserto, al observarse en el gel la banda correspondiente al tamaño esperado de éste y la del plásmido utilizado. Después se purificó la banda del inserto utilizando el “GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences) según indica el instructivo.

Tabla 3- 8. Secuencias de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*.

Enzima	Secuencia de corte	Marca
<i>NdeI</i>	5' – C A↓ T A T G – 3' 3' – G T A T↑ A C – 5'	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	5' – C↓ T C G A G – 3' 3' – G A G C T↑ C – 5'	New England Biolabs

Flechas (↓↑): sitios de corte en la secuencia de restricción correspondiente.

Clonación del gen para su expresión.

Para la expresión de la lipasa se utilizó el vector pET-22b(+) que presenta algunas características importantes como: un promotor del fago T7 con un operador *lac*, que es activado por IPTG; un codón de inicio que permite, sin romper el marco de lectura, insertar la secuencia del gen a expresar fusionandola con una secuencia que adiciona seis histidinas en el extremo C-terminal; y un gen de resistencia a ampicilina.

El inserto purificado se ligó al vector pET-22b(+) mediante la reacción descrita en el ANEXO I para producir el plásmido pET+lipAQC. Las células electrocompetentes *E. coli* BL21 conservadas a -70°C fueron descongeladas en hielo y transformadas con dicho vector. Se procuró llevar a cabo la transformación a baja temperatura. Se adicionaron 4 µL de la mezcla de ligación a las células electrocompetentes y se

mantuvieron en hielo durante 1 min, después se tomó con una pipeta la solución, se trasvasó a una celda de electroporación pre-enfriada, la cual se colocó en el equipo electroporador (Gene pulser II, BIO-RAD) y se dió un pulso eléctrico de 2200 V durante 4 segundos. Se adicionaron 500 μ L de medio S.O.C a la celda y la mezcla se trasvasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, el cual fue incubado a 37°C y 250 rpm durante 1 hora. El contenido fue repartido en 4 cajas de agar LB con ampicilina (Amp, 100 μ g/mL) y esparcido con perlas de vidrio. Las cajas se incubaron durante toda la noche a 37°C en estufa.

Las colonias obtenidas se tomaron por picadura con un asa estéril y se cultivaron en tubos con 10 μ L de medio LB-Amp a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. Éstas transformantes, llamadas BL21/pET+lipAQC, se conservaron en glicerol al 80% en tubos de 1.5 mL a -20°C.

Purificación del plásmido pET+lipAQC.

El plásmido pET+lipAQC fue extraído y purificado utilizando el “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Quiagen), a partir de un cultivo de transformantes BL21/pET+lipAQC hecho en medio LB-Amp. La extracción correcta y purificación del vector se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando una alícuota de 8 μ L.

Digestión del plásmido pET+lipAQC.

El plásmido pET+lipAQC purificado fue sometido a una reacción de digestión como se indica en el ANEXO I, con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I (Tabla 3- 8), para comprobar la presencia del inserto deseado. Se comprueba la presencia de éste mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% al observarse las bandas correspondientes al tamaño del inserto y del vector.

Secuenciación del fragmento clonado.

El plásmido pET+lipAQC purificado se envió al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para secuenciar al fragmento clonado y comprobar su identidad como el gen *lipA* de interés. Se secuenció en ambos sentidos usando como referencias los cebadores específicos para el promotor y el terminador T7.

Inducción de la expresión.

Tanto la polimerasa de T7 en el cromosoma de la cepa de *E. coli* utilizada como el promotor T7 presente en el vector pET-22b(+), promotor que regula la expresión del gen *lipA*, cuentan con operadores *lac*. Por tal motivo, la inducción de la expresión de la proteína en las células transformantes se consigue al adicionar β -D-tiogalactósido de

isopropilo (IPTG) al medio de cultivo. Se inoculó medio LB-Amp a partir de colonias transformantes BL21/PET+lipAQC aisladas en placas con agar LB-Amp, y se incubó a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.6-0.7, entonces se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se dejó en incubación 3 h más a las mismas condiciones [37].

Puesto que la proteína recombinante es intracelular, ésta se purifica de las células recuperadas por centrifugación al término del tiempo de incubación, como se explica más adelante, y el sobrenadante es desechado.

Comprobación de expresión y actividad.

Para comprobar que las células transformantes obtenidas expresaran eficientemente la proteína se hizo una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli, ANEXO I [42]. La expresión se indujo en un volumen de 10 mL o 1 L, según se requiera en el proceso y se tomaron alícuotas de 500 µL a los tiempos 0 (antes de adicionar IPTG), 30, 60, 120 y 180 min, las cuales se conservaron en tubos de 1.5 mL a -10°C hasta su utilización. Éstas se recuperaron por centrifugación (14000 rpm, 4°C por 2 min) y fueron resuspendidas en 40 µL de agua y se les adicionó 10 µL de amortiguador de cargado (Tris-HCl 0.1 M, 2-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, EDTA 5 mM, glicerol 10%, pH 7). La mezcla se calentó en agua hirviendo durante 10 min.

Se carga un gel de poli-acrilamida al 12.5% con 4 µL de las mezclas preparadas y un marcador de bajo peso molecular (Fermentas). Se pasa una corriente de 200 V y se deja correr hasta que el colorante indicador haya salido del gel (45 min). Las bandas se revelan según ANEXO I y, para una mejor visualización se observan con un transiluminador de luz visible. La banda de inducción correspondiente a la lipasa recombinante se espera en 20.5 kDa aproximadamente.

La presencia de actividad lipolítica de la proteína expresada en *E. coli* se comprueba mediante ensayos de difusión en cajas Petri con agar LB-Amp-Tributirina(0.5%)-IPTG(0.5mM) preparado como se indica en el ANEXO I. Se tomó una asada de las células transformantes y se sembró en estría a fin de obtener colonias aisladas en cajas con el agar mencionado, las cuales se dejan en incubación a 37°C durante toda la noche. La actividad lipolítica positiva de la enzima recombinante se aprecia como halos claros de lisis alrededor de las colonias. Se puede hacer una selección de colonias y preparar gliceroles a partir de ellas, como ya se ha mencionado.

Producción de la proteína recombinante.

Una vez comprobada la eficiencia de la expresión de la proteína y de su actividad lipolítica, el paso siguiente fue producirla en cantidad suficiente a partir de un lote de cultivo mayor, para realizar los estudios necesarios en la caracterización de su actividad.

Se hicieron dos precultivos, uno de 10 mL y otro de 100 mL, para finalmente obtener un cultivo de 1L, en el cual se llevará a cabo la expresión de la proteína. Se preparó el primero inoculando 10 mL de medio LB-Amp con células transformantes BL21/PET+lipAQC reactivadas en agar LB-Amp a partir de los gliceroles hechos después de la comprobación de actividad lipolítica. El tubo se dejó en incubación a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. El segundo preinóculo se hizo al adicionar el contenido del primero a un matraz con 100 mL de medio LB-Amp, éste se dejó en incubación a las mismas condiciones de 1 a 2 h. Entonces se obtiene el cultivo final adicionando el contenido de éste último a un matraz con 900 mL de LB-Amp. Para la inducción de la expresión se siguió el mismo procedimiento mencionado antes. Ya que la proteína recombinante no es secretada al medio es necesaria la recuperación del pellet celular por centrifugación (4500 rpm durante 15 min a 4°C) usando una centrífuga Avanti J-25i con rotor JLA 10.500 de Beckman (varias centrifugaciones para obtener un solo pellet es recomendable para su posterior manejo). Éste se guardó en congelación hasta su tratamiento.

Se comprobó que hubiese expresión mediante una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE a partir de alícuotas del cultivo como ya se ha descrito.

Para obtener la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 se siguió el mismo procedimiento de producción de la proteína recombinante LipAQC-6H. Se utilizaron las transformantes pETbpl, que consisten en células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET-22b(+) ligado al gen de la lipasa madura de *B. pumilus* GMA1. Dicha transformante fue proporcionada por el Dr. Ismael Bustos Jaimes.

3.2.6. Purificación.

Una vez llevada a cabo la expresión de las lipasas recombinantes de *B. pumilus* QC y GMA1, se procedió a su purificación a partir de la biomasa obtenida de sus respectivas transformantes en células de *E. coli* BL21.

Obtención del extracto intracelular.

Dado que la lipasa recombinante no es excretada el medio se necesita obtener el extracto intracelular, en el cual se encuentra la proteína, a partir de la biomasa de células transformantes recuperadas por centrifugación. Durante todo el procedimiento se trata de conservar baja la temperatura a fin de evitar la degradación de la proteína manteniendo las soluciones en hielo. El pellet de células transformantes se resuspendió en 20-30 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.5 con 1% de Tris. Las células se rompieron por sonicación (sonicador CV26, Cole Parmer) con 10 pulsos de 20 segundos con intervalos de 1 min a 45% de amplitud. La solución resultante se centrifugó a 4°C y 15000 rpm durante 20 min usando una centrífuga Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments). El sobrenadante se transvasó a otro tubo para centrifuga y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones. Éste se conservó en refrigeración hasta su purificación y el precipitado fue desechado.

Purificación mediante cromatografía en fase líquida por afinidad.

Para la purificación de la proteína a partir del extracto intracelular, se utilizó el equipo cromatográfico HPLC de Waters, [integrado por: controlador (600S), bomba (626), detector dual de absorbancia (2487), desgasificador en línea (AF), colector de fracciones (III)], y una columna empacada con una resina de afinidad (Protino Ni-IDA, Macherey Nagel) previamente preparada con una solución de Niquel (NiSO_4 10 mM), la cual tiene afinidad por la cola de histidinas de la proteína. Para el manejo del equipo se utilizó el programa Empower (Waters). El procedimiento de purificación seguido es el sugerido por el fabricante de la resina con algunas modificaciones. Durante toda la corrida cromatográfica se utilizó una velocidad de flujo de 4 mL/min, para pasar las disoluciones por la columna. Se pasaron 200 mL del amortiguador de equilibrado (fosfatos 20 mM con NaCl 500 mM e imidazol 5 mM pH7.5), se inyectaron 10 mL del extracto intracelular al equipo y se pasaron otros 200 mL del amortiguador de equilibrado. Para la elución se adiciona el amortiguador de elución (fosfatos 20 mM, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM pH7.5) de forma gradual para hacer un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM durante 90 minutos. En tubos de ensaye se colectaron fracciones de 4 mL, a partir de que se empezó a observar en el cromatograma la señal correspondiente a la elución de la proteína de interés, y se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su diálisis.

Diálisis.

Para eliminar el imidazol presente en la solución de la proteína purificada y concentrarla en glicerol, las fracciones recuperadas de la cromatografía en fase líquida por columna de afinidad se sometieron a diálisis. La membrana de diálisis conteniendo las fracciones con mayor cantidad de proteína purificada se cerró perfectamente a fin de evitar fugas, se introdujo en un matraz con 2 L de amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 7.5 y se puso en agitación magnética a 4°C durante 2 h. Se hizo el cambio por otros 2 L del mismo amortiguador y se continuó la diálisis. Para concentrar la muestra, la membrana se colocó en una probeta con suficiente glicerol y se dejó en agitación aproximadamente una hora y media, hasta que su volumen se redujo a un poco más de la mitad del inicial. La membrana fue abierta por un extremo y con ayuda de una pipeta desechable se pasó el contenido a un frasco color ambar etiquetado y se conservó a -20°C.

3.2.7. Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína purificada en el concentrado se determinó mediante el método de ácido bicinconónico (BCA). Se preparó una solución del reactivo BCA como se muestra en el ANEXO I y a partir de ésta la mezcla BCA-Cu con 9800 µL de reactivo BCA más 200 µL de CuSO₄ (4 g/100 mL). Se hizo una curva patrón con diluciones de una solución estándar de albúmina sérica bovina (Sigma) de 1 mg/mL, como se muestra en la Tabla 3- 9. Se prepararon diluciones de la muestra concentrada de enzima recombinante en 100 µL y se adicionó 1 mL de la mezcla BCA-Cu. Los factores de dilución se varían a fin de que las medidas de absorbancia caigan dentro de la curva patrón. La curva patrón y la muestra se analizaron al mismo tiempo, preparando primero las diluciones y adicionando al último 1000 µL de la mezcla BCA-Cu a cada una, se agitan perfectamente en vortex y se incuban a 37°C durante 30 min. Entonces se mide la absorbancia a 562 nm. A partir de la curva patrón (con un coeficiente de correlación ~1.0), se obtuvo la ecuación de la línea de tendencia, la cual sigue la siguiente forma: $A_{\text{absorbancia}} = m_{\text{pendiente}} \times X_{\text{concentración}}$, a partir de la cual se determina la concentración de la muestra sustituyendo el valor de la absorbancia y multiplicando por su factor de dilución.

Tabla 3- 9. Curva patrón con solución estándar de albúmina sérica bovina.

No. tubo	Concentración de proteína (mg/mL)	Estándar de albúmina (μ L)	Agua (μ L)	Mezcla BCA-Cu (mL)	Absorbancia 562 nm	Factor de dilución
1 (blanco)	0	0	100	1		-
2	0.02	2	98	1		50
3	0.05	5	95	1		20
4	0.10	10	90	1		10
5	0.15	15	85	1		6.666
6	0.20	20	80	1		5
7	0.40	40	60	1		2.5
8	0.60	60	40	1		1.666
9	0.80	80	20	1		1.25
10	1.00	100	0	1		1

3.2.8. Determinación de peso molecular y punto isoeléctrico.

El peso molecular (PM) de la proteína recombinante purificada fue determinado mediante electroforesis en gel SDS-PAGE con un marcador de bajo peso molecular (Fermentas). Se cargan en el gel 5 μ L de muestra + 5 μ L de amortiguador de carga. El análisis de bandas se hizo con el programa Quantity One (Biorad v.4.2.1).

El punto isoeléctrico (pI) de la proteína recombinante purificada se determinó por electroforesis de isoelectroenfoque (IEF, isoelectric focusing electrophoresis) utilizando el equipo Phast System (Pharmacia). Se utilizaron geles de IEF para pI de 3-9 (Healthcare), los cuales se cargaron con 5 μ L de la muestra y 5 μ L del estándar de pI de 3-9 (Healthcare). El gel IEF se cortó y el patrón de bandas de cada parte fue revelado según correspondía mediante tinción de Coomassie ("Fast Coomassie staining", Pharmacia), tinción de plata ("PlusOne Silver Staining Kit", Amersham Biosciences) y actividad "in situ" con α -naftil acetato (como se indica en el ANEXO I). El análisis de bandas se hizo con el programa Quantity One (Biorad v.4.2.1).

También se obtuvieron los valores teóricos de PM y pI correspondientes a las proteínas recombinantes, a partir de la secuencia putativa de aminoácidos de cada una, con ayuda de la herramienta ProtParam del servidor ExpASy (Expert Protein Analysis System) [43].

3.2.9. Ensayos de actividad enzimática.

La actividad lipolítica se evaluó mediante la medición de *p*-nitrofenol (pNF) liberado a partir de sustratos cromogénicos (*p*-nitrofenil ésteres) y mediante la obtención del perfil de ácidos grasos producidos por la hidrólisis de grasa butírica. Estos ensayos se llevaron a cabo para el análisis de las lipasas recombinantes LipAQC-6H y LipAGMA1-6H a fin de obtener datos comparativos.

3.2.9.1. Ensayos cinéticos.

Las mediciones cinéticas se llevaron a cabo mediante ensayos espectrofotométricos, los cuales se realizaron utilizando como sustratos compuestos cromogénicos sintéticos, *p*-nitrofenil ésteres, que son hidrolizados por la lipasa con la consecuente liberación de *p*-nitrofenol (pNF). La liberación de éste último se monitoreó durante el transcurso de una curva de progreso de reacción, midiendo el cambio en la absorbancia a 410 nm (hasta que el cambio en la absorbancia fue menor al 0.1%) con un espectrofotómetro (UV/Vis) Cary 400 (Varian) provisto de un controlador de temperatura Varian Cary para mantener la temperatura constante y se cuantificó mediante una curva de calibración de pNF (30- 600 μ M).

Constantes cinéticas.

Los parámetros cinéticos, K_m y k_{cat} , se determinaron a partir de los datos de aparición de producto en un curso de tiempo de la reacción de hidrólisis enzimática del sustrato. El ajuste de datos de las curvas de progreso para el cálculo de los parámetros cinéticos se realizó usando el software ENCORA (Enzymatic Conversion Rate Analysis) versión 1.2, el cual se basa en la integración numérica de la ecuación diferencial de Michaelis-Menten-Henry, por el método de Runge-Kutta [44,45]. Los ensayos enzimáticos se realizaron usando como sustrato *p*-nitrofenil acetato (pNFA) en una mezcla de reacción a un volumen final de 1 mL conteniendo 1 μ M de enzima recombinante purificada, 500 μ M de sustrato, 0.226 % v/v de Triton X-100 y el resto de amortiguador, y se monitoreó en un tiempo de reacción de 15 min. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en amortiguadores de distinto pH y diferente concentración de NaCl, indicados en la Tabla 3- 10, condiciones similares a las presentadas en la maduración de los quesos: a pH 5.5 con diferente porcentaje de sal; y pH 7.5, el cual se utiliza como control. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.

Tabla 3- 10. Amortiguadores utilizados en los ensayos de actividad lipolítica.

Amortiguador	pH	% NaCl	Cambio en fuerza iónica (ΔI)
Citratos 50 mM	5.5	0	0
		2	0.3422
		5.5	0.9411
Fosfatos 50 mM	7.5	0	0

Especificidad de sustrato.

La especificidad de sustrato de la proteína recombinante se determinó usando *p*-nitrofenil ésteres de distinta longitud de cadena: *p*-nitrofenil acetato (pNFA; C2), *p*-nitrofenil butirato (pNFB; C4), *p*-nitrofenil decanoato (pNFD; C10) y *p*-nitrofenil laurato (pNFL; C12). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 1 mL con 1 μ M de enzima recombinante purificada, 100 μ M del sustrato respectivo y 0.226% de Tritón X-100 en el amortiguador de citratos 50 mM ajustado a pH 5.5. La concentración de los sustratos se determinó con base en la solubilidad presentada por éstos en las condiciones del ensayo. Los tiempos de reacción para cada sustrato son de 15 min, para los dos primeros, 90 y 480 min para los dos últimos respectivamente. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.

Estabilidad de sustratos y enzimas.

En todos los experimentos se realizó un control negativo usando una mezcla de reacción de idéntica composición con la excepción de que la enzima es omitida, a fin de evaluar la estabilidad del sustrato en las condiciones y tiempo de reacción midiendo en cambio en la absorbancia de la muestra. También se realizaron ensayos para evaluar la estabilidad de las enzimas en las condiciones de reacción, para lo cual se prepararon disoluciones de 3.7 mL con una concentración de 2 μ M de enzima en cada uno de los amortiguadores mostrados en la Tabla 3- 10, y se dejaron a 20°C durante 1 h. Se tomaron alícuotas de 500 μ L a los tiempos 0 (antes de poner a 20°C recién preparada la mezcla), 5, 10, 15, 30 y 60 min y se midió su actividad en una mezcla de reacción de 1mL con 500 μ M de pNFA, 0.226% de tritón X-100 y el respectivo amortiguador durante un tiempo de reacción de 30 seg. Los ensayos se hicieron por duplicado.

La preparación de las disoluciones de los sustratos de *p*-nitrofenil ésteres se muestra en el ANEXO I.

3.2.9.2. Ensayos de hidrólisis de grasa butírica.

El perfil de los productos de la hidrólisis lipolítica de grasa butírica se analizó mediante cromatografía de gases.

Preparación de la emulsión.

Se preparó una emulsión según O'Connor y col. [46] con algunas modificaciones. Se pesó 1 mg de grasa butírica y se disolvió en 40 mL de amortiguador de citratos 50 mM pH 5.5 junto con 240 mg de caseinato de sodio y 20 mg de α -lecitina. La mezcla se homogenizó por sonicación (39% de amplitud, intervalos de 40 seg) hasta que la grasa se hubo emulsificado (no se observaron gotas de grasa). Se tomaron alícuotas de 2 mL y se colocaron en tubos para centrifuga de 15 mL, limpios y estériles. La reacción de hidrólisis se inició adicionando a cada emulsión la lipasa correspondiente, según se indica en la Tabla 3- 11, a una concentración final de 1 μ M/mL y se dejó proceder durante 24 y 48 h en incubación a 20°C y 200 rpm. También se utilizaron muestras sin lipasa como blancos, para los tiempos 0, 24 y 48 h. Una vez terminado el tiempo de reacción, las muestras se conservaron a -70°C hasta su tratamiento. Las emulsiones fueron preparadas por duplicado.

Tabla 3- 11. Emulsiones de hidrólisis lipolítica y tiempo de reacción de cada una.

Clave de emulsión	Lipasa adicionada	Tiempo de reacción (h)		
		0	24	48
EB	ninguna	✓	✓	✓
EQ	LipAQC-6H		✓	✓
EG	LipAGMA1-6H		✓	✓

Cada mezcla de reacción, incluyendo los blancos, fue tratada de la misma manera como se muestra a continuación. La cantidad de ácidos grasos liberados por la hidrólisis de grasa butírica se analizó utilizando el método descrito por Needs y col. [47] con algunas modificaciones [4,46].

Extracción de lípidos.

La muestra se descongeló en un baño de agua a temperatura ambiente. Se adicionaron 5 mL de éter dietílico frío, 600 μ L de HCl (35% v/v acuoso) frío y una concentración conocida (aproximadamente 0.5 mg) de cada estándar interno: ácido

valérico (C5:0, Sigma) y ácido tridecanoico (C13:0, Sigma). La mezcla de extracción se agitó en vortex durante 2.5 min y fue centrifugada a 3340 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó la fase orgánica (extracto de éter) y se transfirió a un vial con 200 mg de Na₂SO₄ anhidro para ser secada. El vial se dejó en reposo mínimo 20 min en hielo para disminuir la evaporación del disolvente.

Recuperación de ácidos grasos libres.

Para separar los ácidos grasos libres (AGL) se transfirieron 2.5 mL del extracto de éter a un tubo de ensaye de 10 mL con tapa rosca conteniendo 100 mg de resina Amberlyst A26 (Aldrich, ver preparación de la resina en ANEXO I) y 1.25 mL de metanol. El tubo fue puesto en agitación a 150 rpm durante 1 h. Se eliminó el solvente y la resina se lavó 5 veces con 3.5 mL de una mezcla éter-metanol (2:1 v/v), después se secó bajo una ligera atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente.

Preparación de ácidos grasos totales.

Para el análisis de ácidos grasos totales (AGT) se transfirió 1 mL del extracto de éter seco a un tubo de ensaye de 10 mL con tapa rosca. Se evaporó el solvente bajo una ligera atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente y se adicionaron 250 µl de hexano.

Metilación de ácidos grasos.

El agente metilante (HCl en metanol 5% v/v) se prepara adicionando por goteo y con mucho cuidado (los reactivos pueden reaccionar violentamente) 1 mL de cloruro de acetilo a 10 mL de metanol anhidro conservado en hielo [Carroll 1962]. Se adicionó 1 mL del agente metilante recién preparado a cada tubo de ensaye para el análisis de AGL y AGT. Se adicionaron 4 esferas de tamiz molecular (4Å, Sigma) a cada tubo, se tapó bien y se pusieron en incubación a 30°C en oscuridad durante toda la noche sin agitación.

Después de la metilación se adicionó 1 mL de hexano a cada tubo, los cuales se agitaron durante 2 min suavemente. Entonces se adicionó 1 mL de solución de NaCl saturado y la mezcla se agitó por 20 seg. La capa de hexano se remueve con una pipeta Pasteur y se colocó en un vial de 1.5 mL para su análisis por cromatografía de gases.

Análisis por cromatografía de gases.

El cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) cuenta con: una columna capilar (1909N-133 INNOWAX, 30.0m x 0.25 mm x 0.25 μ m); un detector de ionización de flama (FID, Flame Ionization Detector); y un inyector (Agilent 7683) provisto de una jeringa de 10.0 μ L. EL gas acarreador fue N₂ con un flujo de 5 mL/ min y la temperatura programada del horno se muestra en la Tabla 3- 12. Se inyectó 1.0 μ L de cada muestra por triplicado. El análisis de ácidos grasos de C4:0 a C18:3 requirió de 23.7 min.

Tabla 3- 12. Programación del horno del cromatógrafo de gases.

	Incremento (°C/min)	Temperatura fija (°C)	Tiempo mantenido (min)	Tiempo de corrida
Inicio	-	80	1	1
Rampa 1	15	150	5	8.67
Rampa 2	5	200	5	23.67

Los AGL fueron identificados por sus tiempos de retención relativa, los cuales se determinaron mediante la elaboración de curvas de calibración. Para éstas se utilizaron soluciones estándar de concentración conocida de diferentes metil ésteres de ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Éstas se prepararon al disolver en hexano una cantidad conocida de los estándares, los cuales fueron: metil butirato (C4:0, Aldrich); metil hexanoato (C6:0, Merck); mezcla GLC-30 [metil octanoato (C8:0), metil decanoato (C10:0), metil laurato (C12:0), metil miristato (14:0), metil palmitato (C16:0), Supelco]; mezcla GLC-10 [metil palmitato (C16:0), metil estearato (C18:0), metil oleato (C18:1), metil linoleato (C18:2), metil linolenato (C18:3), Supelco]; mezcla GLC-90 [metil tridecanoato (C13:0), metil pentadecanoato (C15:0), metil heptadecanoato (C17:0), metil nonadecanoato (C19:0), Supelco]. Cada muestra se inyectó por triplicado.

4. RESULTADOS.

4.1. Reactivación de *Bacillus pumilus* QC.

Se logró la reactivación eficiente del microorganismo en tubos con caldo nutritivo. Se apreció crecimiento después de 18 horas de incubación a 37°C y 250 rpm, sin embargo hay que señalar que al cultivar la bacteria en medio BHI se observa una mayor turbidez, por lo que se obtiene un mejor desarrollo del microorganismo en este medio.

4.2. Actividad enzimática en caja Petri.

La presencia de actividad lipolítica y proteolítica extracelular reportada para especies de *B. pumilus*, entre otras del mismo género, se comprobó mediante los ensayos de difusión en placa [31,48].

La degradación de tributirina por difusión en agar se logró apreciar mediante la formación de los halos de actividad (zonas translúcidas) alrededor de la colonias de *B. pumilus* QC sembradas en agar-tributirina (1%), lo que comprueba que estas colonias presentan actividad lipolítica, Figura 4- 1 A. Las colonias son de color crema con crecimiento simétrico y borde liso.

El microorganismo también presenta actividad proteolítica como se puede ver en la Figura 4- 1 B, dado que exhibe halos de actividad en las cajas con agar-leche-descremada (1.5%). Aunque el tamaño de las colonias fue significativamente menor.

Cabe señalar que debido a las diferencias en el tipo y cantidad de nutrientes presentes en los medios, las colonias aisladas en el agar-tributirina fueron más grandes que las colonias aisladas en las cajas de actividad proteolítica. Sin embargo, el tamaño del halo en relación al tamaño de las colonias, fue menor en las cajas de actividad lipolítica que en la cajas de agar-leche-descremada (1.5%) como se puede apreciar en la Figura 4- 1 C. Esto es debido a la pobreza de es este último medio de cultivo.

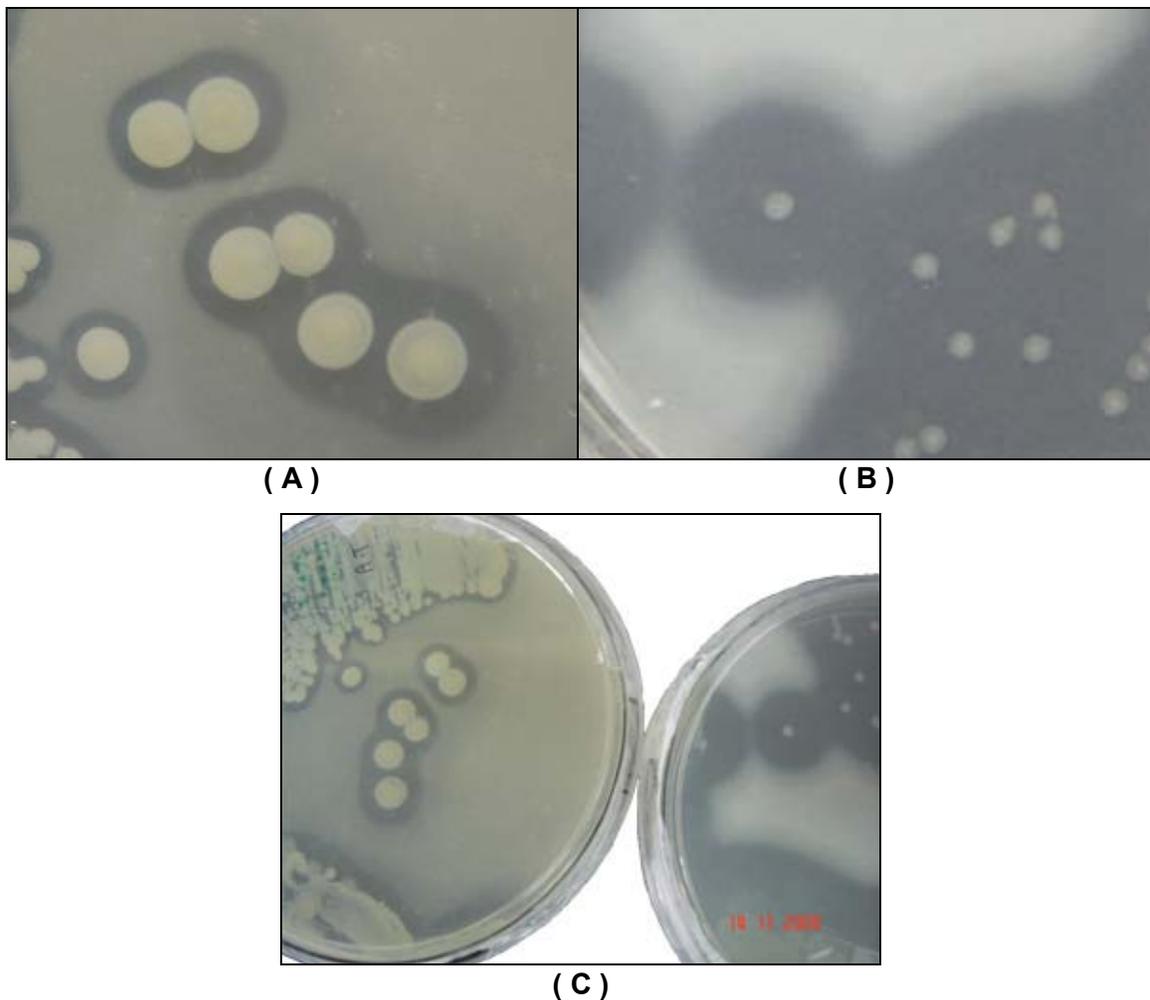


Figura 4- 1 Colonias de *B. pumilus* aislado de queso Cotija que muestran halo de actividad enzimática. (A) Halo de actividad lipolítica; (B) Halo de actividad proteolítica; (C) comparación de halos de actividad, izquierda lipolítica y derecha proteolítica.

4.3. Corroboración de la identificación de la bacteria.

Tinción de Gram.

La observación al microscopio de las bacterias teñidas por la técnica de Gram muestra la presencia de bacilos largos de color púrpura intenso. El color púrpura es positivo para bacterias Gram + y los bacilos largos son la forma esperada para bacterias de *Bacillus pumilus*, lo cual coincide con lo reportado por García-Saturnino [33]. No se detectan otras formas de bacterias u otra coloración, por lo que se asume que no hay contaminación de otros microorganismos.

Tabla 4- 1. Resultados de la galería API 50 CH.

Tubo	Ensayo	Componente activo	Resultado	Tubo	Ensayo	Componente activo	Resultado
0		TESTIGO	-	25	ESC	ESculina citrato férrico	+
1	GLY	GLIcerol	+	26	SAL	SALcina	+
2	ERY	ERItrol	-	27	CEL	D-CElobiosa	+
3	DARA	D-ARAbinosa	-	28	MAL	D-Maltosa	-
4	LARA	L-ARAbinosa	+	29	LAC	D-LACtosa	-
5	RIB	D-RIBosa	+	30	MEL	D-MELibiosa	-
6	DXYL	D-XILosa	?	31	SAC	D-SACarosa	+
7	LXYL	L-XILosa	-	32	TRE	D-TREhalosa	+
8	ADO	D-ADOnitol	-	33	INU	INULina	-
9	MDX	Metil-βD-Xilopiranosida	-	34	MLZ	D-MeLeZitosa	-
10	GAL	D-GALactosa	?	35	RAF	D-RAFinosa	-
11	GLU	D-GLUcosa	+	36	AMD	AlmiDon	-
12	FRU	D-FRUctosa	+	37	GLYG	GLIcoGeno	-
13	MNE	D-MamNosA	+	38	XLT	XILiTol	-
14	SBE	L-SorBosA	-	39	GEN	GENtiobiosa	?
15	RHA	L-RHAMnosa	-	40	TUR	D-TURanosa	-
16	DUL	DULcitol	-	41	LYX	D-LIXosa	-
17	INO	INOsitol	-	42	TAG	D-TAGatosa	+
18	MAN	D-MANitol	+	43	DFUC	D-FUCosa	-
19	SOR	D-SRObitol	-	44	LFUC	L-FUCosa	-
20	MDM	Metil-αD-Manopiranosida	-	45	DARL	D-ARabitoL	-
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranosida	?	46	LARL	L-ARabitoL	-
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	?	47	GNT	GlucNaTo potásico	-
23	AMY	AMIdalina	?	48	2KG	2-CetoGluconato potásico	-
24	ARB	ARButina	+	49	5KG	5-CetoGluconato potásico	-

(+) lectura positiva; (-) lectura negativa; (?) lectura indeterminada.

Pruebas bioquímicas.

Los resultados de los ensayos de fermentación de la galería API 50 CH (bioMérieux) se aprecian mediante el cambio de color de cada microtubo, debido al ácido producido, que es revelado por el indicador de pH del medio API 50 CHB/E. El cambio de color presentado o el color del medio conservado se interpreta como positivo (+) o negativo (-) respectivamente, si no se puede apreciar un cambio de color notorio, se interpreta como dudoso (?). Dichos valores fueron introducidos al programa ApiLAB Plus (bioMérieux V.3.3.3), el cual los corrobora con su base de datos para lograr la identificación de la bacteria. Los resultados leídos a las 48 h se presentan en la Tabla 4- 1 y también se especifica el sustrato de cada microtubo de la galería.

El programa identificó al perfil bioquímico presentado por el microorganismo como propio de *Bacillus pumilus* con un ID= 99.9% y lo calificó como “Muy buena identificación”.

4.4. Secuenciación.

Para tener mayor certeza de la identidad del microorganismo se realizó su identificación por métodos moleculares. Se obtuvo la secuencia de la región v3 del gen 16s ARNr de *B. pumilus* QC y de *B. pumilus* GMA1. Para ésta última no había sido reportada dicha secuencia. También se obtuvo la secuencia del gen *lipA* de *B. pumilus* QC, región que codifica para la lipasa madura LipAQC (se denominó LipA por su identidad con la lipasa de *B. subtilis*). La discusión de resultados se hace en dos etapas, primero se analizan las secuencias de la región v3 del gen 16s ARNr y después la secuencia del gen *lipA* y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida.

4.4.1. Región V3 del gen 16s ARNr.

Las reacciones de PCR para la amplificación de la región V3 del gen 16s ARNr de *B. pumilus* QC y de *B. pumilus* GMA1 se llevaron a cabo satisfactoriamente, dado que en el gel de agarosa al 1% se detectaron para cada muestra bandas únicas de aproximadamente 200 pb correspondientes a los productos de amplificación (amplicones) esperados para ambas bacterias, según se aprecia en la Figura 4- 2. Las bandas se purificaron y se enviaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

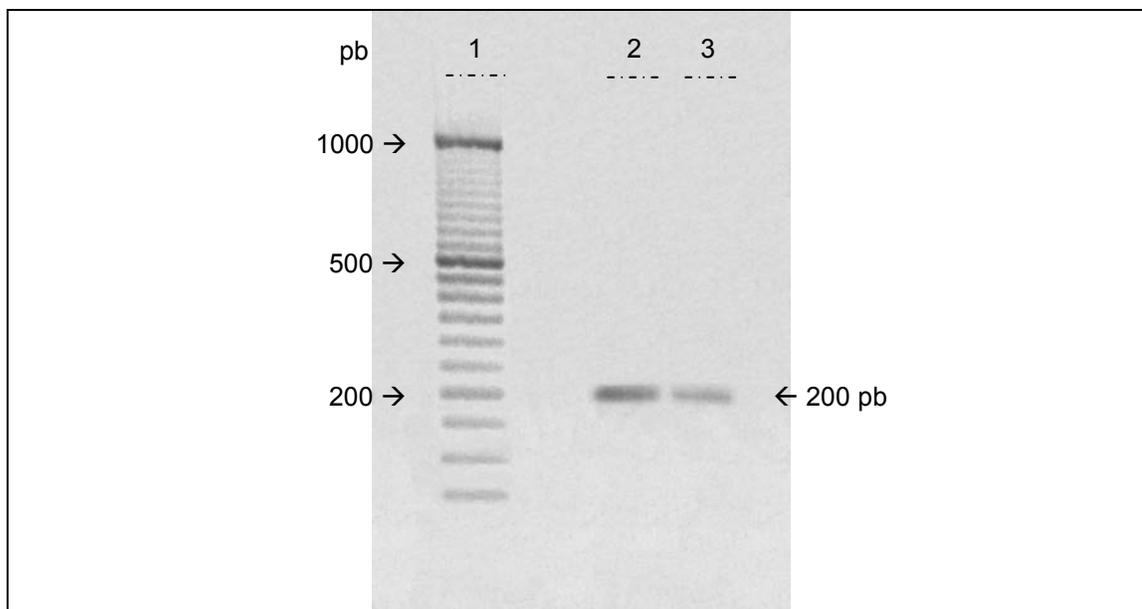


Figura 4- 2. Gel de Agarosa al 1% que muestra las bandas de los productos de amplificación de la región v3 del gen 16s ARNr de *B. pumilus* QC y *B. pumilus* GMA1. Carril 1: marcador de pesos moleculares de 50 pb (Fermentas, 4 μ L); carril 2: amplicón de *B. pumilus* QC (5 μ L de muestra + 3 μ L de amortiguador de carga); carril 3: amplicón de *B. pumilus* GMA1 (5 μ L de muestra + 3 μ L de amortiguador de carga).

Los electroferogramas de las secuencias de nucleótidos de las muestras se presentan en el ANEXO II. El análisis de las secuencias se presenta a continuación. Se realizaron alineaciones comparativas utilizando las herramientas computacionales: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) [34]; CLUSTALW (Multiple Sequence Alignment) [40]; y EditSeq (DNASTar, v.5.02).

***Bacillus pumilus* QC.**

La secuencia de nucleótidos para la región V3 del gen 16s ARNr de *B. pumilus* QC corresponde a un fragmento de 197 pb y se presenta en la Tabla 4- 2.

Tabla 4- 2. Secuencia de nucleótidos perteneciente a la región V3 de la subunidad 16s ribosomal de *B. pumilus* QC.

Número de bases	Secuencia (5'- 3')
1-50	actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct
51- 100	gacggagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct
101-150	gttgtaggg aagaacaagt gcgagagtaa ctgctcgcac cttgacggta
151-197	cctaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaat

Al comparar la secuencia obtenida con otras secuencias reportadas en la base de datos del GenBank [34] con ayuda del programa BLAST se encontró que tiene una identidad del 100% con bacterias del género *Bacillus* comparando el 100% de la secuencia y más específicamente con la especie *B. pumilus* como se muestra en la Tabla 4- 3 (se muestran sólo algunos de los resultados con porcentajes de identidad más altos).

Tabla 4- 3. Resultados de la comparación de la secuencia obtenida de la región v3 de la subunidad 16s ribosomal ARN de *B. pumilus* QC con ayuda del programa BLAST. Tabla realizada a partir de los datos en la Figura 7.6 del ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

Descripción	Cobertura	Valor de Expectancia	Identidad
<i>Bacillus</i> sp. A-A-N-2-2 egne for 16S rRNA, partial secuence	100%	6e-98	100%
<i>Bacillus</i> sp. F-2-1 16S ribosomlsomal RNA gene, partial secuence	100%	6e-98	100%
<i>Bacillus pumilus</i> strain CSB16 16S ribosomal RNA gene, partial secuence	100%	6e-98	100%
<i>Bacillus pumilus</i> strain SH-B30 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial secuence	100%	6e-98	100%
<i>Bacillus pumilus</i> strain SY28 16S ribosomal RNA gene, partial secuence	100%	6e-98	100%
<i>Bacillus pumilus</i> strain 016T 16S ribosomal RNA gene, partial secuence	100%	6e-98	100%
<i>Bacillus pumilus</i> strain GZUB30 16S ribosomal RNA gene, partial secuence	100%	6e-98	100%

Valor de expectancia (E-value): indica el cálculo estadísitico que representa el número de alineamientos que podrían esperarse que ocurrieran solamente por azar.

***Bacillus pumilus* GMA1.**

El amplicón de la región V3 del gen 16s ARNr de *B. pumilus* GMA1 corresponde a un fragmento de 197 pb, cuya secuencia se presenta en la Tabla 4- 4. Esta secuencia no había sido reportada, sin embrago, en 2008 Bustos-Jaimes y col. [37] introdujeron a la base de datos del GenBank la secuencia correspondiente al gen 16S con número de acceso EU391538. Dicha información comprueba que la secuencia obtenida en este estudio es correcta.

Tabla 4- 4. Secuencia de nucleótidos presentes en la región V3 de la subunidad 16s ribosomal de *B. pumilus* GMA1.

Número de bases	Secuencia (5' - 3')
1-50	actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct
51-100	gacggagcaa cgccgcgtga gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct
101-150	gttgtaggg aagaacaagt gcgagagtaa ctgctcgac cttgacggta
151-197	cctaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaat

El alineamiento de las secuencias de la región V3 del gen 16S ribosomal de *B. pumilus* QC y GMA1 se muestra en la Figura 4- 3, en la que se muestra que existe un 100% de identidad entre las secuencias comparando el 100% de los nucleótidos. Este análisis se realizó utilizando el programa CLUSTAL W.

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

Bp_QC_16s      ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
Bp_GMA1_16s    ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
*****

Bp_QC_16s      CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
Bp_GMA1_16s    CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
*****

Bp_QC_16s      GCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
Bp_GMA1_16s    GCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
*****

Bp_QC_16s      CCAGCAGCCGCGGTAAT
Bp_GMA1_16s    CCAGCAGCCGCGGTAAT
*****
    
```

Figura 4- 3. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de la región V3 de la subunidad ribosomal 16S de *Bacillus pumilus* QC y *Bacillus pumilus* GMA1 mostrando una identidad del 100%. Bp_QC_16s: secuencia perteneciente a *B. pumilus* QC; Bp_GMA1_16s: secuencia perteneciente a *B. pumilus* GMA1.

Dado que las secuencias de la región v3 del gen 16S de las cepas QC y GMA1 son idénticas, éstas presentan los mismos resultados en la comparación de la secuencia de nucleótidos con las ya reportadas en la base de datos del GenBank (Tabla 4- 3). Como ya se mencionó, se señala una identidad del 100% con secuencias pertenecientes al género de *Bacillus* y específicamente con *B. pumilus*, cubriendo el 100% de la secuencia introducida. Con lo anterior se comprueba que ambas bacterias pertenecen a la especie *Bacillus pumilus*.

4.4.2. Región que codifica para la lipasa.

Se amplificó la región que codifica para la lipasa madura LipAQC de *B. pumilus* QC. Al visualizar el producto de amplificación después de una electroforesis en gel de agarosa al 1% se detectó una única banda de aproximadamente 575 pb correspondiente al tamaño esperado del amplicón, como se puede ver en la Figura 4- 4, lo que demuestra que la reacción se llevó a cabo satisfactoriamente.

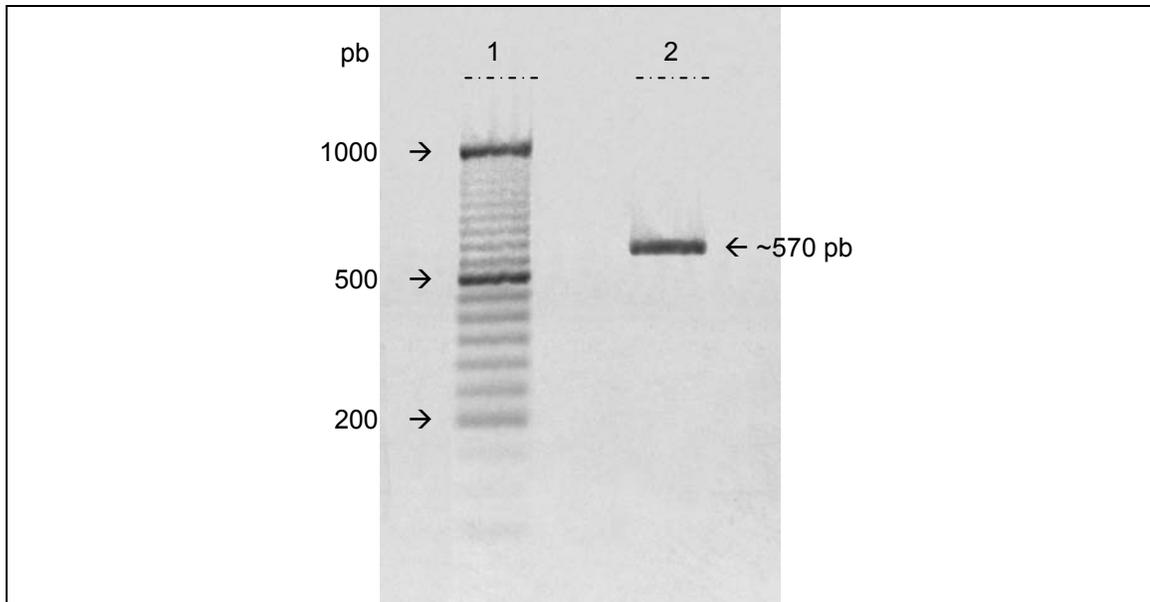


Figura 4- 4. Gel de Agarosa al 1% que muestra la banda del producto de amplificación del gen *lipA* de *B. pumilus* QC, que codifica para la lipasa madura. Carril 1: marcador de pesos moleculares de 50 pb (Fermentas, 4 μ L); carril 2: amplicon de *lipA* (5 μ L de muestra + 3 μ L de amortiguador de carga).

La secuencia de este fragmento reveló que el gen *lipA* corresponde a una secuencia de 546 pb, la cual se muestra en la Tabla 4- 5 (el electroferograma se presenta en el ANEXO II). También se muestra la secuencia putativa de aminoácidos de la lipasa madura LipAQC, la cual es una proteína de 181 aminoácidos con un peso molecular (PM) teórico de 20 kDa. Dicha secuencia de aminoácidos se obtuvo a partir de la traducción de la secuencia de nucleótidos con ayuda del programa EditSeq (DNASTar) y su PM se determinó con el programa ProtParam (ExpASy) [43]. En la secuencia se distingue el pentapéptido consenso Ala-X₁-Ser-X₂-Gly característico de las lipasas del género *Bacillus* y los residuos de la triada catalítica Ser77, Asp133 e His156, identificados por homología con la secuencia de LipA de *B. subtilis* [21]. De acuerdo con la clasificación de lipasas y esterasas de Arpigny y Jaeger (1999), esta información coloca a la lipasa de *B. pumilus* QC en la subfamilia I.4 [11].

Tabla 4- 5. Secuencia de nucleótidos del gen *lipA* y la correspondiente secuencia putativa de aminoácidos de la lipasa madura de *Bacillus pumilus* QC, LipAQC.

Número de nucleótidos	Secuencia nucleótidos / aminoácidos	Número de aminoácidos
1-51	gct gag cat aat ccg gta gtg atg gtg cat ggt atg gga gga gcg tct tat A E H N P V V M V H G M G G A S Y	1-17
52-102	aac ttc gct tcg att aaa agt tat ttg gtt aca caa ggc tgg gac cgc aac N F A S I K S Y L V T Q G W D R N	18-34
103-153	caa tta ttt gct att gat ttc ata gac aaa aca ggt aat aac cgc aac aat Q L F A I D F I D K T G N N R N N	35-51
154-204	ggt cct cgt cta tcc aga ttc gtc aaa gat gtg cta gac aaa acg ggt gcc G P R L S R F V K D V L D K T G A	52-68
205-255	aaa aaa gta gat att gtg gcg cat agt atg ggc ggg gcg aac acg tta tac K K V D I V A H S* M G G A N T L Y	69-85
256-306	tat att aag aat cta gac ggc ggc gat aaa att gaa aac gtc gtc aca ctt Y I K N L D G G D K I E N V V T L	86-102
307-357	ggt gga gcg aat gga ctc gtt tca ctc aga gca tta cca ggc acc gat cca G G A N G L V S L R A L P G T D P	103-119
358-408	aat caa aaa att ctc tat aca tct gtc tat agc tca gcc gat ctg att gtt N Q K I L Y T S V Y S S A D* L I V	120-136
409-459	gtc aac agc ctt tcg cgt tta att ggc gca aga aat gtc ctg atc cac ggc V N S L S R L I G A R N V L I H G	137-153
460-510	gtt gga cat atc ggt cta tta acc tca agc caa gtg aaa ggg tat gtg aaa V G H* I G L L T S S Q V K G Y V K	154-170
511-546	gaa gga ttg aat ggc gga gga caa aat acg aat taa E G L N G G G Q N T N fin	171-181

Cuadro gris (■): pentapéptido consenso; asterisco (*): triada catalítica.

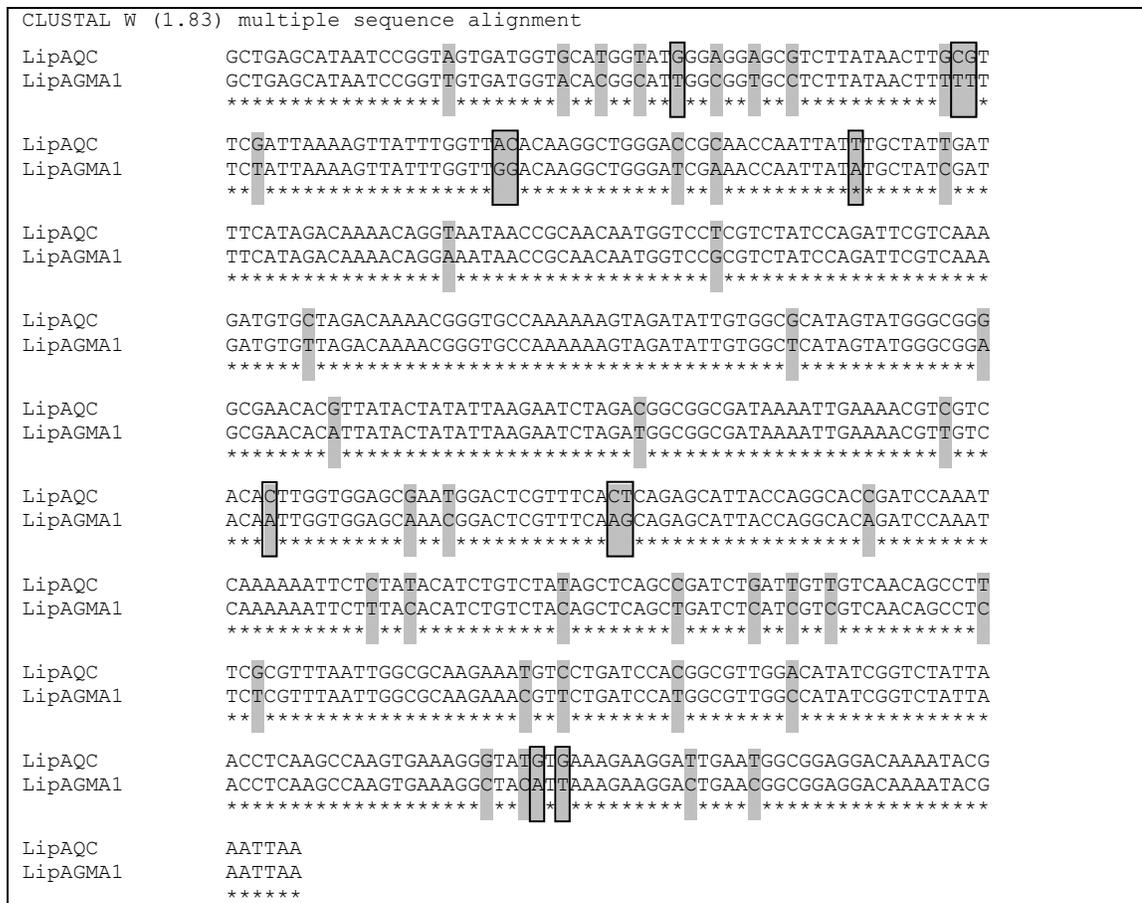
Una búsqueda con ayuda de BLAST dentro de las secuencias de la base de datos GenBank revela similitudes significativas de la secuencia de nucleótidos de LipAQC con las de otras proteínas putativas producidas por bacterias del género *Bacillus*, específicamente de *Bacillus pumilus*. En la Tabla 4- 6 se muestran los resultados que presentan una mayor identidad en la comparación, del 93 al 90% considerando el 100% de la secuencia de nucleótidos, con lo cual se confirmó que LipAQC es una enzima perteneciente a esta familia de lipasas. Dentro de éstas lipasas se encuentra la perteneciente a *B. pumilus* GMA1 (GenBank, número de acceso EU552794), la cual presenta una identidad del 90% con LipAQC.

Tabla 4- 6. Comparación de la secuencia correspondiente a la lipasa madura LipAQC de *Bacillus pumilus* QC. Datos tomados de la Figura 7.7 en el ANEXO II.

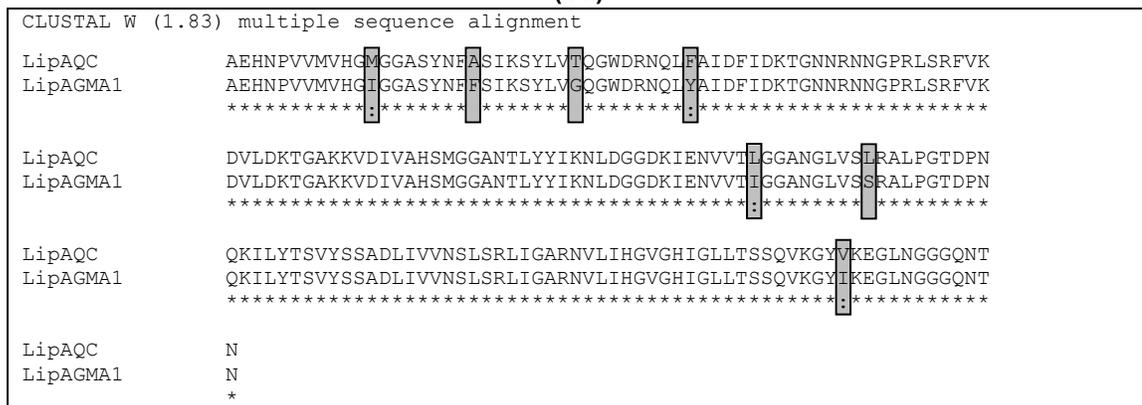
Descripción	Cobertura	Valor de Expectancia	Identidad
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032, complete genome	100%	0.E+00	93%
<i>Bacillus pumilus</i> strain F3 lipase precursor, gene, complete cds	100%	0.E+00	91%
<i>Bacillus licheniformis</i> ORF (partial), lip gen and icm gene	100%	0.E+00	91%
<i>Bacillus pumilus</i> strain GMA1 lipase precursor, gene, partial cds	100%	0.E+00	90%
<i>Bacillus pumilus</i> strain YZ02 lipase gene, complete cds	100%	0.E+00	90%
<i>Bacillus</i> lipase gen for triacylglycerol lipase, strain MBB03	100%	0.E+00	90%
<i>Bacillus pumilus</i> lipase precursor, gene, complete cds	100%	0.E+00	90%

Valor de expectancia (E-value): indica el cálculo estadístico que representa el número de alineamientos que podrían esperarse que ocurriera solamente por azar.

Con ayuda del programa CLUSTAL W se llevó a cabo la alineación de nucleótidos y de aminoácidos entre las secuencias de LipAQC y la lipasa madura de *B. pumilus* GMA1, llamada LipAGMA1 en este estudio. En la Figura 4- 5 A se muestra la alineación de nucleótidos, la cual presenta una identidad del 90%, las diferencias en nucleótidos se muestran en cuadros grises y con marco negro las que se traducen en cambios en la secuencia putativa de aminoácidos. El alineamiento de aminoácidos se muestra en la Figura 4- 5 B, la cual presenta un 96% de identidad con 7 diferencias en los aminoácidos. En la secuencia de LipAQC se tienen los residuos M12, A20, T28, F37, L102, L111 y V169 que corresponden en la de LipAGMA1 a I12, F20, G28, Y37, I102, S111 e I169. De estos cambios, tres pueden representar diferencias significativas debido a las propiedades de los aminoácidos: en la posición 20 de A (hidrófobo) por F (hidrófobo aromático); en la 28 de T (polar sin carga) por G (hidrófobo); y en la 111 de L (hidrofóbico) por S (polar sin carga).



(A)



(B)

Figura 4- 5. Alineación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las lipasas maduras LipAQC y LipAGMA1 correspondientes a las cepas *B. pumilus* QC y *B. pumilus* GMA1 respectivamente. (A) Alineación de nucleótidos, identidad 90%. Cuadros grises (■): diferencias en nucleótidos; cuadros grises con marco negro (▣): diferencias en nucleótidos que provocan cambios un la secuencia de aminoácidos. (B) Alineación de aminoácidos, identidad 96%. Cuadros enmarcados (▣): aminoácidos diferentes.

Con base en los resultados de este análisis se demuestra que a nivel molecular la lipasa de *B. pumilus* QC presenta diferencias con las lipasas homólogas ya reportadas y se podría suponer que LipAQC presenta propiedades enzimáticas diferentes a esas mismas, incluyendo la lipasa de *B. pumilus* GMA1, lo cual se analiza más adelante.

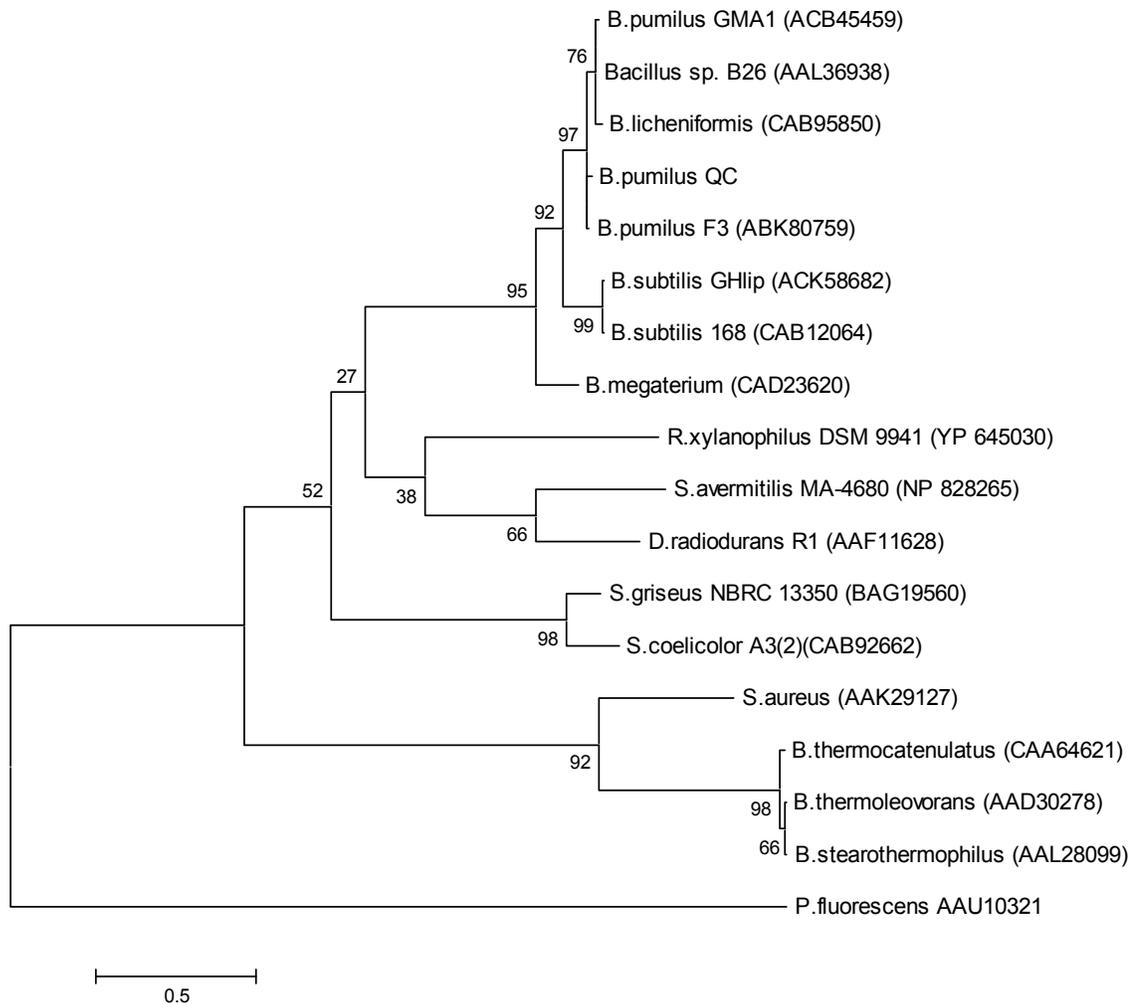


Figura 4- 6. Relación evolutiva de 18 secuencias de lipasas maduras. Las especies correspondientes se muestran con su número de acceso en paréntesis. El porcentaje de réplicas en el cual las secuencias se asocian juntas se muestran próximas a las ramificaciones. El largo de las ramas se muestra en las misma unidades de la distancia evolutiva usada para inferir el árbol filogenético, la cual representan el número esperado de sustituciones de aminoácidos bajo el modelo usado.

En la Figura 4- 6 se muestra un análisis filogenético realizado a partir de 18 secuencias de algunas lipasas maduras pertenecientes a la familia I de la clasificación de lipasas. Para elaborar el árbol se utilizó el programa MEGA4 [41]. La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* se utilizó como grupo externo. Se observa que las lipasas correspondientes a *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. megaterium*, incluyendo la lipasa QC, que son las más pequeñas de todas y pertenece a la familia I.4, forman un mismo clado y se encuentran cercanamente relacionadas. Mientras que las de *B. thermocatenulatus*, *B. thermoleovorans* y *B. stearothermophilus* se agrupan en otro clado, al ser de la familia I.5. Las de *Streptomyces* (familia I.7) también se agruparon aparte. Se podría decir que el análisis de agrupación realizado fue consistente con la clasificación en familias propuesta por Arpigny y Jaeger (1999).

4.5. Expresión de la lipasa.

La clonación del fragmento de ADN que codifica para la lipasa madura de *B. pumilus* QC se llevó a cabo en dos etapas, la primera fue la clonación con el uso del “TOPO TA Cloning Kit for Sequencing” (Invitrogen) en el vector pCR4-TOPO y después la clonación en el vector de expresión pET-22b (+).

El gen *lipA* de *B. pumilus* QC fue amplificado usando la polimerasa Taq, la cual introduce uno o dos deoxirribonucleótidos de adenina (dATP) en los extremos 3'-terminal del amplicon. Estos extremos colgantes permitieron la ligación del inserto con el vector pCR4-TOPO, formando el plásmido pCR4-LipAQC, con el cual se logró transformar las células quimiocompetentes One Shot TOP10. Las colonias transformantes se seleccionaron en agar-LB-Kan y se sometieron a un análisis de restricción confirmando la presencia del inserto. El plásmido se purificó (QIAprep Spin Miniprep Kit, Quiagen), se trató con enzimas de restricción (*NdeI* y *XhoI*) y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando las bandas correspondientes al vector y al inserto (570 pb). Éste se purificó de la banda correspondiente con el “GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Biosciences).

El inserto purificado se ligó con el vector de expresión pET-22b (+) (tratado con las mismas enzimas de restricción, *NdeI* y *XhoI*) para generar el plásmido pET+lipAQC, con el que se transformaron las células de *E. coli* BL21 electrocompetentes. En el medio selectivo de agar-LB-Amp, inoculado con la mezcla de reacción de la transformación, se logró obtener una sola colonia transformante, denominada BL21/pET+lipAQC.

Se verificó mediante análisis de restricción con *NdeI* y *XhoI* la incorporación de *lipA* al vector. La electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de digestión mostró las bandas correspondientes al inserto (570 pb) y al vector. Al inocular con la transformante BL21/pET+lipAQC una caja Petri con agar-LB-Amp-Tributirina (0.5%) - IPTG (0.5mM), se logró apreciar un halo claro de lisis mostrando actividad lipolítica alrededor de las colonias, como se observa en la Figura 4- 7. Lo que comprueba la expresión de la lipasa recombinante activa.



Figura 4- 7. Halo de actividad lipolítica de la transformante BL21/PET+lipAQC.

El plásmido pET+lipAQC se purificó (QIAprep Spin Miniprep Kit, Quiagen) y se secuenció en ambas direcciones (promotor T7 y terminador T7). El análisis comparativo entre las secuencias del gen *lipA* y del plásmido comprobó la presencia del fragmento deseado en el vector, pero además reveló una mutación en la secuencia del inserto del plásmido, un cambio de un nucleótido de Guanina (G) presente en la secuencia nativa del gen *lipA* por una adenina (A) en el inserto del plásmido, como se puede ver en la Figura 4- 8. Dicha modificación representa una sustitución en la secuencia putativa de aminoácidos, de D64 en la secuencia nativa de LipAQC por N64 en la lipasa recombinante LipAQC-6H. Esta alteración se pudo haber producido durante la amplificación del fragmento de ADN.

Este cambio adiciona una diferencia más entre las secuencias de aminoácidos de las lipasas recombinantes de *B. pumilus* QC y la de *B. pumilus* GMA1, lo que podría significar un factor más para la diferencia en el comportamiento lipolítico presentado por dichas proteínas recombinantes, mostrado más adelante, por lo que se decidió seguir con el análisis de la proteína recombinante producida.

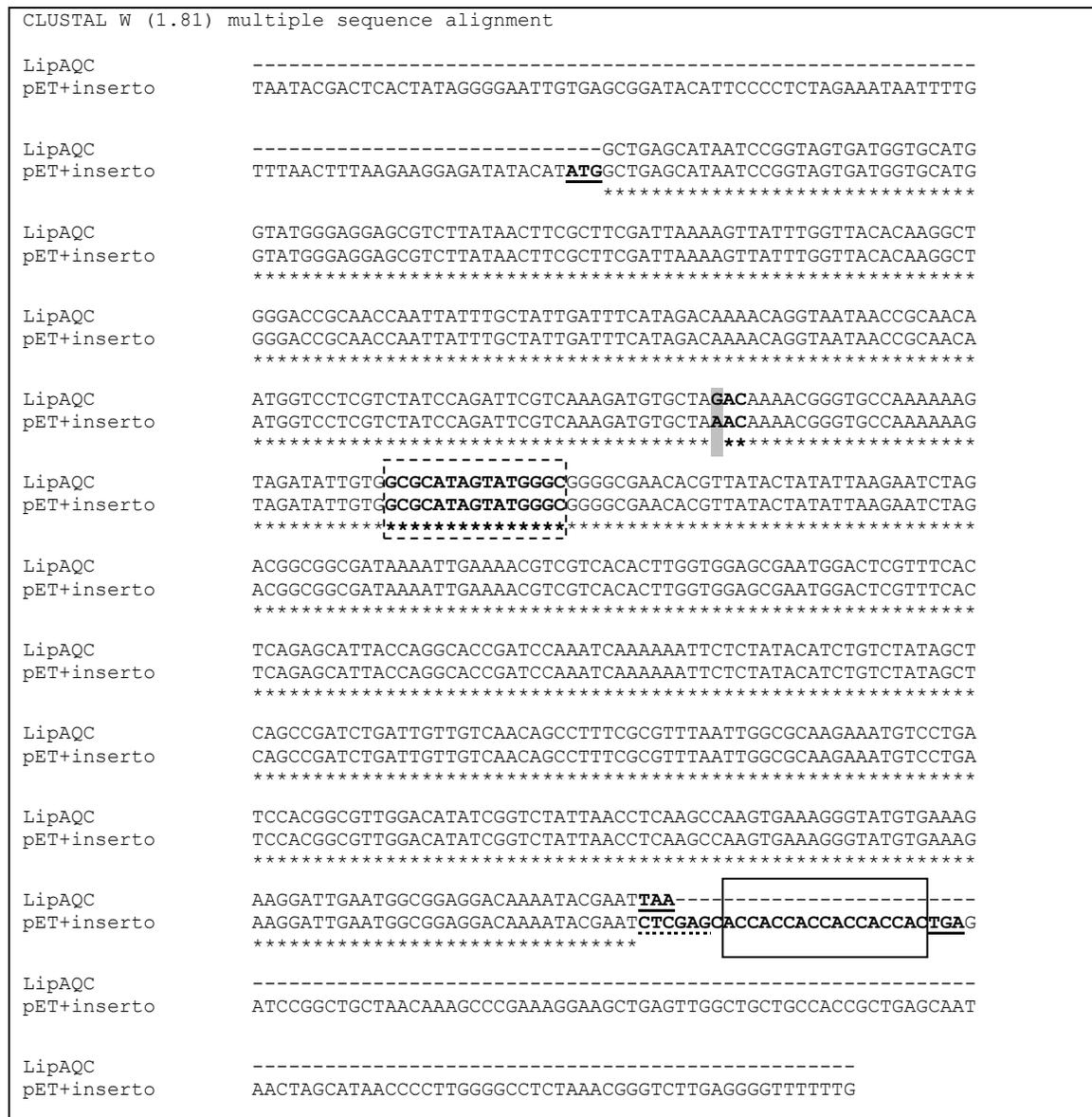


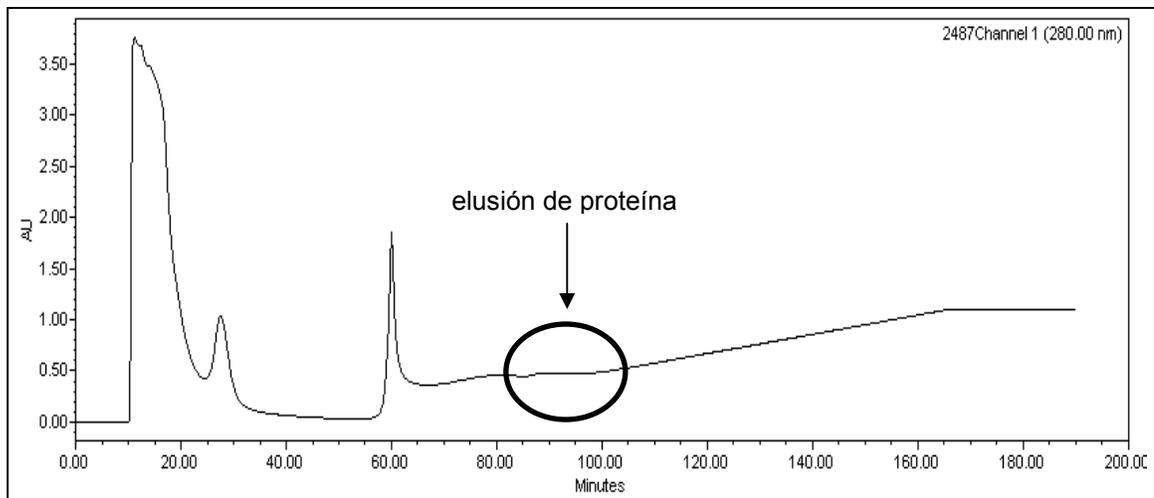
Figura 4- 8. Comparación en las secuencias de nucleótidos del gen *lipA* de *B. pumilus* QC y el plásmido pET+LipAQC. Subrayado continuo (ATG/TAA,TGA): tripletes de inicio/término respectivamente; cuadro gris (■): diferencia en nucleótidos; negritas (**GAC/AAC**): tripletes correspondientes a D y N respectivamente; cuadro punteado (□): nucleótidos de la secuencia consenso; recuadro continuo (□): nucleótidos de seis Histidinas; subrayado punteado (CTCGAG): tripletes de Leu-Glu.

Dado que el plásmido de expresión cuenta con un operador *lac*, la inducción de la expresión de la proteína recombinante, LipAQC-6H, para su caracterización, se llevó a cabo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.5 mM a 1 L de medio LB-Amp inoculado con la transformante BL21/PET+lipAQC al alcanzar una DO_{600nm} entre 0.6 y 0.7. El proceso de inducción transcurrió durante 3 h. Se comprobó la expresión de la enzima mediante una electroforesis en gel SDS-PAGE de alícuotas tomadas del cultivo a tiempo 0 (antes de adicionar IPTG) y a 30, 60, 120 y 180 min, después de adicionar el inductor.

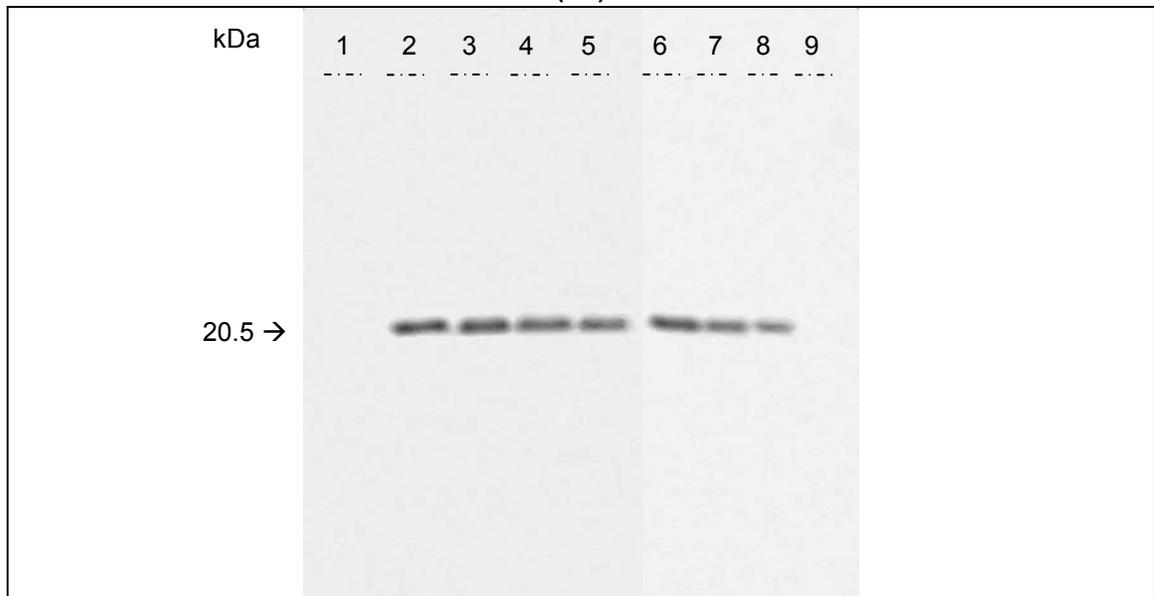
Por el sitio en que es ligado el gen *lipA* la proteína recombinante es expresada con los residuos adicionales en el extremo C-terminal: Leu seguido de Glu y una etiqueta de seis residuos de His (Figura 4- 8). Cabe señalar que la lipasa recombinante carece de la secuencia del péptido señal que la exporte de las células, por lo tanto, la enzima se localiza intracelularmente. Por este motivo, después del periodo de inducción las células fueron recuperadas por centrifugación (Beckman, Avanti J-25i). Éstas se resuspendieron, lavaron y rompieron por sonicación para obtener el extracto intracelular que contiene a la proteína recombinante.

4.6. Purificación.

A partir del extracto intracelular se purificó la lipasa recombinante LipAQC-6H en un equipo de HPLC (Waters) provisto de una columna empacada con una resina de afinidad Protino Ni-IDA (Macherey Nagel). El níquel presenta afinidad por el anillo de imidazol de la etiqueta de His de la proteína recombinante logrando así su separación del resto del medio y, después, es eluida de la columna por un gradiente de imidazol (20-500 mM) que compite por los sitios de unión al Ni^{2+} y la desprende. En el cromatograma de la Figura 4- 9 A se señala la región correspondiente a la elusión de la proteína recombinante purificada (del minuto 85 al 98). El análisis electroforético en gel SDS-PAGE de las fracciones colectadas (4 mL) en ese lapso de tiempo, mostrado en la Figura 4- 9 B, demuestra la obtención de la lipasa recombinante LipAQC-6H purificada, al observar bandas únicas de 20.5 kDa correspondientes a la proteína. Dichas fracciones fueron dializadas para eliminar el imidazol y concentrar la enzima en glicerol (de 56 mL a 10 mL aproximadamente). La proteína purificada y concentrada se conservó en un frasco ambar a $-20^{\circ}C$.



(A)



(B)

Figura 4- 9. Purificación de la lipasa recombinante LipAQC-6H. (A) Cromatograma de la elusión de la proteína pura. (B) Gel SDS-PAGE que muestra las bandas de proteína presente en algunas fracciones colectadas. Carriles 1 a 5: fracciones de minutos 83, 85, 87, 89 y 91, respectivamente, 4 μ L; carriles 6 a 9: fracciones de minutos 93, 95, 97 y 99, respectivamente, 6 μ L.

Como ha sido mencionado, es parte de los objetivos comparar la actividad lipolítica de la lipasa recombinante LipAQC-6H con la presentada por la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1, denominada LipAGMA1-6H, para lo cual fue necesario inducir la expresión de esta proteína y purificarla. Las transformantes BL21/pETb1 fueron diseñadas por Mora-Lugo para la expresión de la proteína recombinante LipAGMA1-6H [37]. La obtención de LipAGMA1-6H se logró a partir de las

células transformantes BL21/pETbpl1, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Ismael Bustos Jaimes. El procedimiento de expresión y purificación seguido fue el mismo que se usó para la obtención de LipAQC-6H previamente descrito.

Cuantificación de proteína.

Para la cuantificación de proteína se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA). Se elaboró una curva patrón hecha a partir de una solución estándar de albúmina bovina. La concentración determinada para la proteína purificada LipAQC-6H fue de 0.33 mg/mL y para LipAGMA1-6H fue de 0.10 mg/mL (aproximadamente 3.3 y 2.0 mg de proteína recuperada, respectivamente). Dicha diferencia en la concentración es muy probable que se deba al proceso de concentración en glicerol ya que la de LipAQC-6H se concentró más.

4.7. Determinación de peso molecular y punto isoelectrico.

Para la lipasa recombinante de *B. pumilus* QC, LipAQC-6H (190 aminoácidos), el peso molecular (PM) determinado experimentalmente con ayuda del programa Quantity One (Biorad v.4.2.1), a partir de un gel SDS-PAGE, es de aproximadamente 20.2 kDa como se muestra en la Figura 4- 10. Éste valor es similar al esperado según el PM teórico obtenido con la herramienta ProtParam (ExpASy) [43] el cual es de 20.479 kDa. El valor experimental del punto isoelectrico (pI) obtenido fue igual a 9.3, sin embargo este valor es el máximo esperado dado que la determinación se realizó mediante un isoelectroenfoque en gel IEF de 3-9 (Healthcare) con ayuda del programa Quantity One (Biorad v.4.2.1), considerando que el pI teórico es de 9.45 calculado con ProtParam. El gel IEF se muestra en la Figura 4- 11.

El PM determinado experimentalmente para LipAGMA1-6H (190 aminoácidos), la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1, fue de aproximadamente 20.7 kDa (Figura 4- 10), lo cual es similar con el PM teórico de 20.498 kDa obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos con ayuda de la herramienta ProtParam (ExpASy). El pI experimental igual a 9.3 (Figura 4- 11) es similar al pI teórico de 9.27. Los valores de PM y PI, experimentales y teóricos, se obtuvieron de la misma forma que para los de LipAQC-6H.

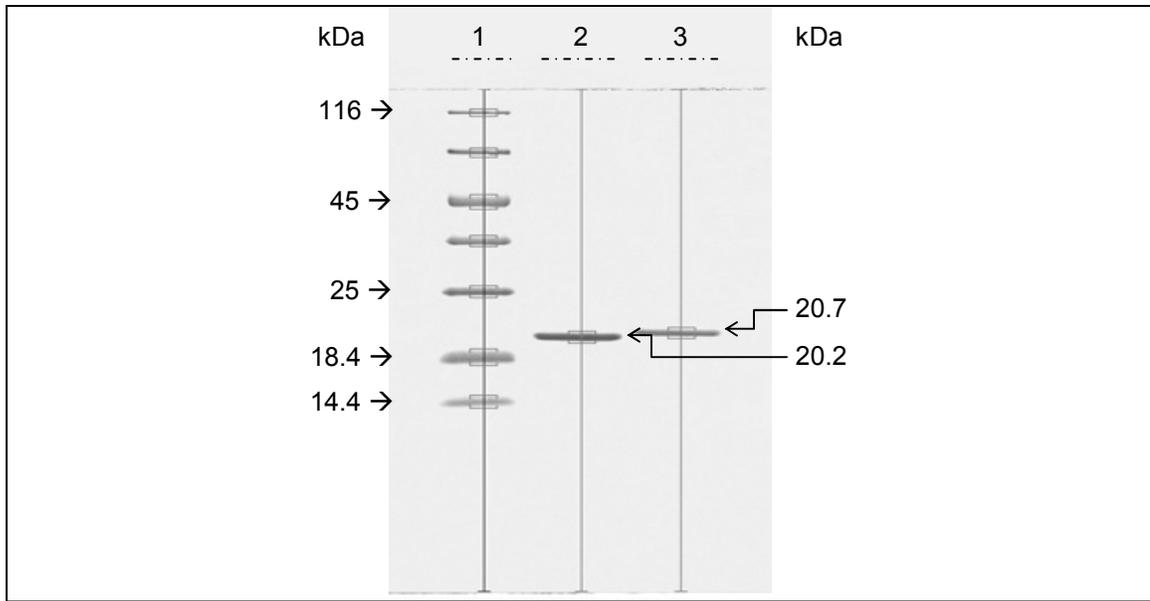


Figura 4- 10. Gel SDS-PAGE que muestra los valores de PM de las lipasas recombinantes de *B. pumilus* QC y *B. pumilus* GMA1. Carril 1: marcador de bajo peso molecular (Fermentas), 5 μ L; carril 2: LipAQC-6H, 5 μ L; carril 3: LipAGMA1-6H, 5 μ L.

Los valores utilizados en los cálculos de concentración para las lipasas son los pesos moleculares teóricos.

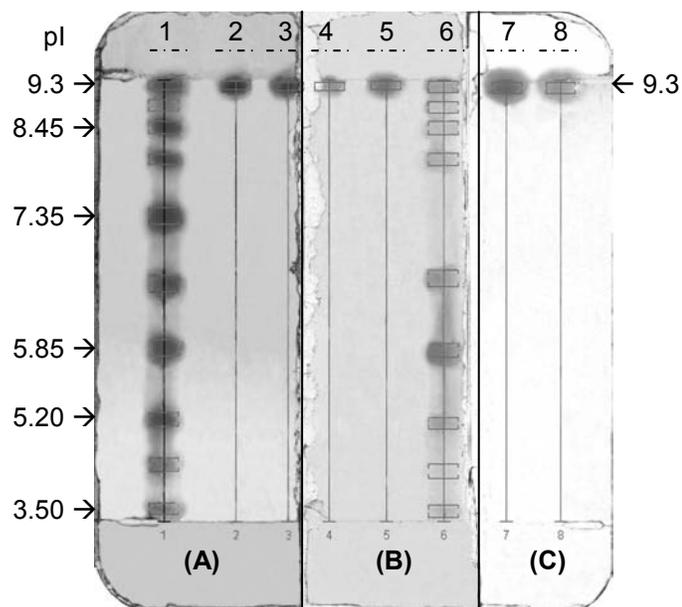


Figura 4- 11. Gel IEF que muestra los valores de pI de las lipasas recombinantes de *B. pumilus* QC y *B. pumilus* GMA1. (A) Tinción de Coomassie. (B) Tinción de Plata. (C) Actividad con α -naftil acetato. Carriles 1 y 6: marcador de pI de 3-9 (Healthcare), 5 μ L; carriles 2, 5 y 7: LipAGMA1-6H, 5 μ L; carriles 3, 4 y 8: LipAQC-6H, 5 μ L.

4.8. Ensayos cinéticos.

La determinación de las constantes cinéticas no se llevó a cabo por métodos tradicionales en los que se mide velocidades iniciales de reacción a distintas concentraciones de sustrato, sino que se obtuvieron a partir de curvas de progreso de la reacción de hidrólisis hasta el consumo casi total del sustrato. El ajuste de datos se hizo con el programa ENCORA v.1.2, en el cual se hicieron algunas consideraciones: la hidrólisis enzimática se tomó como una cinética simple, en la cual un sustrato (ej. pNFA) produce un solo producto (pNF) con una estequiometría de reacción sustrato:producto de 1:1, aunque también exista la intervención de una molécula de H₂O y se genere una molécula de ácido acético; el paso de pNFA→pNF se consideró irreversible puesto que en medio acuoso la reacción de hidrólisis es esencialmente irreversible; se verificó también que no existe degradación química del sustrato ni inactivación de la enzima en las condiciones empleadas, dados los resultados de estabilidad de éstos, los cuales se mencionan más adelante en la sección 4.8.3. En la Figura 4- 12, se muestra un ejemplo de un ajuste de datos hecho con el programa ENCORA v.1.2.

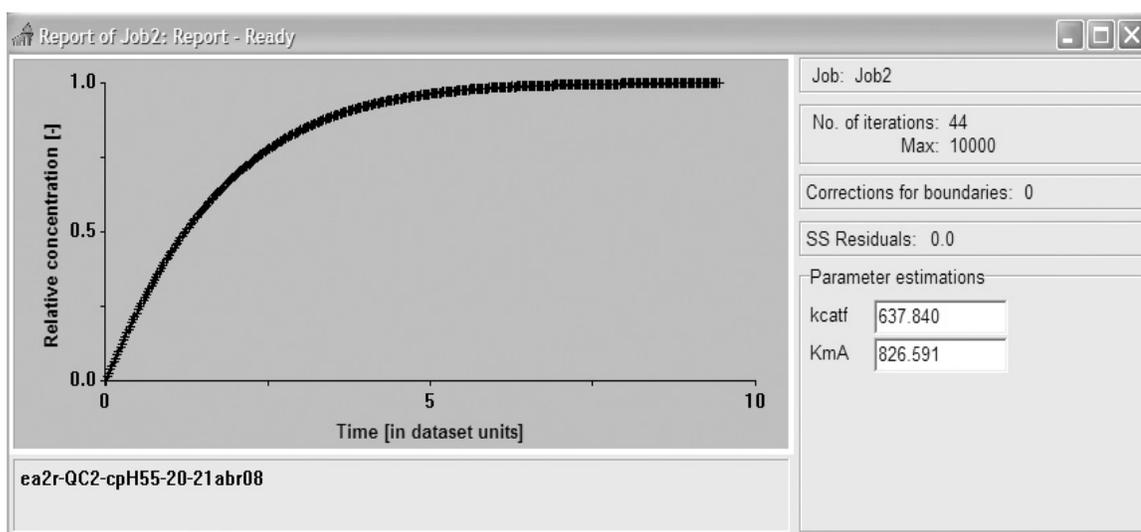


Figura 4- 12. Ejemplo de un ajuste de datos realizado con el programa Encora v.1.2., correspondiente a la curva de progreso de una reacción de hidrólisis de pNFA por LipAQC-6H en amortiguador de citratos 50 mM pH 5.5 a 20°C.

4.8.1. Constantes cinéticas.

Los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , se determinaron mediante ensayos espectrofotométricos a 20°C usando *p*-nitrofenil acetato (pNFA) como sustrato disuelto en diferentes tipos de amortiguadores (ajustados a diferente pH y diferente concentración de NaCl -representada como un cambio en la fuerza iónica- ΔI). Los valores de pH, NaCl y temperatura usados pretenden asimilar las condiciones promedio en las que se lleva a cabo la maduración de quesos. En la Tabla 4- 7 y en la Figura 4- 13 se muestran los valores de la constante de recambio (k_{cat}) y de la constante de afinidad (K_m) obtenidos del ajuste de datos y también se presentan los de la eficiencia catalítica o especificidad (k_{cat}/K_m) calculada a partir de éstos. Todas las reacciones se realizaron por cuadruplicado a 20°C con 1 μ M de enzima, 500 μ M de pNFA y 0.226% de Tritón X-100 disueltos en el amortiguador correspondiente de ensayo para obtener un volumen final de reacción de 1 mL. Se realizó un análisis de los datos obtenidos con ayuda del programa STATGRAPHICS Plus 5.1, para observar las diferencias estadísticamente significativas entre los valores con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 4- 7. Parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes ensayados a 20°C.

Amortiguador	pH	NaCl (%)	ΔI	Enzima	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (μ M)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ μ M ⁻¹)
Citratos 50 mM	5.5	0	0	LipAQC-6H	643.1 ^c \pm 10.9	841.4 ^c \pm 44.4	0.764 ^e
				LipAGMA1-6H	410.1 ^a \pm 20.7	725.0 ^b \pm 46.8	0.566 ^b
Citratos 50 mM	5.5	2	0.342	LipAQC-6H	789.9 ^d \pm 46.5	1224.1 ^e \pm 83.1	0.645 ^d
				LipAGMA1-6H	421.0 ^a \pm 27.5	1008.2 ^d \pm 22.8	0.418 ^a
Citratos 50 mM	5.5	5.5	0.941	LipAQC-6H	1009.7 ^e \pm 72.2	1122.4 ^e \pm 101.7	0.900 ^f
				LipAGMA1-6H	541.4 ^b \pm 47.8	986.6 ^d \pm 81.9	0.549 ^b
Fosfatos 50 mM	7.5	0	0	LipAQC-6H	567.9 ^b \pm 11.1	595.7 ^a \pm 15.2	0.953 ^g
				LipAGMA1-6H	383.9 ^a \pm 28.6	633.1 ^{ab} \pm 54.4	0.606 ^c

Los valores mostrados son un promedio \pm DS de cuatro mediciones independientes. Para la misma columna, distinta letra (a, b, c, d, e, f, g) representa diferencias estadísticamente significativas entre los valores a un nivel de confianza del 95%. Las letras en orden alfabético indican los valores en forma ascendente.

En la Figura 4- 13 se puede observar que para LipAQC-6H a un mismo pH (5.5) el valor de k_{cat} aumenta conforme aumenta el ΔI , y a un mismo valor de ΔI (0, 0% NaCl), k_{cat} disminuye al cambiar de pH 5.5 a pH 7.5, presentándose así el mayor valor de k_{cat} ($1009.7 \pm 72.2 \text{ min}^{-1}$) a pH 5.5 $\Delta I = 0.941$ (NaCl 5.5%) y el menor ($567.9 \pm 11.1 \text{ min}^{-1}$) a pH 7.5 con $\Delta I = 0$. Para LipAGMA1-6H la k_{cat} más grande ($541.4 \pm 47.8 \text{ min}^{-1}$) también se presenta a pH 5.5 y $\Delta I = 0.941$, sin embargo no existen diferencias estadísticamente significativas entre los demás valores a diferentes condiciones de reacción. Es de notar que para LipAQC-6H los valores de k_{cat} son mayores que para los de LipAGMA1-6H a las mismas condiciones experimentales.

Para ambas enzimas los valores de K_m más altos se presentan a pH 5.5 y dos diferentes ΔI , 0.342 (NaCl 2%) y 0.941 (NaCl 5.5 %), dado que a ambas condiciones los valores son los mismos dentro del error experimental y estadísticamente no representan diferencias. Mientras que los valores más bajos se presentan a pH 7.5 y $\Delta I = 0$ para las dos enzimas. Cabe decir que los valores de K_m son mayores para LipAQC-6H que para LipAGMA1-6H a las mismas condiciones de reacción, con la excepción de pH 7.5 y $\Delta I = 0$, en que son similares.

Los valores de k_{cat}/K_m , muestran que para LipAQC-6H el valor más alto de eficiencia catalítica se presenta a pH 7.5 y $\Delta I = 0$ siendo de $0.953 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$, seguido por el de pH 5.5 y $\Delta I = 0.941$, mientras que el más bajo fue a pH 5.5 y $\Delta I = 0.342$. Los valores de eficiencia catalítica para LipAGMA1-6H siguen la misma tendencia que para LipAQC-6H, pero difiere en que a pH 5.5 con $\Delta I = 0$ y $\Delta I 0.941$ los valores son estadísticamente iguales. Nuevamente, a las mismas condiciones, los valores de k_{cat}/K_m de LipAQC-6H son mayores que los de LipAGMA1-6H.

Para su funcionamiento, las enzimas requieren que los residuos catalíticos y los cercanos a éstos tengan el apropiado estado de protonación en el intervalo de pH activo. Varios factores influyen en la carga de los residuos portadores como la constante dieléctrica, la fuerza iónica y la proximidad de otros residuos cargados. El potencial electrostático generado por los residuos cargados desempeña un papel importante en la catálisis dado que participan en la estabilización de los estados de transición e influyen en la velocidad de asociación del sustrato al igual que en la liberación eficiente del producto. Por lo tanto, las interacciones entre la proteína y el sustrato así como con el producto están influenciadas por los diferentes valores de pH, fuerza iónica y la presencia de diferentes solventes [14].

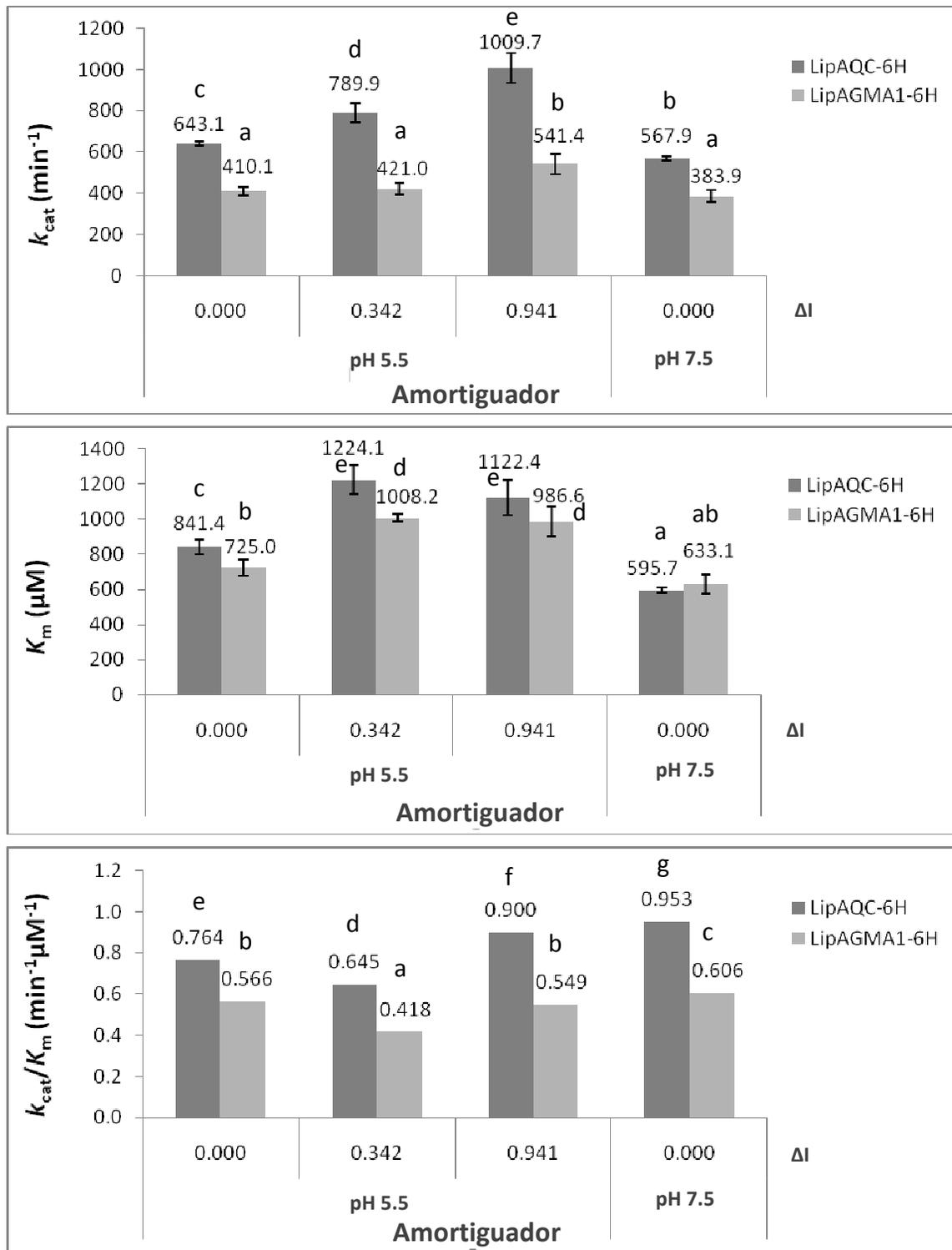


Figura 4- 13. Comparación de los parámetros cinéticos medidos con pNFA a 20°C en diferente amortiguador. Los valores mostrados son un promedio de cuatro mediciones independientes, la desviación estándar (DS) se muestra como barras de error. Para la misma gráfica, distinta letra (a,b,c,d,e,f,g) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores a un nivel de confianza del 95%. Las letras en orden alfabético indican los valores en forma asendente.

4.8.2. Especificidad de sustrato.

Para evaluar la especificidad de sustrato de las enzimas se determinaron los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , a las mismas condiciones utilizando como sustratos *p*-nitrofenil ésteres de distinta longitud de cadena: pNFB (C4:0), pNFD (C10:0) y pNFL (C12:0). Se realizó el ajuste de datos obtenidos de cada cinética de reacción con ayuda del programa ENCORA versión.1.2. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 20°C en un volumen de reacción de 1 mL con 1 μ M de enzima, 100 μ M del sustrato correspondiente y 0.226 % de Tritón X-100 en el amortiguador de citratos 50 mM ajustado a pH 5.5. Puesto que los ensayos con pNFA (C2) ya se habían realizado, los datos obtenidos fueron considerados para este análisis. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa STATGRAPHICS Plus 5.1, para observar las diferencias significativas entre los valores a un nivel de confianza del 95%. Los valores y las gráficas de resultados se muestran en la Tabla 4- 8 y Figura 4- 14, respectivamente.

Tabla 4- 8. Parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes en los ensayos de especificidad de sustrato ensayados en amortiguador de citratos 50 mM pH 5.5 a 20°C.

Sustrato	Enzima	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
pNFAcetato	LipAQC-6H	643.1 ^f \pm 10.9	841.4 ^e \pm 44.4	0.764 ^d
	LipAGMA1-6H	410.1 ^d \pm 20.7	725.0 ^d \pm 46.8	0.566 ^c
pNFButirato	LipAQC-6H	511.2 ^e \pm 7.5	199.9 ^{ab} \pm 38.6	2.557 ^e
	LipAGMA1-6H	253.9 ^c \pm 5.0	342.3 ^c \pm 33.1	0.742 ^{cd}
pNFDecanoato	LipAQC-6H	64.1 ^b \pm 4.6	250.2 ^b \pm 22.6	0.256 ^b
	LipAGMA1-6H	9.3 ^a \pm 1.4	135.8 ^a \pm 26.2	0.074 ^{ab}
pNFLaurato	LipAQC-6H	6.1 ^a \pm 0.2	144.8 ^a \pm 8.0	0.042 ^a
	LipAGMA1-6H	1.5 ^a \pm 0.4	135.6 ^a \pm 30.2	0.011 ^a

Los valores mostrados son un promedio \pm DS de cuatro mediciones independientes. Para la misma columna, distinta letra (a, b, c, d, e, f) representa diferencias estadísticamente significativas entre los valores a un nivel de confianza del 95%. Las letras en orden alfabético indican los valores en forma ascendente.

LipAQC-6H y LipAGMA1-6H muestran la misma tendencia en los valores de k_{cat} a través de los sustratos, siendo el valor más alto para pNFA (643.1 \pm 10.9 y 410.1 \pm 20.7 min^{-1} , respectivamente) disminuyendo con forme aumenta el largo de cadena. Los valores de k_{cat} para LipAQC-6H son mayores que los exhibidos por LipAGMA1-6H para el mismo sustrato.

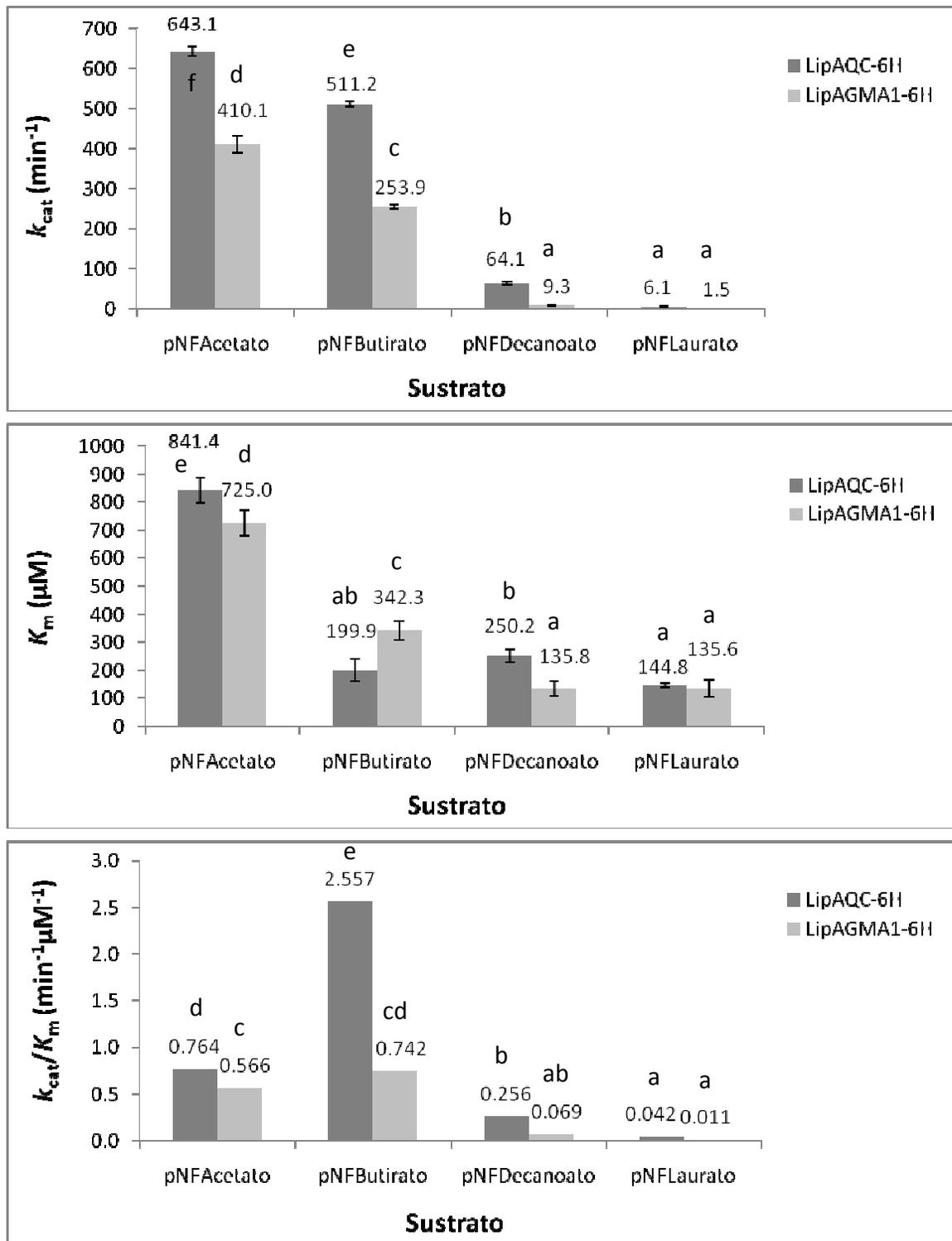


Figura 4- 14. Comparación de los parámetros cinéticos medidos con pNF-ésteres de distinta longitud de cadena a 20°C en amortiguador de citratos 50 mM a pH 5.5. Los valores mostrados son un promedio de cuatro mediciones independientes, la desviación estándar (DS) se muestra como barras de error. Para la misma gráfica, distinta letra (a,b,c,d,e,f) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores a un nivel de confianza del 95%. Las letras en orden alfabético indican los valores en forma ascendente.

El valor más alto de K_m para LipAQC-6H se presenta para pNFA ($841.4 \pm 44.4 \mu\text{M}$), siguiéndole en orden decreciente los de pNFD>pNFB>pNFL. Para LipAGMA1-6H el valor más alto es el de pNFA ($725 \pm 46.8 \mu\text{M}$), siendo los más pequeños los de pNFD y pNFL por igual.

La mayor eficiencia catalítica la presenta LipAQC-6H con pNFB ($2.557 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$), debido a su elevada k_{cat} y baja K_m , la cual es 3.5 veces mayor que la de LipAGMA1-6H para el mismo sustrato ($0.742 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$). La baja eficiencia catalítica de ambas lipasas con los sustratos de pNFD y pNFL se debe a que presentan los valores más bajos tanto para la k_{cat} como para la K_m .

Con lo anterior se puede aseverar que LipAQC-6H tiene preferencia por el sustrato de *p*-nitrofenil butirato (C4), mientras que LipAGMA1-6H presenta preferencia semejante por sustratos de cadena corta (C2 y C4) dada la eficiencia catalítica de cada una.

4.8.3. Estabilidad de sustratos y enzimas.

Al evaluar la estabilidad de los sustratos (medida mediante el cambio en la absorbancia de mezclas con la misma composición que las mezclas de reacción, pero sin la adición de las lipasas) se mostró que éstos fueron estables en las condiciones empleadas durante los tiempos que duraron las reacciones, dado que no se presentaron cambios en la absorbancia. Lo cual indica que los datos obtenidos de las cinéticas se deben solamente a la hidrólisis enzimática y no a una hidrólisis química.

Las enzimas también fueron estables en las condiciones y tiempos de reacción empleados, como se observa en la Figura 4- 15. En los amortiguadores a pH 5.5 se observa una ligera activación de ambas enzimas, LipAQC-6H y LipAGMA1-6H, del tiempo 0 a los 5 minutos, mientras que la actividad permanece relativamente constante del minuto 5 al 60. En la actividad medida al mismo pH (5.5) pero a diferente fuerza iónica no se aprecia diferencia significativa, dado que los valores se encuentran entre un rango de 1.15 a 1.36. Por lo que, se considera que la enzima es estable en estas condiciones después de una activación inicial, sin embargo, no se tiene una explicación para este comportamiento en la actividad. Por otro lado, en el amortiguador a pH 7.5 se observa una actividad constante para ambas enzimas desde el tiempo 0 hasta los 60 minutos.

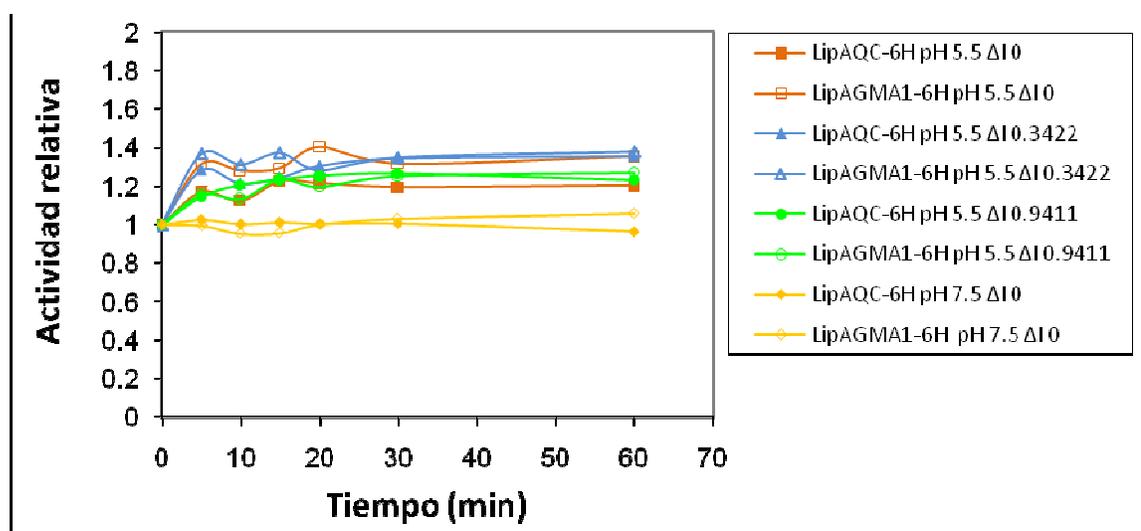


Figura 4- 15. Estabilidad de las enzimas a las diferentes condiciones y tiempos de reacción.

4.9. Hidrólisis de grasa butírica.

El perfil de ácidos grasos liberados por la acción hidrolítica de las lipasas recombinantes, LipAQC-6H y LipAGMA1-6H, se obtuvo mediante el análisis por cromatografía de gases de las muestras indicadas en la Tabla 3-11. La reacción de hidrólisis se inició adicionando a cada emulsión la lipasa correspondiente a una concentración final de 1 μM y se incubaron a 20°C durante distintos tiempo de reacción (0, 24 y 48 h). Cada mezcla de reacción se preparó por duplicado, por lo que para su análisis se calcularon los promedios y las desviaciones estándar.

Se determinó la concentración de los ácidos grasos libres y totales presentes en cada muestra mediante el análisis por cromatografía de gases, con ayuda de curvas de calibración hechas a partir de soluciones estándar de concentración conocida de metil ésteres de ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Para el análisis cromatográfico, cada muestra preparada se inyectó por duplicado y las soluciones estándar se inyectaron por triplicado, por lo que para su análisis se calcularon los promedios.

Se usaron estándares internos, ácido valérico y ácido tridecanoico, para la corrección por la pérdida de metil ésteres causada por evaporación. El porcentaje de recuperación de los estándares internos se usó como referencia para el cálculo de la concentración de los ácidos grasos libres y totales. Para los ácidos butírico, hexanoico y octanoico se usó el ácido valérico como referencia y para los de mayor longitud de cadena el ácido tridecanoico.

El porcentaje de hidrólisis se calculó a partir del peso de cada ácido graso liberado con respecto a la cantidad total de ese mismo presente en cada muestra. Los resultados se muestran en la Tabla 4- 9 y en las Figuras 4- 16 y 4-17, los cuales han sido corregidos con sus respectivos blancos, sin embargo, la corrección no tuvo un efecto significativo en los valores, dado que la hidrólisis química es despreciable. Las diferencias significativas en el porcentaje de hidrólisis para un mismo ácido graso a diferentes condiciones de reacción se analizaron estadísticamente con el programa STATGRAPHICS Plus 5.1.

El ácido graso liberado mayoritariamente por ambas lipasas es el ácido butanoico (C4:0), el cual presenta porcentajes entre el 95 ± 1.08 y 100 ± 1.37 % en los diferentes tiempos, los cuales se consideran iguales dentro del error experimental. El segundo ácido graso con mayor porcentaje de hidrólisis es el ácido hexanoico (C6:0), el cual es similar en ambas lipasas a los diferentes tiempos.

En general el perfil de ácidos grasos obtenido por la hidrólisis de grasa butírica fue muy similar para ambas lipasas recombinantes a los diferentes tiempos, 24 y 48 h, dado que los valores de los porcentajes de hidrólisis son los mismos dentro del error experimental a excepción del obtenido con LipAQC-6H a 48 h, los cuales son ligeramente mayores para algunos ácidos grasos de cadena media y larga (ver Figura 4- 17). Los porcentajes disminuyen conforme se pasa de cadena corta a media (de 100 ± 1.08 % a 25.88 ± 0.70 %) y se vuelven a incrementar ligeramente en los de cadena larga (54.99 ± 5.32 %). Cabe señalar que la mayor proporción de hidrólisis se llevó a cabo en las primeras 24 h, aunque LipAQC-6H presenta un ligero aumento a las 48 h.

A pesar de que el ácido palmítico constituye el ácido graso más abundante de los ácidos grasos disponibles totales (28-30%), éste sólo es hidrolizado en un 30%. Sin embargo, el ácido butírico que representa entre el 5-6% de los ácidos grasos totales es hidrolizado en su totalidad.

Por lo anterior, se puede decir que ambas lipasas presentan marcada selectividad por la hidrólisis de lípidos de cadena corta (C4-C6) presentes en la grasa butírica, lo cual es ventajoso en la industria de productos lácteos, en la que se prefiere la liberación de ácidos grasos de cadena corta y mediana de los triglicéridos de la leche en la maduración de quesos, por la influencia que presentan en la determinación de olores y sabores característicos

Cabe señalar que la reactividad de las enzimas recombinantes LipAQC-6H y LipAGMA1-6H con el sustrato natural de grasa butírica, coincide con lo observado en el análisis de los parámetros cinéticos utilizando sustratos sintéticos de *p*-nitrofenil ésteres.

Tabla 4- 9. Porcentaje en peso de hidrólisis lipolítica (cantidad de cada ácido graso liberado con respecto a su total presente en cada muestra).

Ácidos grasos libres	% de hidrólisis \pm DS							
	EB00	EB24	EG24	EQ24	EB48	EG48	EQ48	
C4:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	97.81 \pm 1.23	95.19 \pm 1.08	0.00 \pm 0.00	99.28 \pm 1.17	100.00 \pm 1.37	
C6:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	68.95 \pm 0.12	67.78 \pm 0.55	13.09 \pm 0.93	67.12 \pm 1.90	67.40 \pm 3.09	
C8:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	58.26 \pm 1.64	52.55 \pm 0.34	0.00 \pm 0.00	56.16 \pm 1.71	65.60 \pm 7.90	
C10:0	0.85 \pm 0.00	0.79 \pm 0.10	48.15 \pm 0.95	47.10 \pm 1.24	0.73 \pm 0.01	48.96 \pm 3.19	57.20 \pm 5.51	
C12:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	36.67 \pm 0.57	35.76 \pm 0.88	0.00 \pm 0.00	37.52 \pm 2.85	46.58 \pm 6.13	
C14:0	1.39 \pm 0.00	1.43 \pm 0.03	26.49 \pm 0.26	25.88 \pm 0.70	1.25 \pm 0.03	27.41 \pm 2.31	34.45 \pm 5.29	
C15:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	31.06 \pm 0.35	30.94 \pm 1.00	0.00 \pm 0.00	31.72 \pm 2.21	36.41 \pm 3.96	
C16:0	0.84 \pm 0.01	0.70 \pm 0.00	29.48 \pm 0.03	26.64 \pm 0.55	0.71 \pm 0.08	30.17 \pm 2.33	34.82 \pm 4.27	
C17:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	35.44 \pm 4.03	32.78 \pm 1.04	0.00 \pm 0.00	33.18 \pm 2.08	35.61 \pm 3.05	
C18:0	0.91 \pm 0.00	0.82 \pm 0.15	41.01 \pm 0.15	34.85 \pm 0.81	0.86 \pm 0.18	41.15 \pm 3.27	44.91 \pm 4.49	
C18:1	0.96 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	49.13 \pm 0.23	41.29 \pm 0.39	0.89 \pm 0.27	47.15 \pm 2.23	54.99 \pm 5.32	
C18:2	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	37.57 \pm 0.21	35.26 \pm 0.66	0.00 \pm 0.00	37.25 \pm 2.19	43.06 \pm 4.63	
C19:0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	45.35 \pm 0.42	42.32 \pm 2.08	0.00 \pm 0.00	43.62 \pm 2.62	53.32 \pm 8.40	
C18:3	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	46.70 \pm 0.20	43.22 \pm 1.21	0.00 \pm 0.00	45.17 \pm 2.23	52.38 \pm 5.13	

Los valores mostrados son un promedio \pm DS de dos mediciones independientes.

EB00: emulsión blanco sin lipasa incubada 0 h.

EB24: emulsión blanco sin lipasa incubada 24 h.

EG24: emulsión con LipAGMA1-6H incubada 24 h.

EQ24: emulsión con LipAQC-6H incubada 24 h.

EB48: emulsión blanco sin lipasa incubada 48 h.

EG48: emulsión con LipAGMA1-6H incubada 48 h.

EQ48: emulsión con LipAQC-6H incubada 48 h.

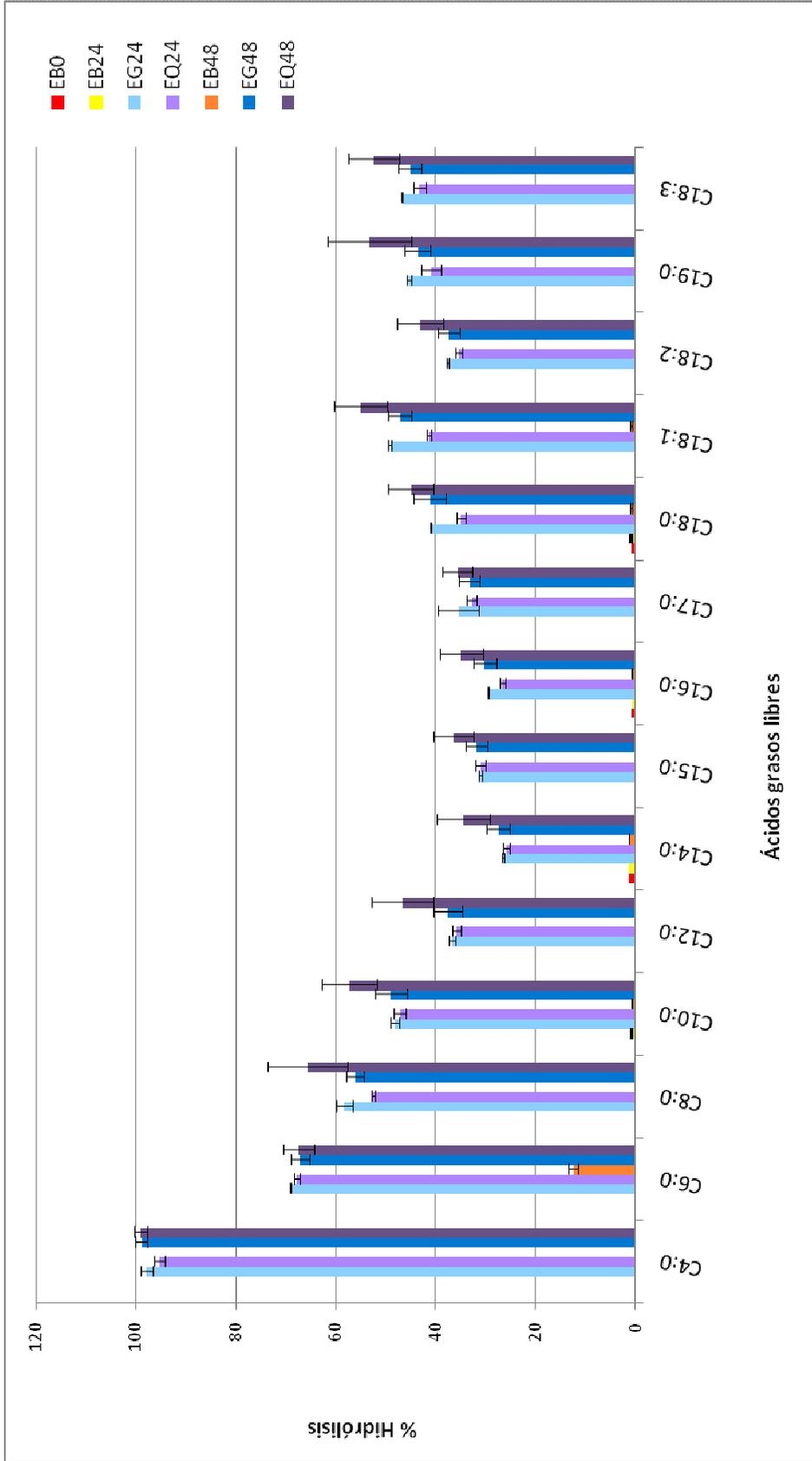


Figura 4- 16. Grafica del porcentaje en peso de hidrólisis lipolítica (cantidad de cada ácido graso libre con respecto a su total presente en cada muestra). Los valores mostrados son un promedio de dos mediciones independientes. La desviación estándar (DS) se muestra como barras de error. EB00: emulsión blanco sin lipasa incubada 0 h; EB24: emulsión blanco sin lipasa incubada 24 h; EG24: emulsión con LipAGMA1-6H incubada 24 h; EQ24: emulsión con LipAQC-6H incubada 24 h; EB48: emulsión blanco sin lipasa incubada 48 h; EG48: emulsión con LipAGMA1-6H incubada 48 h; EQ48: emulsión con LipAQC-6H incubada 48 h.

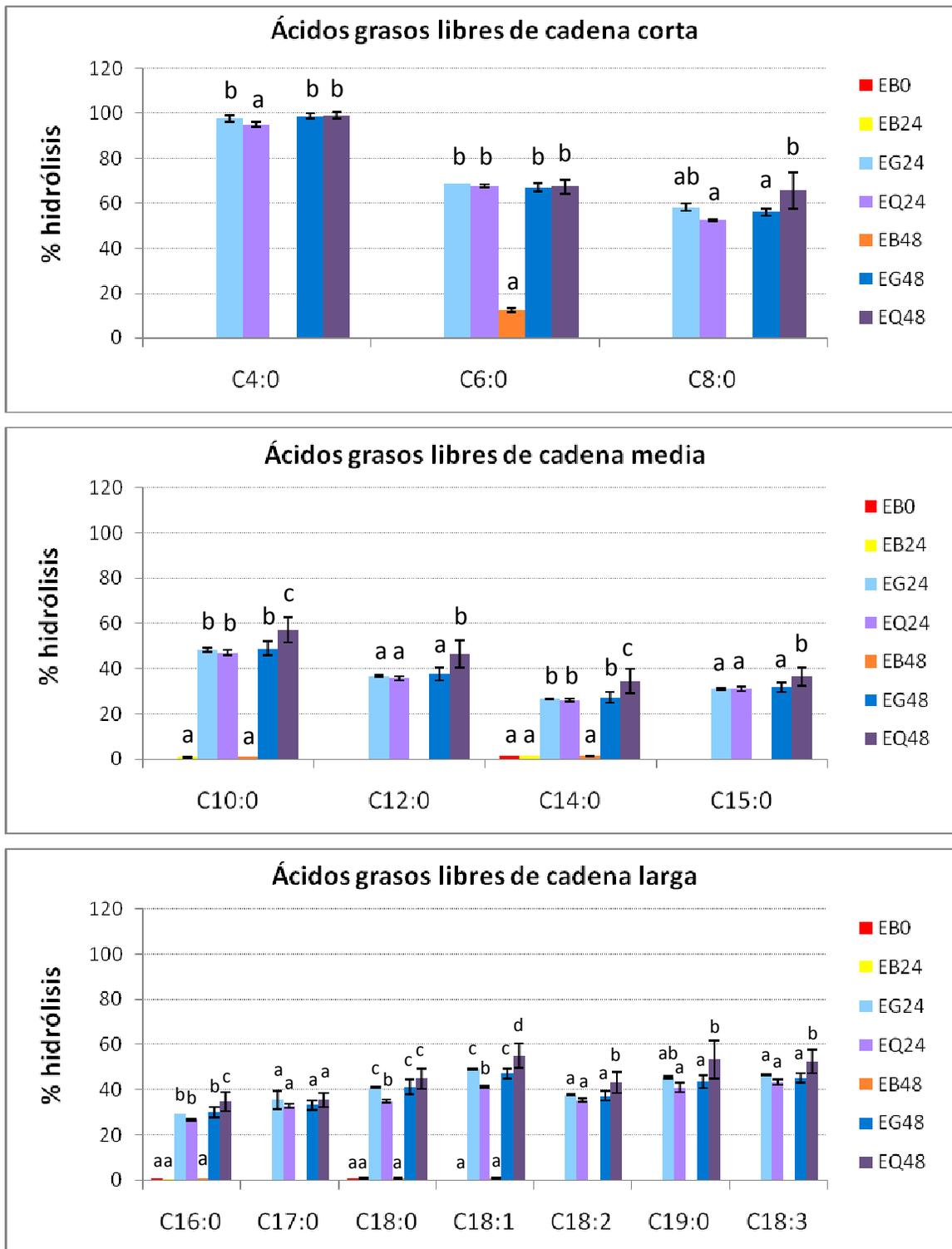


Figura 4- 17. Porcentaje en peso de hidrólisis lipolítica (cantidad de cada ácido graso liberado con respecto a su total presente en cada muestra). La desviación estándar (DS) se muestra como barras de error. Para un mismo ácido graso, distinta letra (a,b,c,d) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores a un nivel de confianza del 95%. Las letras en orden alfabético indican los valores en forma ascendente.

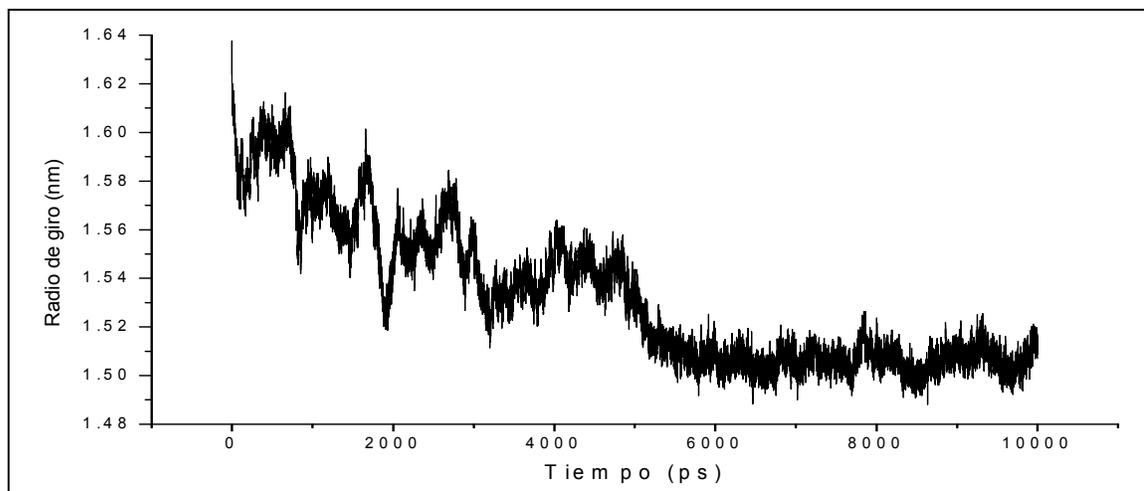
4.10. Modelo estructural 3D de la lipasa recombinante.

El número de proteínas que cuentan con la determinación de su estructura cristalina se incrementa continuamente. Con la disponibilidad de bases de datos de proteínas y programas de modelado ahora es posible el desarrollo de modelos estructurales tridimensionales (3D) por comparación con el modelo apropiado de una proteína si ésta comparte una alta identidad con alguna estructura 3D conocida.

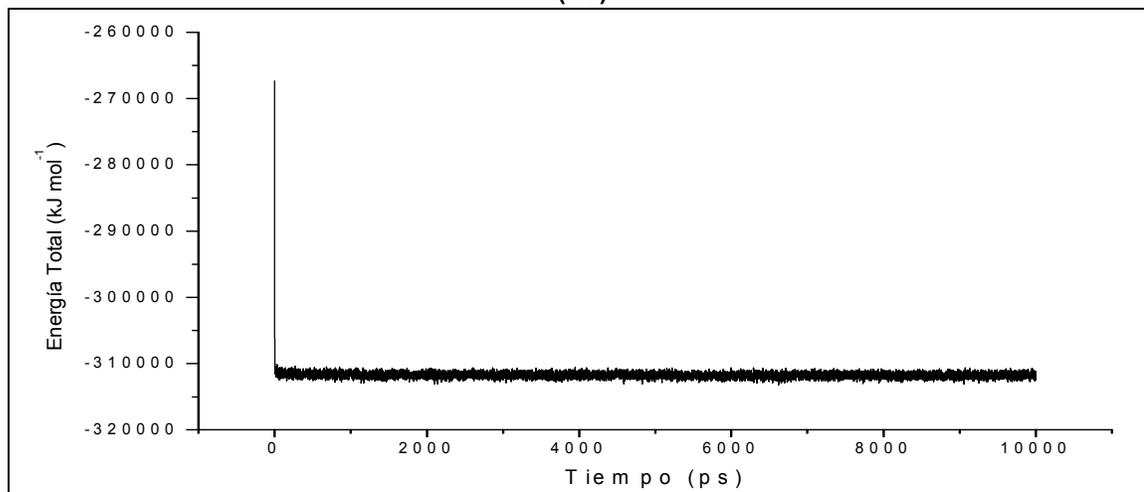
Se obtuvo la estructura tridimensional de la lipasa nativa LipAQC, a partir de la secuencia de aminoácidos, con ayuda del programa de modelado comparativo de proteínas ESyPred3D [49]. Dicha estructura se construyó por homología usando como molde la estructura 3D de la lipasa LipA de *B. subtilis* (116W cadena A) de la cual se tiene la estructura cristalográfica [19]. La forma madura de ambas enzimas cuenta con 181 residuos de aminoácido y tiene una identidad del 76%. Se ha postulado que, con una identidad tan alta, las diferencias entre un modelo y la estructura cristalográfica no deben ser mayores a las diferencias a nivel de la traza de carbonos a entre dos estructuras cristalográficas de la misma proteína [50,51].

El modelo tridimensional de la lipasa recombinante LipAQC-6H se produjo adicionando al modelo estructural 3D de LipAQC la Met inicial y la etiqueta de histidinas haciendo uso del programa PyMol. Posteriormente los residuos adicionados se dejaron plegar al someter la estructura a 10 ns de dinámica molecular en agua, utilizando el programa GROMACS v.3.3.1. [52]. Se ocupó un sistema periódico de celda cúbica sin fronteras con el campo de fuerza GROMOS-96 43a1, diseñado para simular proteínas en disoluciones acuosas o no polares. Para controlar la temperatura y mantenerla a 300 K se ocupó el algoritmo de Berendsen (termostato) con una constante de acoplamiento de 0.1 ps. Del mismo modo, el sistema se acopló a un barostato para mantener la presión constante. En este caso también se utilizó el algoritmo Berendsen, con acoplamiento isotrópico y una constante de acoplamiento de 0.5 ps. La compresibilidad del sistema en esas condiciones es $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ y la presión de referencia es 1 bar. Para evitar problemas electrostáticos el sistema se neutralizó con el programa genion, que es parte del GROMACS, con el que cinco moléculas de agua se reemplazaron por igual número de iones de cloruro (Cl^-) para mantener la neutralidad del sistema. Para considerar las interacciones electrostáticas a larga distancia se utilizó el algoritmo PME (particle-mesh Ewald) [53]. El radio de giro para todos los átomos de la proteína se muestra en la Figura 4- 18 A. Esta figura muestra como después del plegamiento de los aminoácidos adicionados, que termina aproximadamente a los 5 ns, el radio de giro se mantiene

estable, indicando que el sistema se compactó y llegó a un equilibrio. La energía total del sistema, mostrada en la Figura 4- 18 B, indica que el sistema se encuentra esencialmente en equilibrio durante toda la simulación.



(A)



(B)

Figura 4- 18. (A) Evolución del radio de giro durante la dinámica molecular. (B) Evolución de la energía total del sistema durante la dinámica molecular.

La estructura promedio resultante de los últimos 3 ns de la dinámica, cuando la proteína ya estaba compactada y en equilibrio, se muestra en la Figura 4- 19. En ésta se observa el plegamiento α/β -hidrolasa característico de éste tipo de proteínas, en el que se puede observar una hoja β central compuesta de 6 hebras β paralelas rodeadas por hélices α . En la figura se muestran las cadenas laterales de los residuos de la triada catalítica Ser77, Asp133 e His156.

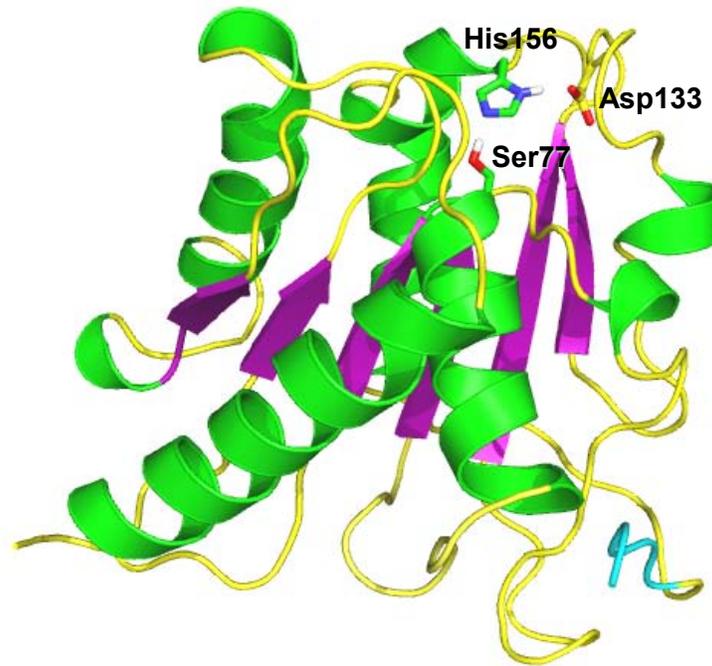


Figura 4- 19. Modelo de la estructura tridimensional de la lipasa recombinante LipAQC-6H. Se indican los residuos de la triada catalítica Ser77, Asp133 e His156. Rojo: átomos de oxígeno; azul: átomos de nitrógeno; gris: átomos de hidrógeno; azul claro: etiqueta de histidinas.

El modelo estructural 3D de la lipasa LipAGMA1-6H fue proporcionado por el Dr. Ismael Bustos-Jaimes y en la Figura 4- 20 se muestra la comparación por superposición de los modelos de las lipasas recombinantes (LipAQC-6H verde, LipAGMA1-6H azul). Los modelos 3D obtenidos bajo las mismas condiciones resultan en dinámicas moleculares distintas. En la Figura 4- 20 A se marcan los residuos que son diferentes entre cada proteína en color naranja (se etiquetan los correspondientes a LipAQC-6H), los pertenecientes a la triada catalítica se indican en morado y los de la etiqueta de histidinas en azul. En la Figura 4- 20 B se observa un acercamiento del sitio catalítico en el que se muestran las cadenas laterales de los residuos Ser77, Asp133 e His156. En la estructura de LipAQC-6H los residuos His156 y Asp133 se encuentran más cercanos a la Ser77, que para la estructura de LipAGMA1-6H.

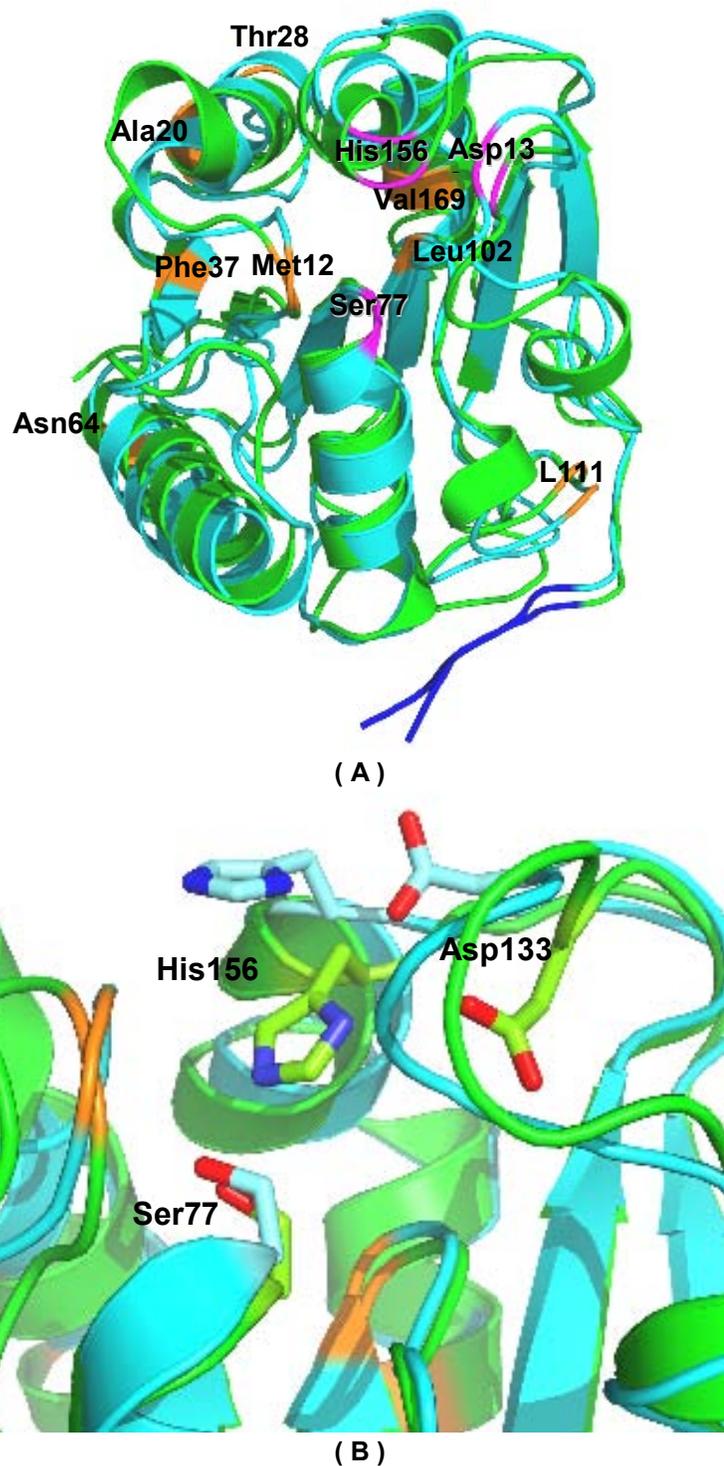


Figura 4- 20. Superposición de los modelos tridimensionales de las proteínas LipAQC-6H (verde) y LipAGMA1-6H (azul claro). (A) Estructura 3D completa. Naranja: diferencias en aminoácidos (se indican los pertenecientes a LipAQC-6H); morado: sitio catalíticos; azul fuerte: etiqueta de histidinas. (B) Acercamiento del sitio catalítico. Rosa: átomos de oxígeno; azul: átomos de nitrógeno.

5. CONCLUSIONES.

Se logró amplificar y secuenciar la región que codifica para una lipasa madura de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano. El fragmento amplificado fue clonado y sobre-expresado en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET+LipAQC. La secuencia silvestre de nucleótidos codifica para una proteína de 181 aminoácidos, que presenta siete diferencias con respecto a la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, caracterizada previamente, lo que representa un 96% de identidad.

La proteína recombinante correspondiente, la lipasa LipAQC-6H, fue producida a partir de un cultivo de transformantes BL21/pET+LipAQC inducido durante 3 h, mediante la adición de IPTG a una concentración de 0.5 mM. La lipasa LipAQC-6H, con 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal, fue purificada mediante cromatografía de afinidad y caracterizada. Ésta presenta una mutación que provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de la secuencia silvestre, de Asp64 por Asn64.

Con ayuda del programa ProtParam (ExpASy) se calcularon el peso molecular y el punto isoeléctrico de la lipasa recombinante, siendo de 20.5 kDa y 9.45, respectivamente. Estos valores se confirmaron experimentalmente (SDS-PAGE e IEF).

Los análisis cinéticos comparativos de la lipasas recombinantes LipAQC-6H y LipAGMA1-6H mostraron que la actividad enzimática de ambas lipasas recombinantes es sensible a cambios de pH y fuerza iónica, lo que se demostró al determinar las propiedades catalíticas calculando las constantes cinéticas k_{cat} y K_m a diferentes condiciones de reacción. Para LipAQC-6H la mayor eficiencia catalítica, $0.9 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$, se presenta a pH 5.5 con NaCl al 5.5%, mientras que para LipAGMA1-6H es de $0.953 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ a pH 7.5 sin NaCl.

Se evaluó la especificidad de sustrato de cada lipasa recombinante comparando las constantes cinéticas, k_{cat} y K_m , de las reacciones de hidrólisis enzimática con sustratos de *p*-nitrofenil ésteres de distinta longitud de cadena a pH 5.5 y 20°C. Ambas enzimas presentan la mayor constante catalítica con *p*-nitrofenil butirato siendo de $2.557 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ para LipAQC-6H y de $0.742 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ para LipAGMA1-6H.

El perfil de hidrólisis de grasa butírica indica una preferencia de ambas lipasas por ácidos grasos de cadena corta, C4 y C6, presentando un porcentaje de hidrólisis del 95-100 % para el primero y del 67-69% para el segundo.

Ambas enzimas presentan marcada especificidad por lípidos de cadena corta (C4-C6) lo cual es ventajoso en la industria de productos lácteos, en la que se prefiere la liberación de ácidos grasos de cadena corta y mediana de los triglicéridos de la leche en la maduración de quesos.

El tipo y posición de los ocho residuos diferentes de las lipasas recombinantes provocaron diferencias en los parámetros cinéticos, sin embargo no afectaron la especificidad de sustrato.

6. ANEXO I. Protocolos.

6.1. Reactivación de *Bacillus pumilus*.

Caldo nutritivo:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u> <u>para 1 litro</u>	<u>Marca</u>
Caldo nutritivo	8 g	Oxoid
Agua destilada	1 L	-

Equipo

Autoclave

Preparación:

- Se hacen los cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Disolver el caldo nutritivo en polvo en la mitad del volumen de agua.
- Aforar la solución a la cantidad calculada.
- Tomar alícuotas de 10 mL de solución y pasar a tubos de 15 mL.
- Esterilizar los tubos en autoclave a 121°C durante 15 min.

Reactivación:

Equipo

Incubadora

Procedimiento:

- Sacar del ultracongelador (-70°C) un tubo de los gliceroles con chaquiras de la bacteria lipolítica aislada del queso Cotija.
- Tomar una chaquiras con un asa estéril y depositar en un tubo con 10 mL de caldo nutritivo.
- Dejar en incubación a 37°C con agitación a 250 rpm durante 18 h.

6.2. Ensayos de actividad enzimática en cajas Petri.

Agar-tributirina:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad para</u>	<u>Marca</u>
	<u>1 litro</u>	
Bacto-triptona	10 g	Difco
Extracto de levadura	5 g	Oxoid
Cloruro de sodio	10 g	J.T Baker
Tributirina	10 mL	Sigma
Agar microbiológico	15 g	Difco
Glucosa 20%	5 mL	-
Agua desionizada	1 L	-

Equipo

Autoclave

Emulsificador

Preparación:

- Se hacen los cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Preparar glucosa al 20% y esterilizar por filtración.
- Disolver la Bacto-triptona, el extracto de levadura y el cloruro de sodio en agua desionizada.
- Adicionar la tributirina y emulsificar a la velocidad mínima de 2 a 3 minutos.
- Ajustar el pH a 7.5.
- Agregar el agar.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.
- Enfriar y agregar la glucosa.
- Distribuir en cajas Petri.

Agar-leche descremada:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u> <u>para 1 litro</u>	<u>Marca</u>
Leche descremada	15 g	Oxoid
Agar microbiológico	15 g	Difco
Agua destilada	1 L	-

Equipo

Autoclave

Preparación:

- Se hacen los cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Disolver la leche descremada y el agar en el agua destilada.
- Esterilizar en autoclave a 110°C por 20 min.
- Enfriar y distribuir en cajas petri.

Medición de actividad lipolítica:**Equipo**

Incubadora

Estufa

Procedimiento:

- Se reactiva el microorganismo en caldo nutritivo.
- Tomar del medio de reactivación inoculado con un asa estéril y sembrar en forma de estría en cajas con medio agar-tributirina y agar-leche descremada.
- Incubar las cajas de manera invertida en estufa a 37°C durante 18 h.
- Observar los halos de actividad enzimática.

6.3. Identificación de *Bacillus pumilus*.

Tinción de Gram:

<u>Sustancias</u>	<u>Solución</u>
Cristal violeta	Disolver 2 g de cristal violeta en 20 mL de etanol.
Lugol	Disolver 1:5 en etanol.
Solución alcohol-acetona	Disolver 150 mL de acetona en 350 mL de etanol.
Safranina	Disolver 0.25 g de safranina en 10 mL de etanol y agregar 100 mL de agua destilada y filtrar.
Agua destilada	-
Aceite de inmersión	-

<u>Equipo</u>	<u>Marca</u>
Microscopio	Olimpus CX31

Procedimiento:

- Se hace un frotis de colonias aisladas en caja petri y del medio de reactivación:
 - Tomar con un asa estéril una colonia o muestra del medio líquido y esparcirla sobre un porta-objetos.
 - Dejar secar y pasar el porta-objetos dos veces sobre la llama.
- Cubrir el frotis con 1 o 2 gotas de cristal violeta y dejar actuar durante 1 min. Inmediatamente lavar con agua destilada.
- Cubrir con 1 o 2 gotas de lugol y dejar actuar durante 1 min. Inmediatamente lavar con agua destilada.
- Decolorar con la solución de alcohol-acetona hasta que ya no se arrastre color.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir con 1 o 2 gotas de safranina y dejar actuar durante 1 min. Inmediatamente lavar con agua destilada y dejar secar.
- Observar al microscopio con lente 100x y aceite de inmersión.

Pruebas bioquímicas API:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Marca</u>
Kit de galerías API 50 CH	1	bioMérieux
Kit de Medio API 50 CHB/E	1	bioMérieux
Solución NaCl 0.85%	50 mL	Esterilizado a 121°C/15 min
Agua	10 mL	Esterilizado

<u>Equipo</u>	<u>Marca</u>
Autoclave	-
Centrífuga	-
Incubadora	-
Espectrómetro	Milton Ray Modelo Espectronic 21D
Programa informático de identificación	bioMérieux

Procedimiento:

- Se inoculan 4 tubos con caldo nutritivo con 4 diferentes colonias aisladas en caja Petri respectivamente y se incuban a 35°C con agitación a 250 rpm por 20 h.
- Centrifugar a 3500 rpm por 15 min y tirar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado de células en 5 mL de solución de NaCl 0.85% y juntar dos tubos.
- Centrifugar a 3500 rpm por 15 min y tirar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado de células en 2 mL de solución de NaCl 0.85% y juntar los dos tubos.
- Añadir pequeñas alícuotas de la solución de células poco a poco en 5 mL de agua y medir la densidad óptica hasta obtener el número de McFarland ($DO_{600}=0.468$).
- Seguir el instructivo del *kit*.
- Observar, interpretar y anotar los cambios de color de los microtubos de la galería a las 24 y 48 h.
- Introducir el perfil bioquímico en el programa informático de identificación APiLAB Plus (bioMérieux v.3.3.3).

6.4. Extracción de ADN para su secuenciación.

Medio BHI:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u> <u>para 1L</u>	<u>Marca</u>
Bacto BHI	37 g	BD Difco
Amortiguador de fosfatos pH=7.2	1 L	-

Preparación:

- Hacer cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Disolver el BHI en el amortiguador y calentar un poco.
- Tomar alícuotas de 10 mL y pasar a tubos para centrifuga de 15 mL.
- Esterilizar a 121°C por 15 min.

Amortiguador PBS:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u> <u>para 50 mL</u>	<u>Marca</u>
NaCl	0.4 g	J.T. Baker
KCl	0.01 g	J.T. Baker
Na ₂ HPO ₄	0.072 g	Merck
KHPO ₄	0.012 g	J.T. Baker
Agua destilada	50 mL	-

Preparación:

- Hacer cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Disolver las cuatro sales en $\frac{3}{4}$ partes del volumen de agua y ajustar pH=7.4
- Aforar hasta el volumen calculado.
- Esterilizar a 121°C por 15 min.

SDS 10%:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad para 50 mL</u>
SDS	5 g
Agua desionizada	50 mL

Preparación:

- Hacer cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Manejar el SDS con cuidado (utilizar cubre-bocas).
- Disolver en el agua.

Amortiguador TE:

<u>Sustancias</u>	<u>Concentración final</u>
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
Agua destilada	-

Preparación:

- Hacer cálculos para obtener la concentración final indicada de cada sustancia.
- Disolver en $\frac{3}{4}$ partes de agua previamente esterilizada y ajustar el pH=8.
- Aforar hasta el volumen calculado.
- Esterilizar a 121°C por 15 min.

RNAsa:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad para 50 mL</u>
RNAsa	5 g
Agua desionizada	50 mL

Preparación:

- Hacer cálculos para la cantidad deseada.
- Disolver con un poco de calentamiento la RNAsa en agua previamente esterilizada.

Extracción de ADN:**Sustancias**

NaCl 0.85%	Solución fenol-cloroformo-isoamílico
Amortiguador PBS	Agua desionizada estéril
Lisozima	Etanol 100%
Proteinasa K (4 mg/mL)	Etanol 75%
Hielo	Amortiguador TE
SDS 10%	RNAsa (1 µg/mL)
NaCl 6 M	

Equipo

Autoclave
Incubadora
Centrífuga
Termomixer

Procedimiento:

- Tomar células de un cultivo puro y crecer en medio BHI a 37°C y 250 rpm de agitación durante 24 h.
- Centrifugar los tubos a 3500 rpm por 10 min. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender precipitado de células en 1 mL de NaCl 0.85% y agitar vigorosamente. Pasar a un tubo para centrifuga de 1.5 mL.
- Centrifugar los tubos a 3500 rpm por 10 min. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender precipitado de células en 150 µL de amortiguador PBS y agitar vigorosamente
- Adicionar 20 µg de Lisozima y mezclar invirtiendo el tubo 5 o 6 veces.
- Incubar a 37°C durante 30 min con ayuda de un termomixer.

- Agregar 1.4 μL de Proteinasa K y agitar delicadamente.
- Incubar en hielo durante 5 min.
- Añadir 10 μL de SDS 10% y mezclar invirtiendo el tubo.
- Incubar a 40°C por 30 min.
- Adicionar 200 μL de NaCl 6M y agitar levemente.
- » Añadir 800 μL (doble del volumen que se tiene) de solución fenol-cloroformo-isoamílico y agitar vigorosamente.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min.
- Recuperar la fase superior (fase acuosa que contiene el ADN) sin traer la nata formada en la interfase y pasar a un tubo de 1.5 mL limpio.
- Repetir desde » hasta que ya no haya formación de nata.
- ≈ Adicionar 1 mL de etanol 100% frío o 1 mL de isopropanol e invertir el tubo 2 o 3 veces y guardar en congelación a -20°C mínimo 1 h.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min y tirar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con 300 μL de etanol 75% hasta que haya desaparecido el olor a fenol.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min y desechar el sobrenadante.
- Dejar que se evapore el etanol remanente a temperatura ambiente.
- Resuspender el precipitado en 100 μL de amortiguador TE o agua.

Purificación de ADN con RNAasa:

- Agregar 20 μL de RNAasa y agitar vigorosamente en corto tiempo.
- Incubar a 40°C por 30 min en un termomixer.
- Añadir 100 μL de NaCl 6M y agitar levemente.
- » Realizar una extracción con 400 μL de solución fenol-cloroformo-isoamílico y agitar vigorosamente.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min
- Recuperar con una punta la fase superior (fase acuosa que contiene el ADN) sin traer la nata formada en la interfase y pasar a un tubo de 1.5 mL limpio.
- Seguir el procedimiento anterior desde ≈.

6.5. Clonación y sobre-expresión de LipAQC-6H.

Medio Luria-Bertani (LB):

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad para 1 L</u>	<u>Marca</u>
Bacto-triptona	10 g	BD Bacto Dickson
Extracto de levadura	5 g	Oxoid
NaCl	10 g	JT Baker
Agua destilada	1 L	-
Kanamicina	-	Invitrogen
Ampicilina	-	Invitrogen
Agar microbilógico	15 g	Difco

Equipo

Autoclave

Preparación:

- Se hacen los cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Disolver la Bacto-triptona, el extracto de levadura y el cloruro de sodio en agua hasta aforación y ajustar el pH a 7.5.
- Esterilizar a 121°C por 15 min y dejar enfriar el medio.
- Si se requiere, adicionar la cantidad necesaria del antibiótico correspondiente en solución esterilizado por filtración de modo que se obtenga una concentración final de 100 µg/mL de medio.

Agar Luria-Bertani (LB):

Preparación:

- Se hacen los cálculos para preparar la cantidad deseada.
- Preparar medio LB de la misma manera que en el procedimiento anterior sólo que se adiciona el agar después de ajustar el pH y antes de esterilizar.
- Adicionar el antibiótico si se requiere y distribuir en cajas Petri.

Digestión de vectores:

<u>Reactivos</u>	<u>Cantidad para 10 μL</u>	<u>Marca</u>
Vector purificado	1-2 μ L	
Amortiguador 4	1 μ L	New England Biolabs
BSA	1 μ L	New England Biolabs
Enzima <i>Nde</i> I	0.5 μ L	New England Biolabs
Enzima <i>Xho</i> I	0.5 μ L	New England Biolabs
Agua desionizada	c.b.p. 10 μ L	

Equipo

Estufa

Procedimiento:

- Si se va a realizar más de una digestión se puede preparar una mezcla de mayor volumen (sin adicionar vectores) y luego dividirla.
- Se hacen los cálculos para la cantidad deseada.
- Preparar la mezcla adicionando el agua, el amortiguador y el BSA.
- Adicionar la cantidad necesaria del vector a digerir.
- Adicionar las enzimas de restricción.
- Incubar a 37°C durante 2 h.

Reacción de ligación:

<u>Reactivos</u>	<u>Cantidad para 40 μL</u>
Amortiguador de ligación 10X	4 μ L
Ligasa	4 μ L
Inserto	16 μ L
Vector digerido	8 μ L
Agua desionizada	8 μ L

Procedimiento:

- Se hacen los cálculos para la cantidad deseada.
- Hacer la preparación de la mezcla en hielo adicionando el agua, el amortiguador, el inserto y el vector digeridos (conservar una relación 2:1 del inserto y vector).
- Adicionar la ligasa.
- Guardar inmediatamente en refrigeración a 4°C durante toda la noche.

Agar LB-Amp-Tributirina-IPTG:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u> <u>para 50 mL</u>	<u>Marca</u>
Agar LB		-
Tributirina		-
Tween 80	10 μ L	
Ampicilina		Invitrogen
IPTG		-
Agua destilada	50 mL	-

Equipo

Autoclave

Sonicador

Preparación:

- Se hacen los cálculos para la cantidad deseada.
- Adicionar 250 μ L de tributirina a un vaso de precipitados con 50 mL de agua.
- Adicionar una gotita de Tween 80 a fin de ayudar a emulsificar la tributirina.
- Sonicar esta disolución durante 20 seg a 45% de amplitud 2 o 3 veces, o si se prefiere, trasvasar la emulsión a un frasco para esterilizar con tapa-rosca y agitar fuertemente hasta que se observe formación de la emulsión.
- Adicionar 2 g de agar LB, cerrar y agitar fuertemente.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min, o bien, calentar la emulsión 20 seg aproximadamente 3 o 4 veces en horno de microondas con precaución para que empiece a hervir y se disuelva el agar (sacar con cuidado y agitar suavemente entre calentadas) y dejar enfriar el medio.
- Adicionar la cantidad necesaria de ampicilina en solución esterilizada por filtración de modo que se obtenga una concentración final de 100 μ g/mL de medio.
- Adicionar la cantidad necesaria de IPTG en solución y esterilizado por filtración de modo que se obtenga una concentración final de 0.5 mM.
- Distribuir en cajas Petri.

6.6. Electroforesis SDS-PAGE.

Gel SDS-PAGE:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad para 2 geles</u>	
	<u>Gel concentrador 4% (mL)</u>	<u>Gel Separador 12.5% (mL)</u>
Agua	6.1	3.24
Amortiguador Tris-HCl 1 M pH 6.8	2.5	-
Amortiguador Tris-HCl 1 M pH 8.8	-	2.5
Acilamida 30.%-Bis 0.8%	1.3	4.16
SDS 10%	0.1	0.1
APS 10%	0.050	0.050
TEMED	0.008	0.008

Equipo

Placas de vidrio

Espaciadores

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Preparación:

- Se hacen los cálculos para la cantidad deseada.
- Limpiar con etanol los vidrios.
- Ensamblar los moldes contenedores del gel.
- Preparar primero el gel separador:
 - Mezclar en un vaso de precipitados todas las sustancias menos el TEMED.
 - Adicionar el TEMED e inmediatamente vaciar la mezcla con pipeta al molde.
 - Esperar a que gelifique.
- Preparar el gel concentrador:

- Mezclar en un vaso de precipitados todas las sustancias menos el TEMED.
- Adicionar el TEMED e inmediatamente vaciar la mezcla con pipeta al molde.
- Esperar a que gelifique.
- Montar el gel en la cámara de electroforesis con sistema enfriador.
- Adicionar el amortiguador de Laemli.
- Cargar cuidadosamente con pipeta las muestras y el marcador en el gel.
- Hacer pasar una corriente eléctrica 100-200 V hasta que el colorante indicador salga del gel.

Visualización del gel SDS-PAGE:

<u>Sustancias</u>	<u>Solución teñidora</u> <u>Cantidad para 1 L</u>	<u>Solución desteñidora</u> <u>Cantidad para 1 L</u>
Azul de Coomasie	250 mg	
Metanol	400 mL	500 mL
Ácido acético	70 mL	100 mL
H ₂ O	530 mL	400 mL

Preparación:

- Se hacen los cálculos para la cantidad deseada.
- Preparar las soluciones teñidora y desteñidora mezclando las sustancias correspondientes.
- Desmontar el gel y colocar en un recipiente contenedor.
- Adicionar solución teñidora hasta cubrir el gel y dejar en agitación constante hasta que éste adquiera coloración azul.
- Cambiar la solución del gel por solución desteñidora y dejar en agitación constante hasta que se revele el patrón de bandas y el gel pierda coloración.
- Se puede usar un transiluminador de luz visible para mejor apreciación.

6.7. Cuantificación de proteína.

Reactivo BCA:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u> <u>para 500 mL</u>
Ácido bincinconfínico (BCA)	5.0 g
Na ₂ CO ₃ anhidro	8.55 g
Tartrato dibásico dihidratado	0.8 g
NaOH	2.0 g
NaHCO ₃	4.73 g
Agua destilada	c.b.p.

Equipo

Autoclave

Sonicador

Preparación:

- Se hacen los cálculos para la cantidad deseada.
- Se enjuaga todo el material con agua destilada.
- Disolver la sal con un poco de agua en un vaso de precipitados.
- Ajustar el pH a 11.3 con una disolución de NaOH (10 N).
- Aforar al volumen calculado.
- Conservar en frasco de vidrio en refrigeración a 4°C.

6.8. Determinación de pl.

Actividad “in situ” con α -naftil acetato:

<u>Sustancias</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Marca</u>
Fosfatos 0.05 M pH 7.5	-	Sigma
Tritón X100	-	-
H ₂ O desionizada	-	-
<u>Solución A</u>	<u>para 25 mL</u>	
α -naftil acetato	10 mg	Sigma
Acetona	2.5 mL	-
Fosfatos 0.1 M pH 7.5	22.5 mL	Sigma
<u>Solución B</u>		
Fast Red	25 mg	Sigma
Tritón X100	0.025 mL	-
Fosfatos 0.1 M pH 7.5	22.5 mL	Sigma

Procedimiento:

- Realizar una electroforesis en gel SDS-PAGE con las muestras a las que se medirá la actividad.
- Después de la electroforesis, lavar el gel con agua desionizada.
- Colocar el gel en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.5 y dejar reposar durante 30 min.
- Preparar la solución A: Disolver el α -naftil acetato en acetona y aforar a la cantidad calculada con el amortiguador de fosfatos.
- Desechar el amortiguador y lavar el gel con agua desionizada.
- Cubrir el gel con la solución A y dejar actuar durante 20 min.
- Preparar la solución B: Disolver el Fast Red en el amortiguador de fosfatos y adicionar el tritón X100 a 0.1%.
- Terminando el tiempo de reacción adicionar la solución B.
- Lavar el gel con agua desionizada recién se empiecen a revelar las bandas de actividad.
- Dejar el gel en amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7.5.

6.9. Ensayos de actividad enzimática.

Preparación de soluciones estándar de sustratos de *p*-nitrofenil ésteres.

Las disoluciones de los sustratos de *p*-nitrofenil ésteres se preparan disolviendo completamente (con uso de vortex) en 100 μ L de Triton X-100 la cantidad necesaria de sustrato para tener una concentración final de 4424.78 μ M y después se adicionan 900 μ L del amortiguador a ocupar en el ensayo. Si se desea se puede preparar una primera solución más concentrada y de ésta tomar para preparar una segunda disolución con la concentración deseada cuidando de mantener la concentración de Tritón X-100 al 10% en la disolución final.

Preparación de resina Amberlyst.

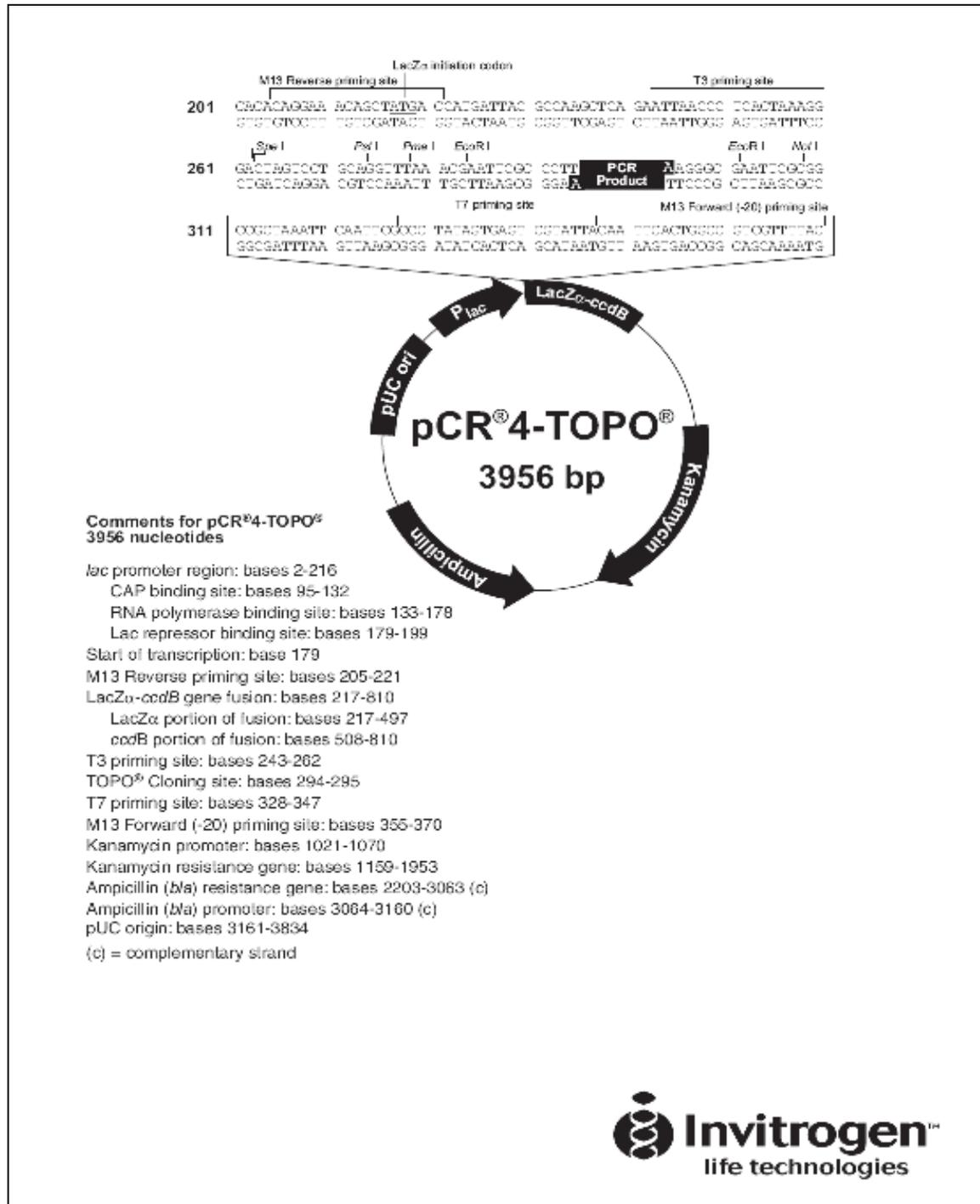
Amberlyst A-26 (Aldrich) es una resina de intercambio iónico fuertemente básica, especialmente ajustada para su uso en medio no acuoso, con una estructura macrorreticular (poro 20-50 mesh). Antes de su uso se prepara como indica Needs y col. [47].

Preparación:

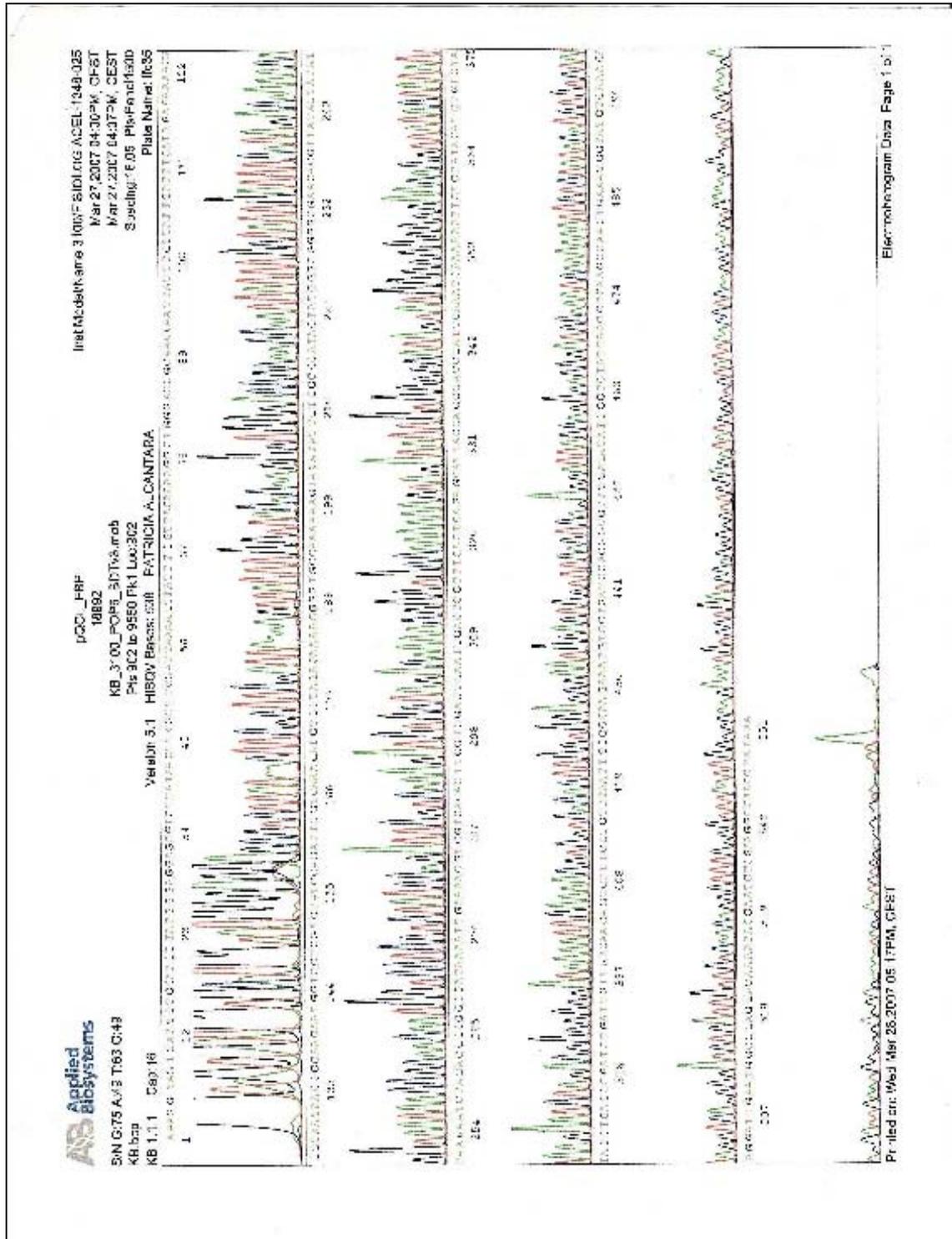
- Poner en agitación 2 g de resina con 20 mL de NaOH 1M durante 15 min.
- Lavar 3 veces con 30 mL de agua destilada agitando 10 min entre cada lavada.
- Lavar 3 veces con 15 mL de metanol (agitar 10 min de entre cada lavada)
- Guardar para su uso en metanol a 4°C.

7. ANEXO I. Secuencias.

7.1. Secuencia del plásmido pCR4-TOPO.



7.5. Secuencia del gen *lipA* de *B. pumilus* QC.



7.6. Comparación de secuencias con la región V3 del gen 16S de *B. pumilus* QC y *B. pumilus* GMA1.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB478145.1	Bacillus sp. A-A-N-2. gene for 16S rRNA, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ561297.1	Bacillus sp. f-2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ561296.1	Bacillus sp. q-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ561295.1	Bacillus sp. f-2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ594457.1	Bacillus sp. B5FD2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ561054.1	Bacillus sp. LSF-63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ561053.1	Bacillus sp. LSF-97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ189791.1	Bacillus pumilus strain CSB16 16S ribosomal RNA gene, partial seq	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ189775.1	Bacillus pumilus strain NSB11 16S ribosomal RNA gene, partial seq	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ189763.1	Bacillus pumilus strain MSB09 16S ribosomal RNA gene, partial seq	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ533860.1	Bacillus sp. JQ1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ514809.1	Bacillus sp. qv23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ549019.1	Bacillus pumilus strain SH-B30 16S ribosomal RNA (rrs) gene, parti:	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ549015.1	Bacillus pumilus strain SH-B23 16S ribosomal RNA (rrs) gene, parti:	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ549008.1	Bacillus pumilus strain SH-B3 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ494698.1	Bacillus pumilus strain SY28 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ477100.1	Bacillus pumilus strain 016T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ477099.1	Bacillus pumilus strain 013T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ477098.1	Bacillus pumilus strain 012T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ477097.1	Bacillus pumilus strain 010T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ477096.1	Bacillus pumilus strain 007T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ477095.1	Bacillus pumilus strain 001T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ461466.1	Bacillus sp. SCS5510 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ457116.1	Bacillus pumilus strain GZUB30 16S ribosomal RNA gene, partial se	364	364	100%	6e-98	100%	
AM913912.1	Bacillus sp. LD121 partial 16S rRNA gene, isolate LD121	364	364	100%	6e-98	100%	
AM913908.1	Bacillus sp. LD82 partial 16S rRNA gene, isolate LD82	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ434657.1	Bacillus pumilus strain GZUB17 16S ribosomal RNA gene, partial seq	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ482082.1	Bacillus pumilus strain SAL 16 16S ribosomal RNA gene, partial seq	364	364	100%	6e-98	100%	
FJ066869.1	Bacillus sp. WPC8021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	364	364	100%	6e-98	100%	
EU870511.1	Bacillus pumilus strain Sua-BAC016 16S ribosomal RNA gene, parti:	364	364	100%	6e-98	100%	
EU870509.1	Bacillus pumilus strain Sua-BAC014 16S ribosomal RNA gene, parti:	364	364	100%	6e-98	100%	
EU870501.1	Bacillus pumilus strain Sua-BAC004 16S ribosomal RNA gene, parti:	364	364	100%	6e-98	100%	
EU870500.1	Bacillus pumilus strain Sua-BAC003 16S ribosomal RNA gene, parti:	364	364	100%	6e-98	100%	

7.7. Comparación de secuencias de la región que codifica para la lipasa de *B. pumilus* QC.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP000813.1	Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	821	821	100%	0.0	93%	
EF093106.1	Bacillus pumilus strain F3 lipase precursor, gene, complete cds	754	754	100%	0.0	91%	
AJ297356.2	Bacillus licheniformis ORF (partial), lip gene and lcm gene	743	743	100%	0.0	91%	
EU552794.1	Bacillus pumilus strain GMA1 lipase precursor, gene, partial cds	721	721	100%	0.0	90%	
D0339137.1	Bacillus pumilus strain YZ02 lipase gene, complete cds	715	715	100%	0.0	90%	
FM878604.1	Bacillus pumilus lipase gene for triacylglycerol lipase, strain MB003	710	710	100%	0.0	90%	
AY494714.1	Bacillus pumilus lipase precursor, gene, complete cds	710	710	100%	0.0	90%	
AF232707.1	Bacillus sp. B26 lipase gene, complete cds	710	710	100%	0.0	90%	
EU414610.1	Bacillus licheniformis strain XSP-09 lipase gene, partial cds	704	704	100%	0.0	90%	
EU482152.1	Bacillus pumilus strain B106 lipase (lipA) gene, complete cds	699	699	100%	0.0	89%	
EF434173.1	Bacillus pumilus strain XJU-13 lipase gene, partial cds	695	695	99%	0.0	90%	
FJ467614.1	Bacillus pumilus strain HZbp lipase gene, partial cds	686	686	97%	0.0	90%	
D0345448.1	Bacillus pumilus mutant lipase precursor, gene, complete cds	665	665	98%	0.0	89%	



SN: Q218 A124 T1 53 C134
XB.hcp
XB 1.1 GEN 1

L17term:color
20865

KB_3100_PICPG_B313.mdb
Pls Go to 12380 PK1_1cc54c

Version 1.1 HIBOY Bases: BDI MAYRA PATRICIA ALCANTARA

Inst: Masci/Karre J100/FIS OLOGI/ACEL-1346-Q2E
Seq: 17,2007 02:48PM, CEST
Seq: 17,2007 02:25PM, CEST
Spacing: 15.48 Pcs/Panel/000
Plate Name: H092

637 643 649 655 661 667 673 679 685 691 697 703 709 715 721 727 733 739 745 751 757 763 769 775 781 787 793 799 805 811 817 823 829 835 841 847 853 859 865 871 877 883 889 895 901 907 913 919 925 931 937 943 949 955 961 967 973 979 985 991 997 1003 1009 1015 1021 1027 1033 1039 1045 1051 1057 1063 1069 1075 1081 1087 1093 1099 1105 1111 1117 1123 1129 1135 1141 1147 1153 1159 1165 1171 1177 1183 1189 1195 1201 1207 1213 1219 1225 1231 1237 1243 1249 1255 1261 1267 1273 1279 1285 1291 1297 1303 1309 1315 1321 1327 1333 1339 1345 1351 1357 1363 1369 1375 1381 1387 1393 1399 1405 1411 1417 1423 1429 1435 1441 1447 1453 1459 1465 1471 1477 1483 1489 1495 1501 1507 1513 1519 1525 1531 1537 1543 1549 1555 1561 1567 1573 1579 1585 1591 1597 1603 1609 1615 1621 1627 1633 1639 1645 1651 1657 1663 1669 1675 1681 1687 1693 1699 1705 1711 1717 1723 1729 1735 1741 1747 1753 1759 1765 1771 1777 1783 1789 1795 1801 1807 1813 1819 1825 1831 1837 1843 1849 1855 1861 1867 1873 1879 1885 1891 1897 1903 1909 1915 1921 1927 1933 1939 1945 1951 1957 1963 1969 1975 1981 1987 1993 1999 2005 2011 2017 2023 2029 2035 2041 2047 2053 2059 2065 2071 2077 2083 2089 2095 2101 2107 2113 2119 2125 2131 2137 2143 2149 2155 2161 2167 2173 2179 2185 2191 2197 2203 2209 2215 2221 2227 2233 2239 2245 2251 2257 2263 2269 2275 2281 2287 2293 2299 2305 2311 2317 2323 2329 2335 2341 2347 2353 2359 2365 2371 2377 2383 2389 2395 2401 2407 2413 2419 2425 2431 2437 2443 2449 2455 2461 2467 2473 2479 2485 2491 2497 2503 2509 2515 2521 2527 2533 2539 2545 2551 2557 2563 2569 2575 2581 2587 2593 2599 2605 2611 2617 2623 2629 2635 2641 2647 2653 2659 2665 2671 2677 2683 2689 2695 2701 2707 2713 2719 2725 2731 2737 2743 2749 2755 2761 2767 2773 2779 2785 2791 2797 2803 2809 2815 2821 2827 2833 2839 2845 2851 2857 2863 2869 2875 2881 2887 2893 2899 2905 2911 2917 2923 2929 2935 2941 2947 2953 2959 2965 2971 2977 2983 2989 2995 3001 3007 3013 3019 3025 3031 3037 3043 3049 3055 3061 3067 3073 3079 3085 3091 3097 3103 3109 3115 3121 3127 3133 3139 3145 3151 3157 3163 3169 3175 3181 3187 3193 3199 3205 3211 3217 3223 3229 3235 3241 3247 3253 3259 3265 3271 3277 3283 3289 3295 3301 3307 3313 3319 3325 3331 3337 3343 3349 3355 3361 3367 3373 3379 3385 3391 3397 3403 3409 3415 3421 3427 3433 3439 3445 3451 3457 3463 3469 3475 3481 3487 3493 3499 3505 3511 3517 3523 3529 3535 3541 3547 3553 3559 3565 3571 3577 3583 3589 3595 3601 3607 3613 3619 3625 3631 3637 3643 3649 3655 3661 3667 3673 3679 3685 3691 3697 3703 3709 3715 3721 3727 3733 3739 3745 3751 3757 3763 3769 3775 3781 3787 3793 3799 3805 3811 3817 3823 3829 3835 3841 3847 3853 3859 3865 3871 3877 3883 3889 3895 3901 3907 3913 3919 3925 3931 3937 3943 3949 3955 3961 3967 3973 3979 3985 3991 3997 4003 4009 4015 4021 4027 4033 4039 4045 4051 4057 4063 4069 4075 4081 4087 4093 4099 4105 4111 4117 4123 4129 4135 4141 4147 4153 4159 4165 4171 4177 4183 4189 4195 4201 4207 4213 4219 4225 4231 4237 4243 4249 4255 4261 4267 4273 4279 4285 4291 4297 4303 4309 4315 4321 4327 4333 4339 4345 4351 4357 4363 4369 4375 4381 4387 4393 4399 4405 4411 4417 4423 4429 4435 4441 4447 4453 4459 4465 4471 4477 4483 4489 4495 4501 4507 4513 4519 4525 4531 4537 4543 4549 4555 4561 4567 4573 4579 4585 4591 4597 4603 4609 4615 4621 4627 4633 4639 4645 4651 4657 4663 4669 4675 4681 4687 4693 4699 4705 4711 4717 4723 4729 4735 4741 4747 4753 4759 4765 4771 4777 4783 4789 4795 4801 4807 4813 4819 4825 4831 4837 4843 4849 4855 4861 4867 4873 4879 4885 4891 4897 4903 4909 4915 4921 4927 4933 4939 4945 4951 4957 4963 4969 4975 4981 4987 4993 4999 5005 5011 5017 5023 5029 5035 5041 5047 5053 5059 5065 5071 5077 5083 5089 5095 5101 5107 5113 5119 5125 5131 5137 5143 5149 5155 5161 5167 5173 5179 5185 5191 5197 5203 5209 5215 5221 5227 5233 5239 5245 5251 5257 5263 5269 5275 5281 5287 5293 5299 5305 5311 5317 5323 5329 5335 5341 5347 5353 5359 5365 5371 5377 5383 5389 5395 5401 5407 5413 5419 5425 5431 5437 5443 5449 5455 5461 5467 5473 5479 5485 5491 5497 5503 5509 5515 5521 5527 5533 5539 5545 5551 5557 5563 5569 5575 5581 5587 5593 5599 5605 5611 5617 5623 5629 5635 5641 5647 5653 5659 5665 5671 5677 5683 5689 5695 5701 5707 5713 5719 5725 5731 5737 5743 5749 5755 5761 5767 5773 5779 5785 5791 5797 5803 5809 5815 5821 5827 5833 5839 5845 5851 5857 5863 5869 5875 5881 5887 5893 5899 5905 5911 5917 5923 5929 5935 5941 5947 5953 5959 5965 5971 5977 5983 5989 5995 6001 6007 6013 6019 6025 6031 6037 6043 6049 6055 6061 6067 6073 6079 6085 6091 6097 6103 6109 6115 6121 6127 6133 6139 6145 6151 6157 6163 6169 6175 6181 6187 6193 6199 6205 6211 6217 6223 6229 6235 6241 6247 6253 6259 6265 6271 6277 6283 6289 6295 6301 6307 6313 6319 6325 6331 6337 6343 6349 6355 6361 6367 6373 6379 6385 6391 6397 6403 6409 6415 6421 6427 6433 6439 6445 6451 6457 6463 6469 6475 6481 6487 6493 6499 6505 6511 6517 6523 6529 6535 6541 6547 6553 6559 6565 6571 6577 6583 6589 6595 6601 6607 6613 6619 6625 6631 6637 6643 6649 6655 6661 6667 6673 6679 6685 6691 6697 6703 6709 6715 6721 6727 6733 6739 6745 6751 6757 6763 6769 6775 6781 6787 6793 6799 6805 6811 6817 6823 6829 6835 6841 6847 6853 6859 6865 6871 6877 6883 6889 6895 6901 6907 6913 6919 6925 6931 6937 6943 6949 6955 6961 6967 6973 6979 6985 6991 6997 7003 7009 7015 7021 7027 7033 7039 7045 7051 7057 7063 7069 7075 7081 7087 7093 7099 7105 7111 7117 7123 7129 7135 7141 7147 7153 7159 7165 7171 7177 7183 7189 7195 7201 7207 7213 7219 7225 7231 7237 7243 7249 7255 7261 7267 7273 7279 7285 7291 7297 7303 7309 7315 7321 7327 7333 7339 7345 7351 7357 7363 7369 7375 7381 7387 7393 7399 7405 7411 7417 7423 7429 7435 7441 7447 7453 7459 7465 7471 7477 7483 7489 7495 7501 7507 7513 7519 7525 7531 7537 7543 7549 7555 7561 7567 7573 7579 7585 7591 7597 7603 7609 7615 7621 7627 7633 7639 7645 7651 7657 7663 7669 7675 7681 7687 7693 7699 7705 7711 7717 7723 7729 7735 7741 7747 7753 7759 7765 7771 7777 7783 7789 7795 7801 7807 7813 7819 7825 7831 7837 7843 7849 7855 7861 7867 7873 7879 7885 7891 7897 7903 7909 7915 7921 7927 7933 7939 7945 7951 7957 7963 7969 7975 7981 7987 7993 7999 8005 8011 8017 8023 8029 8035 8041 8047 8053 8059 8065 8071 8077 8083 8089 8095 8101 8107 8113 8119 8125 8131 8137 8143 8149 8155 8161 8167 8173 8179 8185 8191 8197 8203 8209 8215 8221 8227 8233 8239 8245 8251 8257 8263 8269 8275 8281 8287 8293 8299 8305 8311 8317 8323 8329 8335 8341 8347 8353 8359 8365 8371 8377 8383 8389 8395 8401 8407 8413 8419 8425 8431 8437 8443 8449 8455 8461 8467 8473 8479 8485 8491 8497 8503 8509 8515 8521 8527 8533 8539 8545 8551 8557 8563 8569 8575 8581 8587 8593 8599 8605 8611 8617 8623 8629 8635 8641 8647 8653 8659 8665 8671 8677 8683 8689 8695 8701 8707 8713 8719 8725 8731 8737 8743 8749 8755 8761 8767 8773 8779 8785 8791 8797 8803 8809 8815 8821 8827 8833 8839 8845 8851 8857 8863 8869 8875 8881 8887 8893 8899 8905 8911 8917 8923 8929 8935 8941 8947 8953 8959 8965 8971 8977 8983 8989 8995 9001 9007 9013 9019 9025 9031 9037 9043 9049 9055 9061 9067 9073 9079 9085 9091 9097 9103 9109 9115 9121 9127 9133 9139 9145 9151 9157 9163 9169 9175 9181 9187 9193 9199 9205 9211 9217 9223 9229 9235 9241 9247 9253 9259 9265 9271 9277 9283 9289 9295 9301 9307 9313 9319 9325 9331 9337 9343 9349 9355 9361 9367 9373 9379 9385 9391 9397 9403 9409 9415 9421 9427 9433 9439 9445 9451 9457 9463 9469 9475 9481 9487 9493 9499 9505 9511 9517 9523 9529 9535 9541 9547 9553 9559 9565 9571 9577 9583 9589 9595 9601 9607 9613 9619 9625 9631 9637 9643 9649 9655 9661 9667 9673 9679 9685 9691 9697 9703 9709 9715 9721 9727 9733 9739 9745 9751 9757 9763 9769 9775 9781 9787 9793 9799 9805 9811 9817 9823 9829 9835 9841 9847 9853 9859 9865 9871 9877 9883 9889 9895 9901 9907 9913 9919 9925 9931 9937 9943 9949 9955 9961 9967 9973 9979 9985 9991 9997 10003 10009 10015 10021 10027 10033 10039 10045 10051 10057 10063 10069 10075 10081 10087 10093 10099 10105 10111 10117 10123 10129 10135 10141 10147 10153 10159 10165 10171 10177 10183 10189 10195 10201 10207 10213 10219 10225 10231 10237 10243 10249 10255 10261 10267 10273 10279 10285 10291 10297 10303 10309 10315 10321 10327 10333 10339 10345 10351 10357 10363 10369 10375 10381 10387 10393 10399 10405 10411 10417 10423 10429 10435 10441 10447 10453 10459 10465 10471 10477 10483 10489 10495 10501 10507 10513 10519 10525 10531 10537 10543 10549 10555 10561 10567 10573 10579 10585 10591 10597 10603 10609 10615 10621 10627 10633 10639 10645 10651 10657 10663 10669 10675 10681 10687 10693 10699 10705 10711 10717 10723 10729 10735 10741 10747 10753 10759 10765 10771 10777 10783 10789 10795 10801 10807 10813 10819 10825 10831 10837 10843 10849 10855 10861 10867 10873 10879 10885 10891 10897 10903 10909 10915 10921 10927 10933 10939 10945 10951 10957 10963 10969 10975 10981 10987 10993 10999 11005 11011 11017 11023 11029 11035 11041 11047 11053 11059 11065 11071 11077 11083 11089 11095 11101 11107 11113 11119 11125 11131 11137 11143 11149 11155 11161 11167 11173 11179 11185 11191 11197 11203 11209 11215 11221 11227 11233 11239 11245 11251 11257 11263 11269 11275 11281 11287 11293 11299 11305 11311 11317 11323 11329 11335 11341 11347 11353 11359 11365 11371 11377 11383 11389 11395 11401 11407 11413 11419 11425 11431 11437 11443 11449 11455 11461 11467 11473 11479 11485 11491 11497 11503 11509 11515 11521 11527 11533 11539 11545 11551 11557 11563 11569 11575 11581 11587 11593 11599 11605 11611 11617 11623 11629 11635 11641 11647 11653 11659 11665 11671 11677 11683 11689 11695 11701 11707 11713 11719 11725 11731 11737 11743 11749 11755 11761 11767 11773 11779 11785 11791 11797 11803 11809 11815 11821 11827 11833 11839 11845 11851 11857 11863 11869 11875 11881 11887 11893 11899 11905 11911 11917 11923 11929 11935 11941 11947 11953 11959 11965 11971 11977 11983 11989 11995 12001 12007 12013 12019 12025 12031 12037 12043 12049 12055 12061 12067 12073 12079 12085 12091 12097 12103 12109 12115 12121 12127 12133 12139 12145 12151 12157 12163 12169 12175 12181 12187 12193 12199 12205 12211 12217 12223 12229 12235 12241 12247 12253 12259 12265 12271 12277 12283 12289 12295 12301 12307 12313 12319 12325 12331 12337 12343 12349 12355 12361 12367 12373 12379 12385 12391 12397 12403 12409 12415 12421 12427 12433 12439 12445 12451 12457 12463 12469 12475 12481 12487 12493 12499 12505 12511 12517 12523 12529 12535 12541 12547 12553 12559 12565 12571 12577 12583 12589 12595 12601 12607 12613 12619 12625 12631 12637 12643 12649 12655 12661 12667 12673 12679 12685 12691 12697 12703 12709 12715 12721 12727 12733 12739 12745 12751 12757 12763 12769 12775 12781 12787 12793 12799 12805 12811 12817 12823 12829 12835 12841 12847 12853 12859 12865 12871 12877 12883 12889 12895 12901 12907 12913 12919 12925 12931 12937 12943 12949 12955 12961 12967 12973 12979 12985 12991 12997 13003 13009 13015 13021 13027 13033 13039 13045 13051 13057 13063 13069 13075 13081 13087 13093 13099 13105 13111 13117 13123 13129 13135 13141 13147 13153 13159 13165 13171 13177 13183 13189 13195 13201 13207 13213 13219 13225 13231 13237 13243 13249 13255 13261 13267 13273 13279 13285 13291 13297 13303 13309 13315 13321 13327 13333 13339 13345 13351 13357 13363 13369 13375 13381 13387 13393 13399 13405 13411 13417 13423 13429 13435 13441 13447 13453 13459 13465 13471 13477 13483 13489 13495 13501 13507 13513 13519 13525 13531 13537 13543 13549 13555 13561 13567 13573 13579 13585 13591 13597 13603 13609 13615 13621 13627 13633 13639 13645 13651 13657 13663 13669 13675 13681 13687 13693 13699 13705 13711 13717 13723 13729 13735 13741 13747 13753 13759 13765 13771 13777 13783 13789 13795 13801 13807 13813 13819 13825 13831 13837 13843 13849 13855 13861 13867 13873 13879 13885 13891 13897 13903 13909 13915 13921 13927 13933 13939 13945 13951 13957 13963 13969 13975 13981 13987 13993 13999 14005 14011 14017 14023 14029 14035 14041 14047 14053 14059 14065 14071 14077 14083 14089 14095 14101 14107 14113 14119 14125 14131 14137 14143 14149 14155 14161

REFERENCIAS.

- [1] Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson W. S.; "Purification strategies for microbial lipases". *Journal of Microbiological Methods*; **2003**; 52; 1- 18.
- [2] Jaeger, K-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra B. W., Schimossek, K., Zonta, A., Reetz M. T.; "Bacterial lipases for biotechnological applications"; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1997**; 3; 3-12.
- [3] Zúñiga-Rodríguez, V. H.; "Inmovilización de lipasas de *Bacillus pumilus* GMA1"; Tesis UNAM, **2004**; 1.
- [4] Lai, D. T., MacKenzie, A. D., O'Connor, C. J., Turner, K. W.; "Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglyceride mediated by pregastric lipase from goats and kids"; *Journal of Dairy Science*, **1997**; 80; 2249-2257.
- [5] Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., and Wilkinson, M. G.; "Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge"; *International Dairy Journal*, **2003**; 13; 841–866.
- [6] Nthangeni, M. B., Patterton, H., Tonder, A., Vergeer, W. P., Litthauer, D.; "Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on a *Bacillus* lipases"; *Enzyme and Microbial Technology*, **2001**; 28; 705-712.
- [7] Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P.; "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties"; *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2004**; 64; 763-781.

-
- [8] Wong de la Mora, P.; "Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades"; Tesis UNAM, **2001**; 4-8.
- [9] Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A.; "Industrial applications of microbial lipases"; *Enzyme and Microbial Technology*, **2006**; 39; 235–251.
- [10] Holmquist, M.; "Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms"; *Current Protein and Peptide Science*, **2000**; 1; 209-235.
- [11] Arpigny, J. L., Jaeger, K-E.; "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties"; *Biochemical Journal*, **1999**; 343; 177-183.
- [12] Jaeger, K-E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T.; "BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases"; *Annual Review of Microbiology*, **1999**; 53; 315–5.
- [13] Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger K. E., Puls, M., Eggert, T.; "The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**; 39; 166–170.
- [14] Neves Petersen, M. T., Fojan, P., Petersen, S. B.; "How do lipases and esterases work the electrostatic contribution"; *Journal of Biotechnology*, **2001**; 85; 115-147.
- [15] Bornscheuer, U. T.; "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis"; *FEMS Microbiology Reviews*, **2002**; 26; 73-81.
- [16] Gil, F., Catalaó, M. J., Moniz-Pereira, J., Leandro, P., McNeil, M., Pimentel, M.; "The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity"; *Microbiology*, **2008**; 154; 1364–1371.

-
- [17] Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O.; "Bacterial lipases"; *FEMS Microbiology Reviews*, **1994**; 15; 29-63.
- [18] Uhlig, H. (editor); "Industrial enzymes and their applications"; John Wiley & Sons, Inc, **1998**; cap 3.3.2.
- [19] van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W.; "The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme"; *Journal of Molecular Biology*, **2001**; 309; 215-26.
- [20] Eggert, T., van Pouderoyen, G., Dijkstra, B. W., Jaeger, K. E.; "Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gen expression, biochemical properties, and three-dimensional structure"; *FEBS Letters*, **2001**; 502; 89-92.
- [21] Eggert, T., van Pouderoyen, G., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B. W., Jaeger, K. E.; "Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracelular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*"; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2002**; 26; 37-46.
- [22] Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F. M., Chen, S. T.; "Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization"; *Protein Expression and Purification*, **2001**; 22; 388-398.
- [23] Westers, H., Braun, P. G., Westers, L., Antelmann, H., Hecker, M., Jongbloed, J. D. H., Yoshikawa, H., Tanaka, T., van Dijl, J. M., Quax, W. J.; "Genes Involved in SkfA Killing Factor Production Protect a *Bacillus subtilis* Lipase against Proteolysis"; *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**; 1899-1908.

-
- [24] Kim, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B., Oh, T. K.; “Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26”; *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**; 1583; 205-212.
- [25] Rúa, M. L., Atomi, H., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D.; “High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus* in *Escherichia coli*”; *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1998**; 49; 405-410.
- [26] Wong, N. P., Jenness, R., Keeney, M., Marth, E. H.; “Fundamentals of dairy chemistry”; 3ª Edición, Aspen publishers, Inc. USA, **1999**.
- [27] Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. I. H.; “Fundamental of cheese science”; Aspen publishers, Inc. USA; **2000**.
- [28] Abeijón, M. C., Medina, R. B., Katz, M. B., González, S. N.: “Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe’s milk and cheese with importance for flavour development”; *Canadian Journal of Microbiology*, **2006**; 52; 237–245.
- [29] Marilley, L., Casey, M.G.; “Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains”; *International Journal of Food Microbiology*, **2004**; 90; 139– 159.
- [30] Regado, M. A., Cristóvão, B. M., Moutinho, C. G., Balcão, V. M., Aires-Barros, R., Ferreira, J. P. M., Malcata, F. X.; “Original article Flavour development via lipolysis of milk fats: changes in free fatty acid pool”; *International Journal of Food Science and Technology*, **2007**; 42; 961–968.
- [31] Lindsay, D., Brözelb, V. S., Mosterta, J. F., von Holya A.; “Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range”: *International Journal of Food Microbiology*, **2000**; 54; 49 –62.

- [32] Kalogridou-Vassiliadou, D.; "Biochemical Activities of *Bacillus* Species Isolated from Flat Sour Evaporated Milk"; Journal of Dairy Science, **1992**; 75;2681-2686.
- [33] García-Saturnino, V., Tesis: "Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica en queso Cotija". Tesis UNAM, **2006**.
- [34] NCBI, Nacional Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov
- [35] Bustos J., I.; "Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo"; Tesis UNAM, **1995**; 2,6,13-19
- [36] Bustos-Jaimes, I; "Análisis del gen que codifica para la lipase de *Bacillus pumilus* GMA1"; Tesis UNAM, **1998**.
- [37] Mora-Lugo, R.; "Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1"; Tesis UNAM, **2008**.
- [38] Muyzer; "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems"; Current Opinion in Microbiology, **1999**; vol. 2; 317-322.
- [39] Ercolini, D.; "PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food"; Journal of Microbiological Methods, **2003**; 56; 297-314.
- [40] Multiple Sequence Aligment. <http://align.genome.jp>
- [41] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.; "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0"; Molecular Biology and Evolution, **2007**; 24; 1596-1599.

-
- [42] Laemmli, U. K.; "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **1970**; 227;680-685.
- [43] ExPASy (Expert Protein Analysis System) Protein Server. Swiss Institute of Bioinformatics. <http://www.expasy.ch>
- [44] Willeman, W.F., Hanefeld, U., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J.; " Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase"; *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**; 27; 423–433.
- [45] Straathof, A. J. J.; "Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting"; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**; 11; 991–998.
- [46] O'Connor, C. J., Barton, R. H., Butler, P. A. G., MacKenzie, A. D., Manuel, R. D., Lai, D. T.; "Ruminant pregastric lipases: experimental evidence of their potential as industrial catalysts in food technology "; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **1996**; 7; 189-205.
- [47] Needs, E. C., Ford, G. D., Owen, A. J., Tuckley, B., Anderson, M.; "A method for the quantitative determination of individual free fatty acids in milk by ion exchange resin adsorption and gas-liquid chromatography"; *Journal of Dairy Research*, **1983**; 50; 321-329.
- [48] Johnson, B. T., Shaw, L. N., Nelson, D. C., Mayo, J. A.; "Extracellular proteolytic activities expressed by *Bacillus pumilus* isolated from endodontic and periodontal lesions"; *Journal of Medical Microbiology*, **2008**; 57; 643–651.

- [49] Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., Depiereux, E.; "ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures"; Bioinformatics; **2002** Sep; 18 (9); 1250-1256. <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>
- [50] Chothia, C., Lesk, A. M.; "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins"; European Molecular Biology Organization Journal, **1986**; 5; 823–826.
- [51] Aloy, P., Ceulemans, H., Stark, A., Russell, R. B.; "The relationship between sequence and interaction divergence in proteins"; Journal of Molecular Biology, **2003**. 332, 989–998.
- [52] van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., Berendsen, H.J.C.; "GROMACS: Fast, Flexible, and Free"; Journal of Computational Chemistry, **2005**; 26; 1701-1718.
- [53] van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Tieleman, D. P., Sijbers, A. L. T. M., Feenstra, K. A., van Drunen R., Berendsen, H. J. C.; "Gromacs User Manual version 3.3"; **2005**; www.gromacs.org