



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

Purificación y caracterización de una enzima de tipo
esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp.

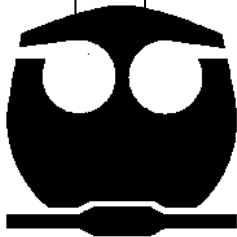
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

José Leonardo Sánchez Tafolla



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Lilia María Ernestina Vierna García**

VOCAL: **Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero**

SECRETARIO: **Profesor: Herminia de Jesús Loza Tavera**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Norma Trejo Medina**

2° SUPLENTE: **Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105. Conjunto E. Departamento de Bioquímica Facultad de Química. UNAM.

Asesor del tema:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

Supervisor técnico

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez

Sustentante:

José Leonardo Sánchez Tafolla

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abierto las puertas desde muy pequeño al aceptarme en Iniciación Universitaria. Este trabajo es producto de las enseñanzas que he adquirido en sus aulas, en sus laboratorios.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por haberme invitado a colaborar en este proyecto, por ayudarme a desarrollar el pensamiento científico y poder aplicarlo para la realización de este trabajo. Gracias por el apoyo, la paciencia, enseñanzas y amistad.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, por brindarme las facilidades para desarrollar este trabajo experimental.

Al apoyo brindado por el CONACYT para el proyecto “Caracterización de las enzimas y los genes responsables de la actividad biodegradativa de *Alicyclophilus* sp. sobre poliuretano” (Proyecto No.82881)

Al apoyo brindado por la Facultad de Química en el Programa de Apoyo Para la Investigación y el Posgrado. (6290-04)

A la Secretaría de Educación Pública por la beca otorgada (Becanet Superior-Titulación)

A la Dra. Rosario Muñoz Clares, al M.C. Carlos Mújica Jiménez y al Dr. Guillermo Mendoza Hernández por apoyo y colaboración en este proyecto.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por su apoyo, sus enseñanzas, su gran paciencia y su amistad.

A mis compañeros del laboratorio 105, que de alguna u otra forma participaron y aportaron algo para este proyecto e hicieron que el tiempo que estuve en el laboratorio fuera muy agradable.

DEDICATORIA

A Catarina Tafolla Rangel y José Guadalupe Sánchez Barrales, por ser los mejores padres y amigos que pude haber tenido. Gracias por todo el apoyo incondicional que me han dado siempre, todas las enseñanzas y consejos, toda la confianza que me han dado, todos los esfuerzos que han hecho por mi, por todo el tiempo que me han dedicado, y sobre todo, su amor que nunca me ha faltado. Han sido y seguirán siendo mi ejemplo a seguir en la vida. No existen palabras para decirles cuanto los quiero.

A mis hermanos, Ana Carolina y Berardo Manuel. A Caro por ponernos el ejemplo y por cuidarnos. Al buen Manolo por todo el tiempo y las experiencias que hemos pasado juntos desde que somos pequeños. Se que no es fácil aguantarme, así que les agradezco su paciencia y sus consejos. Los quiero.

A ma petite chérie Marari.

A mis "broders": Arturo (Borre), Dario Magno, Eric Manuel Betanzo (Beta-Prox), Ernesto Turcott (Turco), Guillermo González (Memín) Jonathan Jair Tenorio (JJ Tenoch), José Luis (Greñas), Ulises Hernández (Play). A mis amigas del pasillo/prepa: Bere, Consuelo, Marifer, Jou, Toña. Hemos crecido juntos, así que ustedes mejor que nadie saben cuánto y por qué los quiero.

A mis "bros" de la Facultad: Benjy, Diego, Erick, Lalo, Paris; a la banda QFB: Jenny, Nancy, Sandra, Mabel, Mon, Héctor y Winnie por todas esas mañanas, tardes y noches en las que estudiamos juntos. Gracias por todo.

A toda mi familia (abuelitos, tíos, primos) ya que aunque no lo crean en algún momento me han apoyado directa o indirectamente.

A todas las personas que me han brindado su amistad.

*"Oh, I get by with a little help from my friends,
Mmm I get high with a little help from my friends,
Oh, I'm gonna try with a little help from my friends"*

Índice

Abreviaturas

Contenido

1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1. Poliuretano (PU)	3
2.2 Biodegradación de poliuretano. Posibles mecanismos involucrados.	4
2.3 Purificación de proteínas	8
2.3.1 Disrupción celular	9
2.3.2 Técnicas cromatográficas	11
2.4 Aislamiento e identificación de <i>Alicyclophilus</i> sp.	14
3. Hipótesis	16
4. Objetivo	17
5. Estrategia experimental	18
6. Materiales y métodos	20
I. Cultivo y cosecha de células	20
II. Ultrasonicación	21
III. Purificación de la enzima de tipo esterasa asociada a membrana de <i>Alicyclophilus</i> sp.	22
IV. Cuantificación de proteínas	24
V. Zimograma	25
VI. Estabilización de la actividad esterasa del extracto membranal	26
VII. Cuantificación espectrofotométrica de la actividad esterasa empleando p-nitrofenil acetato (p-NPA)	27
VIII. Determinación de la capacidad de la esterasa de membrana de <i>Alicyclophilus</i> sp. BQ1 de utilizar sustratos de diferente longitud de cadena	29
IX. Identificación y determinación del tamaño de la proteína con actividad	30

esterasa.	
X. Obtención del extremo N-terminal de la proteína asociada a membrana con actividad esterasa purificada a partir de <i>Alicycliphilus</i> sp.	31
XI. Identificación de la proteína con actividad esterasa purificada de la membrana plasmática de <i>Alicycliphilus</i> sp BQ1.	32
7. Resultados y discusión	33
7.1 <i>Alicycliphilus</i> sp. BQ1 cultivado en un medio mínimo con PU sólo presenta una actividad esterasa.	33
7.2 Estabilización del extracto membranal.	35
7.3 La actividad enzimática del extracto membranal fue capaz de hidrolizar ésteres de longitud de cadena intermedia.	38
7.4 Purificación de la proteína con actividad esterasa asociada a membrana de <i>Alicycliphilus</i> sp. cultivada en MM-PUh.	40
7.5 Determinación de la masa molecular de la proteína con actividad esterasa.	43
7.6 Obtención del extremo N-terminal de la proteína asociada a membrana con actividad esterasa purificada a partir de <i>Alicycliphilus</i> sp.	46
7.7 Identificación de la proteína con actividad esterasa purificada de membrana de <i>Alicycliphilus</i> sp. BQ1 cultivada en MM-PUh.	47
8. Conclusiones	52
9. Anexo	53
10. Literatura citada	61

ABREVIATURAS

DO	densidad óptica
g	gramo
h	hora
kb	kilo pares de bases
L	litro
LB	Luria Bertani
M	molar
mL	mililitro
MM-PUh	medio mínimo Hydroform®
min	minutos
MUF	metilumbeliferona
ON	overnight
p-NPO ⁻	p-nitrofenóxido
p-NPA	p-nitrofenil acetato
p-NPB	p-nitrofenil butirato
p-NPC	p-nitrofenil caproato
p-NPL	p-nitrofenil laurato
p-NPP	p-nitrofenil palmitato
PS-PU	poliéster-poliuretano
PU	poliuretano
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
UV	ultravioleta
vol	volumen

RESUMEN

El poliuretano (PU) es un polímero sintético ampliamente utilizado en diversas industrias, lo cual ha traído como consecuencia un incremento considerable en la cantidad de desechos de este polímero. Debido a las características estructurales del polímero su eliminación por métodos fisicoquímicos no es totalmente eficiente y es costosa.

En nuestro laboratorio se trabaja con dos cepas de *Alicyclophilus* sp.: BQ1 y BQ8, las cuales pueden crecer en Medio Mínimo-PU, siendo un poliéster-poliuretano la única fuente de carbono. Estudios previos han revelado que la actividad enzimática responsable de la degradación del PU podría estar asociada a la membrana celular.

Utilizando zimogramas para actividad esterasa se identificó que dicha actividad enzimática está asociada a la membrana celular de la bacteria y no al citoplasma. Adicionalmente, se trató de establecer condiciones de almacenamiento bajo las cuales se preservara la actividad enzimática por tiempos prolongados. Los extractos membranales se sometieron a congelamiento, sin embargo los resultados obtenidos al adicionar agentes crioprotectores a las muestras no fueron favorables.

Al realizar pruebas de actividad del extracto membranal ante diferentes sustratos, se encontró que presenta cierta especificidad ante sustratos que tienen cadena de carbonos de longitud media (p-NPB, (C₄), p-NPC (C₈) y p-NPL (C₁₀)), seguidos por los sustratos que tienen cadena de carbono corta (p-NPA (C₂)). En el caso del p-NPP (C₁₆) no se detectó actividad enzimática, razón por la cual la enzima responsable de la actividad no podría ser "lipasa verdadera".

Se extrajeron proteínas asociadas a membrana de la bacteria empleando el detergente Zwittergent 3-12. A partir de los extractos protéicos membranales obtenidos, se estableció un protocolo de purificación de enzimas asociadas a membrana de *Alicyclophilus* sp BQ1, el cual consistió en tres columnas cromatográficas: una de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose CL-4B), una resina catiónica (Q-Fastflow) y una de intercambio aniónico (Mono Q 10-10).

Se logró identificar, mediante ensayos con p-Nitrofenilacetato, zimogramas para actividad esterasa y cromatografía de exclusión molecular, una enzima que presentaba dicha actividad enzimática, la cual tiene una masa molecular de 31 kDa. Al someter a la proteína purificada a una técnica conocida como cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), y posteriormente relacionar los fragmentos peptídicos obtenidos con bases de datos, se encontró que éstos fragmentos péptidicos presentaban identidad con péptidos que codifican una porina de membrana de *Acidovorax ebreus* TPSY y otra de *Comamonas testosteroni* KF-1.

Se trató de obtener el extremo N-terminal de la proteína purificada lo cual no fue posible ya que éste se encuentra bloqueado (acetilado, glicosilado o carboxilado)

Al realizar alineamientos con secuencias de otros microorganismos, se identificó un dominio catalítico que permitiría incluirla en la familia de lipasas GDSL, en el cual también se encuentran proteínas autotransportadoras y porinas de membrana externa las cuales tienen actividad esterasa/lipasa. En otro alineamiento de secuencias de porinas de diferentes microorganismos filogenéticamente cercanos a *Alicyclophilus* sp BQ1 también se identificó la firma de aminoácidos GDSL, además de una triada catalítica de esterasa.

2. ANTECEDENTES

2.1 El poliuretano (PU)

Sintetizado por el Dr. Otto Bayer en 1937, el poliuretano (PU) es un polímero que se obtiene a partir de la condensación de un poliisocianato y un poliol, los cuales están unidos por enlaces intramoleculares de tipo uretano (Sauders, 1964) (Figura 1). El poliol utilizado para la obtención del PU puede ser de tipo poliéter o poliéster, generándose ya sea, poliéster poliuretanos (PS-PU) o poliéter poliuretanos (PE-PU).

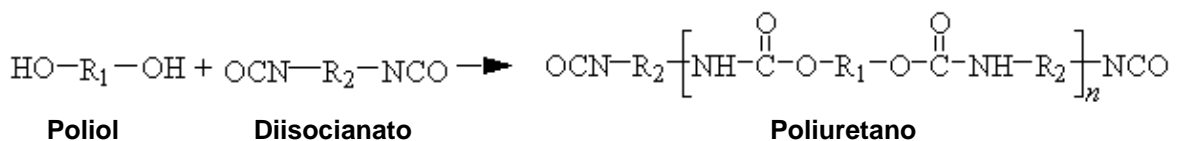


Figura 1. Reacción de síntesis de poliuretano

El PU puede presentar diferentes características físicas: puede ser rígido (paneles para aislamiento térmico, piezas automotrices), flexible (espumas, elastómeros) o líquido (pinturas, barnices, recubrimientos). Dichas características van a depender del proceso de síntesis y de las materias primas que se empleen para su obtención. Además, su resistencia a la degradación por agua, aceites y solventes lo han convertido en el material de preferencia en infinidad de procesos industriales.

Como resultado del gran uso de los plásticos se ha generado una problemática relacionada con los desechos de este material. Por ejemplo, estadísticas publicadas en el año 2003 por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica indican que en ese año se produjeron aproximadamente 236 millones de toneladas de desechos sólidos, de los cuales, 11.3% eran plásticos, que en su mayoría se enviaron a tiraderos (US EPA, 2005).

Con la finalidad de disminuir la cantidad de polímeros sintéticos que se introducen al ambiente y para mantener la capacidad operacional de los depósitos

de basura es que en los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de polímeros fácilmente biodegradables y de técnicas de biodegradación para los desechos plásticos ya existentes.

2.2 Biodegradación de poliuretano. Posibles mecanismos involucrados.

La biodegradación del PU depende de varios factores: características del polímero (cristalinidad, peso molecular, grupos funcionales, movilidad), tratamientos a los que haya sido sometido el polímero y aditivos agregados, entre otros (Artham *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2000). De manera general, en la biodegradación de materiales poliméricos sintéticos es necesario reducir el tamaño y complejidad del polímero, ya que la mayoría de ellos son demasiado grandes para pasar a través de las membranas celulares. Una vez que el microorganismo que lleva a cabo el proceso de biodegradación logra realizar el proceso de despolimerización, los monómeros pueden entrar a la célula y son biodegradados (Swift, 1997). Conceptualmente, para que el proceso de biodegradación de polímeros se lleve a cabo es necesaria la participación de dos tipos de actividades: depolimerasas extracelulares y depolimerasas intracelulares (Doi, 1990; Gu *et al.*, 2000b). Con base en la estructura general del PS-PU, las actividades enzimáticas que podrían actuar sobre los diferentes enlaces de este polímero serían de tipo proteasa, ureasa y esterasa/lipasa (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999) (Figura 2).

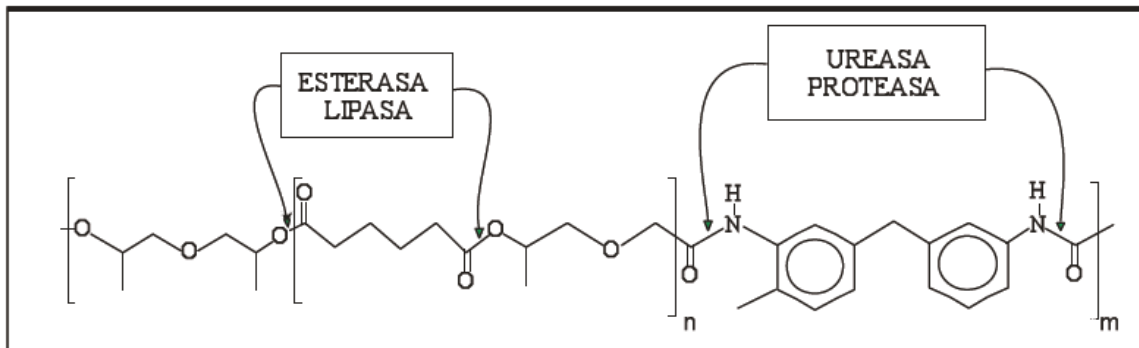


Figura 2. Posibles sitios de acción de diferentes enzimas capaces de atacar la estructura del poliuretano. (Oceguera, comunicación personal).

Desde hace varios años han aparecido informes en los cuales se mencionan que el PS-PU es susceptible a la degradación ocasionada por bacterias (tabla 1), hecho que convierte a dicho polímero en un posible sustrato para el crecimiento de estos microorganismos.

Tabla 1. Bacterias capaces de degradar poliéster-poliuretano (PS-PU) y actividades relacionadas con esta capacidad.

Microorganismo	Actividad enzimática identificada	Referencia
<i>Corynebacterium</i> sp	Esterasa	Kay <i>et al.</i> , 1991, 1993
<i>Comamonas acidovorans</i> TB 35	Esterasa (asociada a membrana)	Akutz <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Esterasa, proteasa	Howard <i>et al.</i> , 1999, 2000, 2001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Esterasa, proteasa	Ruiz <i>et al.</i> , 1999
<i>Comamonas acidovorans</i> TB 35	Esterasa (secretada al medio)	Akutz <i>et al.</i> , 1999; Allen <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Esterasa y lipasa	Rowe <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Esterasa y proteasa	Teeraphatpornchai <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Uretanasa	Akutz <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus pumilus</i>	Lipasa	Nair <i>et al.</i> , 2007
<i>Arthrobacter</i> sp. AF11 y <i>Corynebacterium</i> sp. AF12	Esterasa	Shah <i>et al.</i> , 2007

Kay y colaboradores (1991) aislaron y estudiaron 16 diferentes bacterias que tenían la capacidad de degradar PU, entre ellas se encontraban bacterias de los géneros *Corynebacterium* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*.

En 1997, Nakajima-Kambe y colaboradores identificaron dos esterasas de *Comamonas acidovorans* cepa TB35 capaces de atacar PS-PUR: una asociada a la célula (PUR) y otra secretada al medio (CBS). Para ambas esterasas se realizó una caracterización bioquímica y física las cuales permitieron identificar que la esterasa PUR degrada directamente al PU y adipato de dietilenglicol, mientras que la esterasa CBS sólo puede degradar adipato de polietilenglicol, que es una materia prima para la síntesis del PU, lo cual indica que estas enzimas son estructuralmente diferentes. Además, la hidrofobicidad de la esterasa CBS era menor que la esterasa PUR (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997).

En otro estudio se observó que *Comamonas acidovorans* TB 35 puede utilizar al PU como única fuente de carbono y nitrógeno. Con ayuda de “poliuretanasas” (PUasas) de tipo esterasa, la bacteria se puede adherir a la superficie del PU y utilizarlo como sustrato, ya que las esterasas hidrolizan los enlaces presentes en la cadena de PU, obteniendo dietilenglicol y ácido adípico (Akutsu *et al.*, 1998).

En el grupo de Howard también se han enfocado en el estudio de tres especies de *Pseudomonas* capaces de degradar PS-PU. Han logrado identificar (Howard *et al.*, 1999), purificar (Ruiz *et al.*, 1999) y caracterizar (Stern *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2001) diferentes tipos de enzimas poliuretanolíticas que en su mayoría han resultado ser esterasas.

Teeraphatpornchai y colaboradores (2002) aislaron varios microorganismos de muestras de suelo capaces de degradar diversos plásticos de tipo poliéster, identificando una cepa de *Paenibacillus amylolyticus*, con capacidad para degradar estos compuestos; detectando también en el cultivo actividades enzimáticas tanto de proteasas como de esterasas, las cuales se relacionaron con la degradación de los plásticos.

Otro reporte de bacterias poliuretanolíticas corresponde a cinco cepas que fueron aisladas después de enterrar películas de PS-PU por seis meses. Estas

bacterias fueron identificadas como *Bacillus* sp. AF8, *Pseudomonas* sp. AF9, *Micrococcus* sp. AF10, *Arthrobacter* sp. AF11 y *Corynebacterium* sp. AF12. Utilizando la espectroscopía de infrarrojo (FTIR) se confirmó que uno de los mecanismos de degradación del poliuretano consiste en la hidrólisis del enlace éster, ya que el pico correspondiente a enlaces C-H disminuía y se observó la formación de enlaces C=C (Shah *et al.*, 2007).

Debido a que en el PS-PU la proporción de enlaces de tipo éster es considerablemente mayor con respecto al enlace carbamato (uretano), se ha nombrado a la fracción poliéster “la fracción suave”. Dado que el enlace éster es el sustrato específico de las esterasas, es más frecuente encontrar microorganismos productores de esterasas con capacidad degradadora de PU que microorganismos que producen proteasas y/o ureasas. Asimismo se ha propuesto que las esterasas responsables de la degradación del PU presentan un dominio de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, el cual permite que la enzima entre en contacto con el PU y logre unirse a él. Este dominio hidrofóbico se encuentra junto al sitio activo de la enzima permitiendo la interacción del sustrato con el sitio activo, lo cual desencadena el proceso de degradación del material (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

La actividad hidrolítica de las esterasas se atribuye principalmente a una tríada catalítica formada por los aminoácidos serina (Ser), histidina (His) y ácido aspártico (Asp). En la secuencia de aminoácidos de las α/β -hidrolasas, estos aminoácidos están ordenados de la forma Ser-Asp-His. El residuo de serina normalmente aparece en el pentapéptido conservado Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly. Debido a las características catalíticas de estas enzimas son de gran interés para diferentes aplicaciones ambientales e industriales (Jaeger *et al.*, 1999).

2.3 Purificación de proteínas

Los primeros reportes de purificación de proteínas se publicaron hace más de 200 años, cuando en 1789 Fourcroy realizó ensayos para aislar sustancias a partir de plantas que tuvieran propiedades semejantes a la albúmina de huevo. Un siglo

después, en 1889, Hofmeister fue la primera persona en cristalizar una proteína obtenida por un proceso de purificación previo, la ovoalbúmina (Coligan *et al.*, 1999).

Las décadas de 1960 y 1970 pueden describirse como “los años dorados” de las investigaciones relacionadas con proteínas y enzimas, ya que fue el periodo en el que se establecieron los principios de la mayoría de las técnicas de purificación utilizados en la actualidad, las cuales se han vuelto más eficientes en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos instrumentos y equipos de laboratorio a tal grado que en la actualidad es posible trabajar con microgramos e incluso nanogramos de muestra (Coligan *et al.*, 1999).

En primera instancia, la purificación de una proteína a partir de una célula o tejido que en promedio contiene de 10,000 a 20,000 proteínas diferentes pareciera ser una labor casi imposible. Sin embargo, en la práctica se requieren, en promedio, cuatro pasos de fraccionamiento de las muestras para obtener una proteína purificada (Wilson y Walker, 2005).

El grado de pureza necesario en una proteína va a depender del uso que se le quiera dar. Teóricamente, una proteína es pura cuando la muestra contiene una sola especie, aunque en la práctica es casi imposible obtener el 100% de pureza. Afortunadamente, en la actualidad, la mayoría de análisis a proteínas pueden realizarse con muestras que contengan de un 5-10% de contaminación con otras proteínas. Esto es un punto importante, ya que en cada paso de un proceso de purificación ocurren pérdidas de la proteína que se desea purificar. Por ejemplo, con un paso de purificación adicional se puede incrementar la pureza de una proteína de un 90% a un 98% pero esto ocasionaría una mayor pérdida de la proteína de interés, la cual probablemente sería insuficiente para ensayos posteriores (Wilson y Walker, 2005).

2.3.1 Disrupción celular

El paso inicial en un proceso de purificación debe de ser la disrupción de la muestra a partir de la cual se obtendrá la enzima de interés, la cual dependerá del tipo de

célula con la que se trabaje y se debe realizar con una solución amortiguadora adecuada de acuerdo al tipo de enzima con la que se trabajará (Cutler, 2004).

En el caso de las bacterias, éstas se pueden clasificar en Gram positivas y Gram negativas dependiendo si se tiñen con el colorante de Gram (cristal violeta y yodo). En las bacterias Gram positivas la membrana plasmática está rodeada por una capa gruesa de peptidoglicano (20-50 nm), la cual se tiñe con el colorante anteriormente mencionado, mientras que en las bacterias Gram negativas la membrana plasmática está rodeada por una capa muy delgada de peptidoglicano (2-3 nm) razón por la cual no adquiere coloración. Sin embargo, las bacterias Gram negativas tienen una segunda membrana llamada membrana externa, la cual está compuesta por lipopolisacáridos.

En el caso de proteínas asociadas a membranas se requieren pasos adicionales a la disrupción para lograr su extracción. Para las proteínas de membrana extrínsecas (sólo están unidas a la superficie de la célula por fuerzas electrostáticas y/o puentes de hidrógeno) es recomendable realizar la extracción aumentando la fuerza iónica de la solución amortiguadora o realizando cambios en el pH de la misma. Para las proteínas de membrana intrínsecas (están integradas a ambas caras de la membrana) se debe de utilizar una solución amortiguadora polar que contenga algún detergente iónico (SDS, CTAB, CHAPS) y/o un detergente no iónico (Tritón X-100, Nonidet P-40, Zwittergent) (Cutler, 2004).

Después de la disrupción celular se obtiene el extracto crudo, el cual, en teoría, contiene gran cantidad de la o las proteínas de interés. Generalmente en el extracto crudo que se obtiene habrá residuos insolubles o fragmentos celulares, los cuales pueden ser removidos por filtración y/o al centrifugar a baja velocidad (~5,000 x g) (Coligan *et al.*, 1999).

Además, es recomendable que al extracto crudo se le realicen algunos tratamientos de solubilidad y estabilidad (temperatura, pH) los cuales pueden ser de utilidad para realizar un primer fraccionamiento de acuerdo a propiedades fisicoquímicas de las proteínas. De esta forma se realizará una mejor purificación de la proteína de interés al someter la muestra a métodos cromatográficos

convencionales de mayor resolución como lo son la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad o la filtración en gel.

2.3.2 Técnicas cromatográficas

El uso de las columnas cromatográficas de alta resolución es muy recurrente en los protocolos de purificación de proteínas, ya que se logran obtener buenos fraccionamientos de la muestras si se trabaja bajo las condiciones adecuadas para la o las proteínas de interés.

El fraccionamiento de las proteínas al utilizar columnas cromatográficas se fundamenta en las diferentes características fisicoquímicas de las proteínas y en las propiedades de la columna que se emplee para dicho fraccionamiento (Tabla 2) (Wilson y Walker, 2005).

Tabla 2. Técnicas cromatográficas de mayor empleo para la purificación de proteínas (adaptada de Wilson y Walker, 2005).

Técnica	Propiedad explotada	Capacidad	Resolución	Comentarios
Interacción hidrofóbica	Hidrofobicidad	Alta	Media	Se utiliza en etapas iniciales de purificaciones. Se emplea para muestras con alta concentración de sales (p.ej: sulfato de amonio)
Intercambio iónico	Carga	Alta	Media	Se utilizan en etapas iniciales de purificaciones. La muestra no debe tener fuerza iónica alta.
Afinidad	Interacciones biológicas	Alta	Alta	Se utilizan al final de una purificación. La capacidad de la columna dependerá de la cantidad de ligando utilizado. La proteína puede desnaturalizarse al ser eluída
Cromatoenfoque	Carga y punto isoeléctrico	Alta-media	Alta-media	Para muestras con baja fuerza iónica que contengan moléculas anfóteras.
Covalente	Grupos tiol	Media-baja	Alta	Específica para proteínas que contienen grupo tiol. Su limitante es el costo y el tiempo de regeneración de la columna (3 h)
Quelación con metales	Grupos imidazol, tiol y triptófano	Media-baja	Alta	Generalmente muy costosas
Exclusión molecular	Masa molecular	Media	Baja	Se utilizan como último paso en un protocolo de purificación. Proporciona información sobre la masa molecular de la proteína.

De la gran cantidad de propiedades que se pueden explotar en las proteínas para su fraccionamiento, destacan cuatro:

- Carga: las proteínas difieren una de otra en la proporción de aminoácidos con carga que contienen y por consecuencia también difieren en la carga neta a algún pH en particular. Las proteínas con la misma carga que la resina eluirán, mientras que las proteínas con diferente carga se unirán y podrán ser eluidas al lavar la columna con solución amortiguadora con diferente concentración de sales o diferente pH.
- Afinidad: algunas proteínas suelen unirse fuertemente a ciertas moléculas conocidas como ligando, las cuales generalmente son pequeñas. Esta característica permite que el ligando se acople a alguna resina cromatográfica. Al hacer pasar un extracto crudo por la columna, el ligando retendrá a la proteína de interés mientras que las otras proteínas eluirán de la columna. Posteriormente, la proteína unida al ligando puede ser eluída al modificar el pH.
- Hidrofobicidad: las proteínas difieren en la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que contienen en su superficie, característica que es de utilidad para separar proteínas por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).
- Tamaño: la diferencia de tamaño entre las proteínas puede ser explotada en las cromatografías de exclusión molecular (también conocida como filtración en gel). La separación se logra debido a que la resina forma poros de diferentes tamaños por los cuales pasa la muestra. De acuerdo al tamaño de la proteína será el tiempo de retención que presente.

Como ya se mencionó, el utilizar las columnas cromatográficas adecuadas en un proceso de purificación permitirá obtener a la proteína de interés realizando no más de cuatro pasos.

2.4 Aislamiento e identificación de *Alicyclophilus sp*

En investigaciones previas, en nuestro laboratorio se aisló un grupo de cepas bacterianas provenientes de muestras de residuos de sillones en descomposición y de suelo de varias partes del basurero Bordo de Xochiaca, ubicado en el municipio de Cd. Nezahualcóyotl, Estado de México (Carrillo, 2004). Estas cepas fueron aisladas mediante el cultivo en un medio mineral cuya única fuente de carbono era el barniz comercial Hydroform®. Este es un barniz de PU base agua comercializado por PolyForm de México que es utilizado para el recubrimiento de superficies.

A partir de los cultivos en medio mineral con Hydroform® (MM-PU) se obtuvieron tres cepas cuyo crecimiento fue el más abundante BQ1, BQ8 y BQ5 (Oceguera, 2005). En este trabajo fue posible observar en los medios de cultivos selectivos que la bacteria presenta actividad esterasa, pero no proteasa o ureasa. Posteriormente, fue posible identificar mediante secuenciación del gene del rRNA que las cepas BQ1 y BQ8 (Oceguera *et al.*, 2007) y posteriormente BQ5 (Solís González, 2008) pertenecían al género *Alicyclophilus sp*. La cepa BQ5 tiene la capacidad de crecer en agregados desde el inicio de su cultivo, característica que la diferencia de las otras cepas, las cuales crecen sin formar agregados durante las primeras 16 h del cultivo.

Alicyclophilus sp. BQ1 (Número de identificación taxonómica: 449664, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) es una β -proteobacteria Gram negativa de la familia Comamonadaceae, dentro de la cual también se encuentran los géneros *Acidovorax* y *Comamonas*. Con el sistema de identificación API® 20 NE, *Alicyclophilus sp*. BQ1 presentó reacciones positivas en las pruebas de arginina hidrolasa (ADH), asimilación de ácido adípico (ADI) y ácido málico (MLT), así como citocromo oxidasa (OX).

Trabajos previos en nuestro laboratorio identificaron la presencia de actividades esterasa en el sobrenadante de los medios de cultivo con PU, inoculados con las tres cepas de *Alicyclophilus sp*. (Oceguera, 2005; Solís, 2008), lo cual indica la existencia de al menos una esterasa extracelular producida por este microorganismo cuando es cultivado en un medio mínimo con PU. Sin embargo, los trabajos con *Comamonas*

acidovorans TB35, en los cuales se reporta una actividad esterasa asociada a la membrana, la cual es responsable de la utilización del PU, nos condujeron a proponer el presente trabajo en el cual se buscó, purificó, identificó y caracterizó una actividad esterasa en la membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1, cultivada en un medio con PU como única fuente de carbono.

3. HIPÓTESIS

Con base en estudios realizados en nuestro laboratorio en los cuales se demostró que *Alicycliphilus* sp. BQ1 es capaz de crecer en medio mínimo Hydroform® (MM-PUh) y producir ataques hidrolíticos a los enlaces éster del poliuretano y en evidencias de que enzimas tipo esterasa asociadas a membrana de bacterias filogenéticamente cercanas a *Alicycliphilus* sp., son las responsables del corte hidrolítico del poliuretano, se propone que también debe existir al menos una actividad esterasa asociada a membrana de *Alicycliphilus* sp. BQ1, que podría ser responsable del ataque al poliuretano.

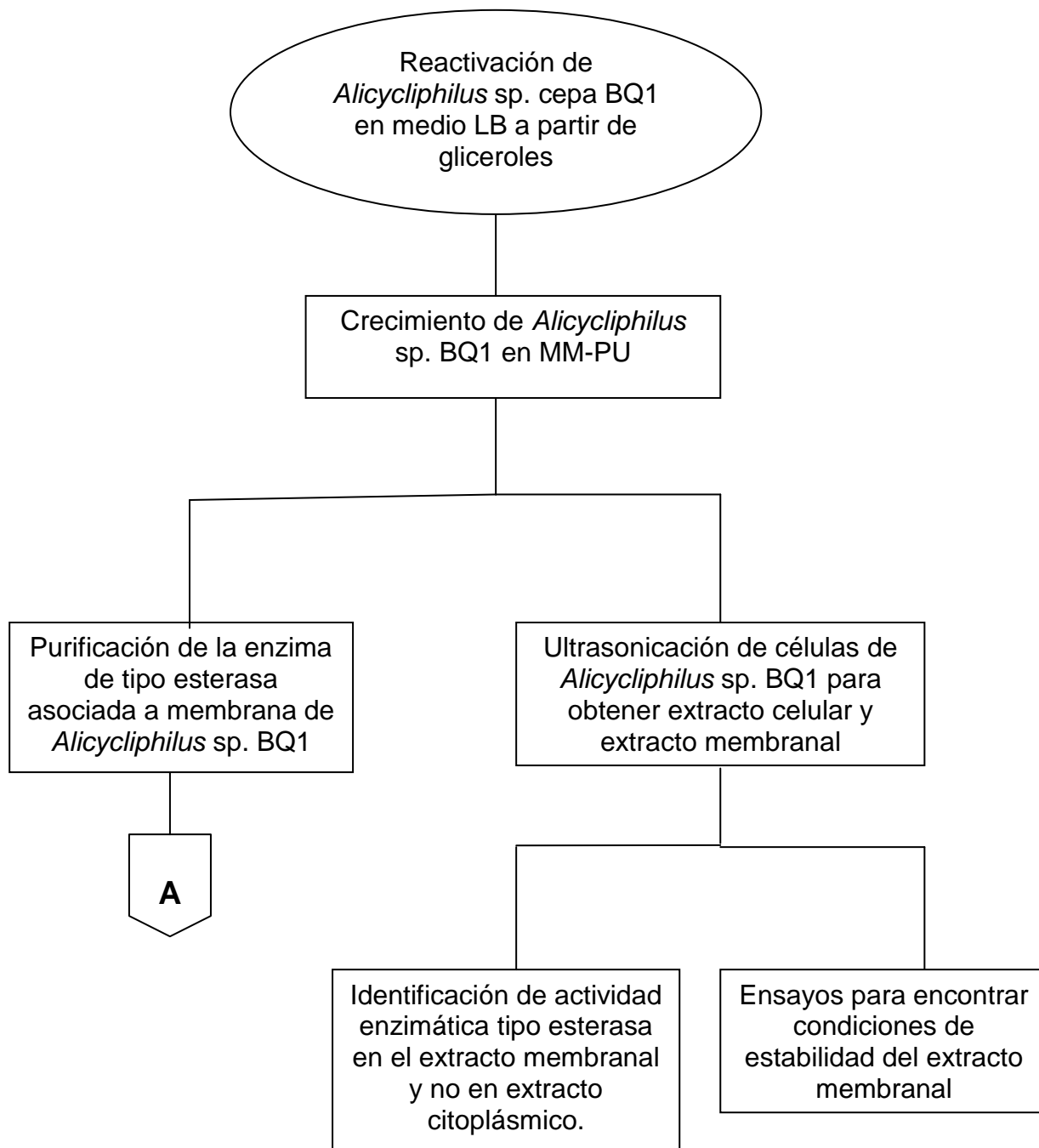
4. OBJETIVO GENERAL

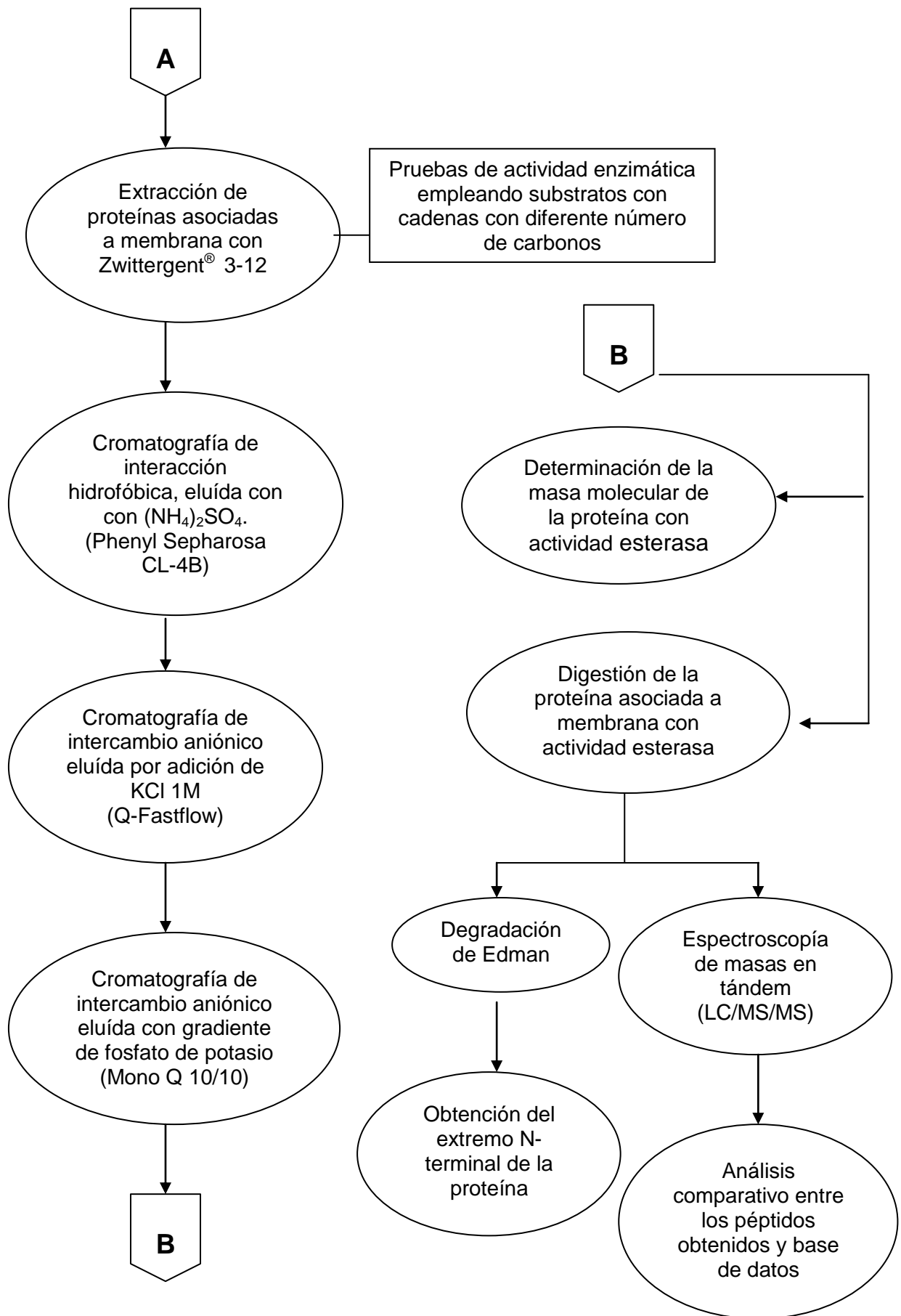
Purificar la(s) enzima(s) de tipo esterasa asociada(s) a membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 cultivada en un medio mínimo con poliuretano, con el propósito de identificarla(s) y realizar su caracterización bioquímica.

Objetivos particulares

1. Determinar si existe(n) actividad(es) esterasa(s) en preparaciones de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1.
2. Establecer condiciones bajo las cuales sea posible mantener por más tiempo la actividad enzimática tipo esterasa en preparaciones membranales.
3. Purificar la(s) proteínas con actividad esterasa de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1
4. Determinar la masa molecular de la(s) enzima(s) con actividad esterasa presentes en membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1.
5. Obtener la secuencia amino terminal de la(s) enzima(s) que presente(n) actividad esterasa.
6. Conocer la secuencia de aminoácidos más probable de la(s) enzima(s) que presente(n) actividad esterasa purificadas de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1.
7. Determinar la capacidad de la(s) enzima(s) tipo esterasa asociada(s) a membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 para utilizar sustratos de diferente longitud de cadena.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





6. MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivo y cosecha de células

1. Descongelar un tubo eppendorf almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ el cual contiene células de *Alicyclophilus* sp cepa BQ1 preservadas con glicerol al 30% y con ayuda de un asa bacteriológica estéril se realiza una siembra por estría cruzada en una caja de medio Luria-Bertani (LB) sólido y se deja en incubación por 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtienen colonias color blancas-crema, de bordes definidos, convexas, brillantes.
2. De una colonia de *Alicyclophilus* sp. en LB sólido inocular 5 mL de LB líquido y dejar en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm, 12 horas (overnight, ON)
3. Medir la densidad óptica a 660 nm (DO_{660}) e inocular 50 mL de medio LB fresco con lo equivalente a una $\text{DO}_{660} = 0.1$ y dejar en incubación hasta alcanzar una $\text{DO}_{660} = 0.8$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm (aprox. 6 h) (pre-cultivo).
4. Inocular 4 L de Medio Mínimo-Poliuretano con 0.3% de Hydroform (poliuretano comercial al 30% soluble en agua) (MM-PUh) con la cantidad de pre-cultivo necesario para obtener una $\text{DO}_{660} = 0.02$. Dejar en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 rpm, 16 h.
5. La biomasa de *Alicyclophilus* sp se separa por centrifugación empleando un rotor GSA (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 7,500 rpm ($\sim 9,000 \times g$), durante 15 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en botellas estériles previamente pesadas.
6. Las células obtenidas se lavan dos veces con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7.0 y centrifugándose a las condiciones descritas anteriormente.
7. Preparar, con la biomasa obtenida, una suspensión celular al 25% (w/v) con solución amortiguadora de fosfato de potasio, 0.1 M, pH 7.0. Por 4 L de cultivo se obtienen aproximadamente 9 gramos con los cuales se producen 36 mL de suspensión celular.

II. Ultrasonificación (modificación de Kermasha *et al.*, 2000).

1. Dividir la suspensión celular en muestras de 20 mL. Colocarlas en vasos de precipitados de vidrio de 50 mL previamente enfriados.
2. Someter las muestras a ultrasonificación, sobre hielo, dando 6 repeticiones de los siguientes parámetros: 15 segundos de interrupción, con una amplitud del 25% (Vibra-Cell), seguidos de 15 segundos de descanso.
3. Centrifugar las células lisadas en tubos previamente pesados y estériles empleando un rotor SS-34 (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 8,700 rpm ($\sim 9,000 \times g$), durante 20 min, a 4 °C.
4. Retirar el sobrenadante (SN), pasarlo a un tubo limpio y conservarlo a 4 °C. Esta fracción corresponde al extracto citoplásmico (EC).
5. Lavar los residuos membranales con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7.0 en el volumen suficiente para resuspenderlos (aproximadamente 25 mL) y centrifugar en un rotor SS-34 (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 8,700 rpm ($\sim 9,000 \times g$), durante 15 min, a 4 °C. Repetir este paso dos veces.
6. Someter los residuos membranales a un tratamiento de extracción de la enzima asociada a membrana por acción de un detergente. Para ello, agregar 2 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, con 0.22% de Zwittergent[®] 3-12 (Calbiochem) por cada gramo de residuos membranales y dejar en agitación en vórtex con nivel de agitación 5-6 (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) por 1 h, a 4 °C.
7. Transcurrido el tiempo de agitación se obtiene una suspensión de consistencia viscosa, la cual se filtra utilizando gasa previamente humedecida con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM sin Zwittergent[®] 3-12 (Calbiochem). De esta forma se obtiene el extracto membranal (EM).

III. Purificación de la enzima de tipo esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp.

Con la finalidad de identificar y caracterizar la(s) enzima(s) responsable(s) de la actividad tipo esterasa se procedió a someter los extractos membranales de *Alicyclophilus* sp. a un proceso de purificación. Para ello se siguió el protocolo que a continuación se describe y que fue desarrollado por A. Ocegüera, 2008 (comunicación personal) y que se basó en el descrito por Akutsu (1999) para purificar la esterasa de membrana de *Comamonas acidovorans* TB35.

1. Se establece un cultivo de *Alicyclophilus* sp BQ1 en MM-PUh de acuerdo al protocolo descrito en el punto 1.1. Cumplidas las 16 h de incubación de 4 L de MM-PUh con 0.3% de Hydroform a 37 °C y 200 rpm se procede a centrifugar utilizando el rotor GSA (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 7,500 rpm (~9,000 x g), durante 15 min, a 4 °C, para obtener dos fases: el sobrenadante y la pastilla celular. A partir de este punto se comienza a trabajar a 4 °C para tratar de preservar en óptimas condiciones a la proteína de interés.
2. Realizar el tratamiento de las células con Zwittergent[®] 3-12, descrito en los puntos II.6 y II.7.
3. Una vez filtrada, la suspensión se centrifuga empleando el rotor GSA (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 7,500 rpm (~9,000 x g), durante 15 min, a 4 °C.
4. Desechar el pellet formado y conservar el sobrenadante (SN), el cual se somete a diálisis con membranas con corte de 6 kDa (SpectraPor, Spectrum Laboratories Inc.) realizando recambios de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, durante las dos primeras horas (aproximadamente 1 L/h) y posteriormente, se realiza un último recambio de solución amortiguadora, dejando dializar por 12 h más con la finalidad de retirar el detergente. De esta forma es como se obtiene el extracto membranal (EM). Se obtienen aproximadamente 30 mL de EM por 4 L de cultivo.
5. El EM se separa por cromatografía de interacción hidrofóbica, eluída por gravedad con gradiente inverso en un sólo paso, con (NH₄)₂SO₄. Para esta cromatografía el extracto membranal se lleva al 12.5% de saturación con

- (NH₄)₂SO₄ (0.07 g/mL) y se hace pasar por una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro por 2.5 cm de alto en la cual están empacados 10 mL de resina Phenyl Sepharosa CL-4B (Sigma-Aldrich, No. cat. P7892). La Phenyl Sepharosa había sido previamente lavada con 100 mL de agua desionizada y posteriormente equilibrada con una solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, al 12.5% de saturación de (NH₄)₂SO₄ (solución de equilibrio). Al hacer pasar el EM por la columna se genera la fracción proteica unida a la columna. La fracción de lavado se obtiene al hacer pasar 100 mL de la solución de equilibrio por la columna. La fracción unida se eluye de la resina con 50 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM sin (NH₄)₂SO₄ (solución de elusión I).
6. Se continúa la purificación utilizando la fracción no unida a la columna de Phenyl Sepharosa CL-4B, ya que en ella se detectó la actividad esterasa. Dicha fracción se somete a una cromatografía de intercambio aniónico eluída por adición de KCl 1M. Para ello, la fracción no unida a la columna de Phenyl Sepharosa se hace pasar por una columna de 2.5 cm de diámetro por 2.5 cm de alto en la cual están empacados 10 mL de resina catiónica Q-Fastflow. Esta columna previamente se había preparado, lavando la resina con 100 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, con KCl 1 M (solución de elusión II), luego con 100 mL de agua desionizada y finalmente fue equilibrada con una solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 7 (solución de equilibrio II). Después de cargar la fracción protéica no unida a la columna de Phenyl Sepharosa CL-4B en esta columna, se adicionaron 100 mL de solución de equilibrio II, de la cual se obtuvo la fracción de lavado y posteriormente, la fracción unida se eluyó de la resina por gravedad con 50 mL de la solución de elusión II.
 7. La fracción unida se desala por ultrafiltración con Centricon con membranas de corte de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore), utilizando como diluyente cuatro volúmenes de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM. pH 7, para retirar el KCl presente. Además con este paso también es posible concentrar la muestra para obtener un volumen final entre 1-2 mL. Para la ultrafiltración se

utiliza el rotor de ángulo fijo SSA (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 4,500 rpm (~2,500 x g), a 4 °C.

8. El siguiente paso de la purificación consiste en hacer pasar la fracción unida a la columna Q-Fastflow por una cromatografía de intercambio aniónico eluída con gradiente de fosfato de potasio. Para esta cromatografía se emplea una columna pre-empacada Mono Q 10/10, equilibrada con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7. Se desecha la fracción no unida obtenida al lavar la columna con un amortiguador de fosfato 20 mM pH 7.0 y la fracción unida se eluye a 0.5 mL•min⁻¹ con un gradiente de fosfatos de 20 a 500 mM. Esta cromatografía fue corrida en un equipo de cromatografía de alta presión (HPLC) (Controlador 600S, Detector 996, Bomba 626, Waters Corporation). Para este paso del protocolo recibimos el apoyo de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares y el M.C. Carlos Mújica (Lab-102, Depto. Bioquímica, Fac. Química, UNAM).

IV. Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976)

Para determinar la concentración de proteína presente en las muestras obtenidas se utilizó el método de microensayos de Bradford (Bio-Rad), ya que con éste se utiliza menos reactivo y se requieren cantidades menores de muestra.

1. Preparar una solución 1 mg/mL de BSA (Gibco) para realizar la curva estándar.
2. En tubos eppendorff pequeños se prepara una curva estándar de acuerdo a la siguiente tabla:

BSA (µL)	Proteína (µg)	H ₂ O desionizada (µL)
1	1	799
3	3	797
7	7	793
10	10	790
12	12	788

El blanco se prepara con 800 µL de H₂O desionizada.

3. Preparar las muestras a las que se les cuantificará la cantidad de proteína de acuerdo a la siguiente tabla:

No. muestra	μL de muestra	H_2O desionizada (μL)
1	1	799
2	3	797
3	7	793
4	10	790

4. Ya que se preparan los estándares y las muestras, agregar 200 μL de reactivo de Bradford a cada tubo.
5. Leer en el espectrofotómetro a 595 nm empleando cubetas de plástico de 1 mL.
6. Con los valores obtenidos graficar Absorbancia contra Cantidad de Proteína (utilizar valores que se encuentren en condiciones de linealidad) para obtener la ecuación de la recta ($y = mx + b$), donde y =Absorbancia, x =concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de la muestra.

V. Zimograma

Para determinar si el EM y el EC presentaban actividad enzimática de tipo esterasa se utiliza la técnica de zimograma, la cual nos permite observar la aparición de un producto fluorescente al observarse con luz ultravioleta (UV) (Díaz *et al.*, 1999). Dicho producto se origina por la hidrólisis de un enlace, la cual es catalizada por la enzima de interés, en este caso la esterasa.

1. Someter alícuotas con la misma cantidad de proteína del EM y del EC a un gel desnaturante de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) (Ver receta en el apéndice). No olvidar cargar un control positivo, el cual en este caso fue una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (40 U/ μg , 3 mg/mL) (Sigma, No. Cat. 95608)
2. Lavar el gel con Tritón X-100 (Sigma, No. Cat. 9002-93-1) al 2.5% (se debe preparar al momento de utilizarlo), por 45 min con agitación, con el objeto de eliminar el SDS del gel.
3. Enjuagar por un min. con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7.

4. Preparar una solución stock de butirato de metilumbeliferona (BioChemica No. cat. 19362) 50 mM utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, No. cat. 200-664-3) como disolvente (Ver anexos).
5. Agregar sobre el gel aproximadamente 15 mL de una solución de butirato de metilumbeliferona 1.6 mM, la cual se prepara a partir de la solución stock 50 mM, que se diluye con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7. Incubar 1 min a temperatura ambiente, con agitación suave y en oscuridad.
6. Exponer a un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 312 nm (Foto UV 21, Fotodyne). Las proteínas con actividad esterasa se observarán como bandas de color blanco intenso, sobre un fondo oscuro.

VI. Estabilización de la actividad esterasa del extracto membranal

Con el objetivo de lograr que la actividad esterasa presente en el extracto membranal fuera estable durante más tiempo, se realizaron una serie de pruebas empleando crioprotectores diversos (Kermasha *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005).

1. Establecer cultivos de *Alicyclophilus* sp. BQ1, cosechar las células por centrifugación y realizar la ultrasonificación descrita en el punto II.
2. Preparar los crioprotectores: acetato de sodio 1M y NaCl 1M. Los crioprotectores se deben preparar con solución amortiguadora de fosfato 20 mM, ya que en esta solución se encuentra el extracto membranal. El otro crioprotector utilizado es el glicerol.
3. Con el extracto membranal obtenido se preparan las muestras con los crioprotectores (1:1): poner 250 μ L del extracto membranal en un tubo eppendorf el cual contiene 250 μ L del crioprotector. De esta forma la concentración del crioprotector es 0.5 M. En el caso del glicerol se ponen 350 μ L de extracto mebranal y 150 μ L de glicerol, para obtener una concentración final del 30% de crioprotector. No olvidar la preparación de los controles con 500 μ L de extracto membranal sin crioprotectores.
4. Una vez mezclados los componentes, los tubos eppendorf que contienen las muestras con los agentes crioprotectores fueron introducirlos en N₂ líquido junto

con los controles, cuidando que todos los tubos se congelen y posteriormente se almacenan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tener la precaución de no congelar un tubo control y un tubo de cada muestra con los diferentes crioprotectores, los cuales servirán para hacer los ensayos al tiempo cero.

5. Realizar el ensayo de zimograma para actividad enzimática tipo esterasa descrito en el punto V. Para ello, en los análisis que no corresponden al tiempo 0, se deben descongelar un control y un tubo de cada muestra con los diferentes crioprotectores a los tiempos de interés establecidos. En los experimentos realizados se observó el efecto crioprotector a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

VII. Cuantificación espectrofotométrica de la actividad esterasa empleando p-nitrofenil acetato (p-NPA)

Con la finalidad de monitorear la conservación de la actividad enzimática de tipo esterasa a lo largo del proceso de purificación se toman alícuotas de diferentes puntos del proceso:

1. Alícuota del extracto crudo.
2. Alícuota de la fracción no unida de la cromatografía de interacción hidrofóbica eluída con gradiente inverso en un solo paso, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
3. Alícuota de la fracción unida de la cromatografía de intercambio aniónico eluída por adición de KCl 1M.
4. Alícuota de la cromatografía de intercambio aniónico eluída con gradiente de fosfato de potasio.

Estas alícuotas se utilizan para realizar ensayos de actividad enzimática, los cuales se fundamentan en la hidrólisis del p-nitrofenilacetato (p-NPA). Cuando el p-NPA se hidroliza genera los productos p-nitrofenol (p-NP), p-nitrofenóxido (p-NPO^-) y ácido acético. El p-NPO^- puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm. La aparición de p-NPO^- permite observar la hidrólisis del sustrato (p-NPA) ocasionada por la actividad enzimática de tipo esterasa que se encuentra en cada alícuota obtenida (Alastair *et al.*, 1977) (Figura 3).

Debido a que el p-NPA se hidroliza en presencia de agua, se debe de disolver en acetoniilo (CH_3CN), para obtener una concentración 20 mM (del p-NPA)

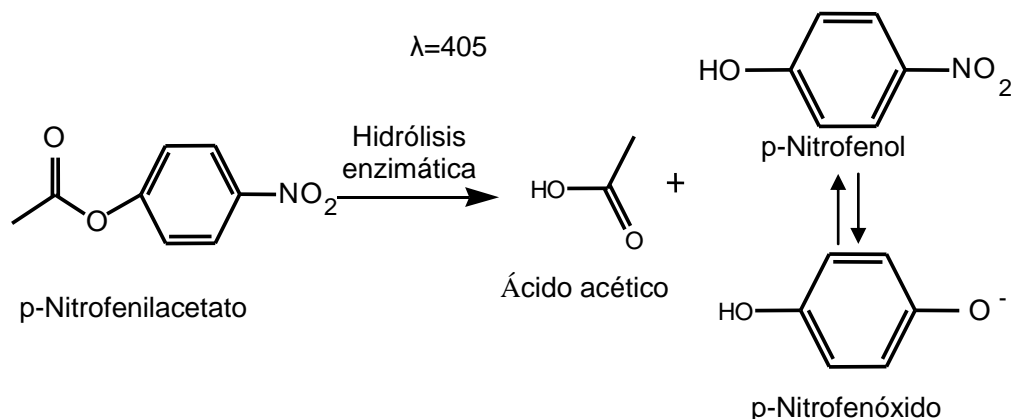


Figura 3. Reacción de hidrólisis del p-NPA. Reacción en la que se basa el método espectrofotométrico para medir la actividad enzimática tipo esterasa. La reacción se mide a 405 nm para cuantificar la aparición del ion p-nitrofenóxido.

Las reacciones de hidrólisis se hacen en forma individual para cada alícuota.

1. Se toman 100 µl de cada alícuota con la actividad enzimática y se colocan en una celda de plástico la cual contiene 650 µl de solución amortiguadora de fosfato de potasio 200 mM, pH 7 y 250 µl de p-NPA, 20 mM, disuelto en acetonitrilo.
2. La celda se coloca en un baño de agua a 37 °C y se añaden 250 µl de solución de p-NPA 20 mM, disuelto en acetonitrilo.
3. Comenzar a medir el tiempo de la reacción, registrando los valores de absorbancia a los 30, 90 y 180 segundos de reacción, a una longitud de onda de 405 nm.

Debido a que el p-NPA sufre hidrólisis química se realiza un blanco de reacción. Para ello, en una celda de plástico se ponen 750 µl de solución amortiguadora de fosfato 200 mM, pH 7 y 250 µl de p-NPA 20 mM disuelto en acetonitrilo y se miden valores de absorbancia a los 30, 90 y 180 segundos de reacción. Estos valores se restan a los valores obtenidos en los distintos tiempos, de los ensayos que contenían proteína. Como blanco (línea base) en el equipo espectrofotométrico se utiliza una celda de plástico que contiene 250 µl de acetonitrilo (sin p-NPA) y 750 µl de solución amortiguadora de fosfatos 20 mM.

VIII. Determinación de la capacidad de la esterasa de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 de utilizar sustratos de diferente longitud de cadena

Con miras a determinar si la esterasa de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 era una esterasa o una lipasa, y utilizando como fundamento la reacción descrita en el punto VII y en la figura 3, se realizaron ensayos de actividad esterasa utilizando sustratos con características estructurales semejantes, los cuales son derivados del p-nitrofenol (p-NP), presentan el enlace éster hidrolizable por actividad enzimática del extracto membranal y difieren únicamente en el número de carbonos que forman la cadena lineal de la molécula.

Las moléculas utilizadas fueron: p-nitrofenil acetato (p-NPA) (C₂), p-nitrofenil butirato (p-NPB) (C₄), p-nitrofenil caproato (p-NPC) (C₆), p-nitrofenil laurato (p-NPL) (C₁₀) y p-nitrofenil palmitato (p-NPP) (C₁₆).

1. Preparar la solución A (solución amortiguadora de fosfato 200 mM pH 7 con tensoactivos) y la solución B (derivados de p-NP al 0.3% en isopropanol) (Ver Anexos).
2. Realizar una extracción de proteínas asociadas a membrana utilizando solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 con Zwittergent 3-12 al 0.22% (solución de extracción) para obtener el EM (Ver puntos III.1 a III.4).
3. Realizar la reacción de hidrólisis en celdas de plástico agregando los reactivos en el siguiente orden:

• Buffer de reacción (sol. A).....	630 µL
• Derivados de p-NP al 0.3% (sol. B) (gota a gota)	70 µL
• Sol. amortiguadora de fosfato 200 mM.....	50 µL
• Extracto membranal.....	<u>50 µL</u>
• Total.....	800 µL

NOTA: en el caso del p-NPP la concentración fue del 0.15% para evitar turbidez en el medio de reacción.

4. Mezclar los reactivos por inversión de la celda a temperatura ambiente. La reacción de hidrólisis es estable aproximadamente una hora.
5. Transcurridos 30 minutos, medir absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

Debido a que los derivados de p-NP sufren hidrólisis química se realiza un blanco de reacción para cada sustrato. Para ello, en una celda de plástico se ponen 730 μ l de solución amortiguadora de fosfato 200 mM pH 7 con tensoactivos y 70 μ l de los derivados de p-NP al 0.3 % (m/v) disueltos en isopropanol y se miden valores de absorbancia a los 30 minutos de reacción. Estos valores se restan a los valores obtenidos en los distintos tiempos, de los ensayos que contenían extracto membranal. Como blanco (línea base) en el equipo espectrofotométrico se utiliza una celda de plástico que contiene 70 μ l de isopropanol (sin derivados de p-NP) y 730 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 20 mM con tensoactivos.

IX. Identificación y determinación del tamaño de la proteína con actividad esterasa.

Para poder conocer la masa molecular aproximada de la proteína que presentaba actividad esterasa, se decidió realizar una cromatografía en gel de exclusión molecular utilizando la resina Superdex 200 (General Electric) acoplada a un equipo de cromatografía de líquidos.

1. Realizar una extracción de proteínas asociadas a membrana utilizando solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 con Zwittergent 3-12 al 0.22% (solución de extracción) para obtener el EM (Ver puntos III.1 a III.4).
2. Por ultrafiltración en Centricon con membranas de corte de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore), concentrar la muestra hasta un volumen de 200 μ L. Se puede utilizar el rotor SSA (centrífuga RC5C Plus, Sorvall) a 4,500 rpm ($\sim 2,500 \times g$), a 4 °C.
3. Inyectar la muestra al equipo de cromatografía de líquidos (Controlador 600S, Detector 996, Bomba 626, Waters Corporation) estableciendo las siguientes condiciones:
 - Columna Superdex 200 (General Electric)
 - Velocidad de Flujo: 0.5 mL/min
 - Tamaño de Fracción: 0.5 mL /min = 1 fracción/min

Para este paso del protocolo recibimos el apoyo de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares y el M.C. Carlos Mújica (Lab-102, Depto. Bioquímica, Fac. Química, UNAM).

NOTA: para cada carga de muestra es necesario hacer una calibración del equipo con marcadores de peso molecular a las condiciones a las que se corre la muestra. Es decir, si la muestra está en solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM pH 7, es necesario que el marcador de peso molecular que se utilice para calibrar el equipo se haya disuelto en la misma solución amortiguadora que la muestra.

X. Obtención del extremo N-terminal de la proteína asociada a membrana con actividad esterasa purificada a partir de *Alicyclophilus* sp.

Con la proteína de interés purificada se corrió un gel de poliacrilamida al 12%, el cual se transfirió a una membrana de **fluoruro** de **polivinilideno** (PVDF) (Immobilon-P, Millipore) y posteriormente se tiñó la membrana con azul de Coomassie. La membrana teñida se envió con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández para someter a la muestra a un proceso de digestión para que posteriormente, mediante el método de degradación de Edman, obtener el extremo N-terminal de la proteína.

Durante la degradación de Edman, el residuo amino-terminal de una proteína se etiqueta y se separa del péptido sin afectar a los enlaces peptídicos entre los otros residuos. Esto se logra al hacer reaccionar fenilisotiocianato (PITC-reactivo de Edman) con la α -amina de la cadena polipeptídica bajo condiciones básicas para formar un péptido feniltiocarbamilado (PTC). Posteriormente, bajo condiciones ácidas ocurre un corte peptídico que genera un aducto aminoácido-anilino-tiazolinona (AZT), la cual al ser inestable a esas condiciones se convierte en una feniltiohidantoina (PTH), las cuales pueden ser analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) al comparar los tiempos de retención con estándares de aminoácidos de tipo PTH (Figura 4) (<http://www.genosphere-biotech.com/Edman-Degradation.html>)

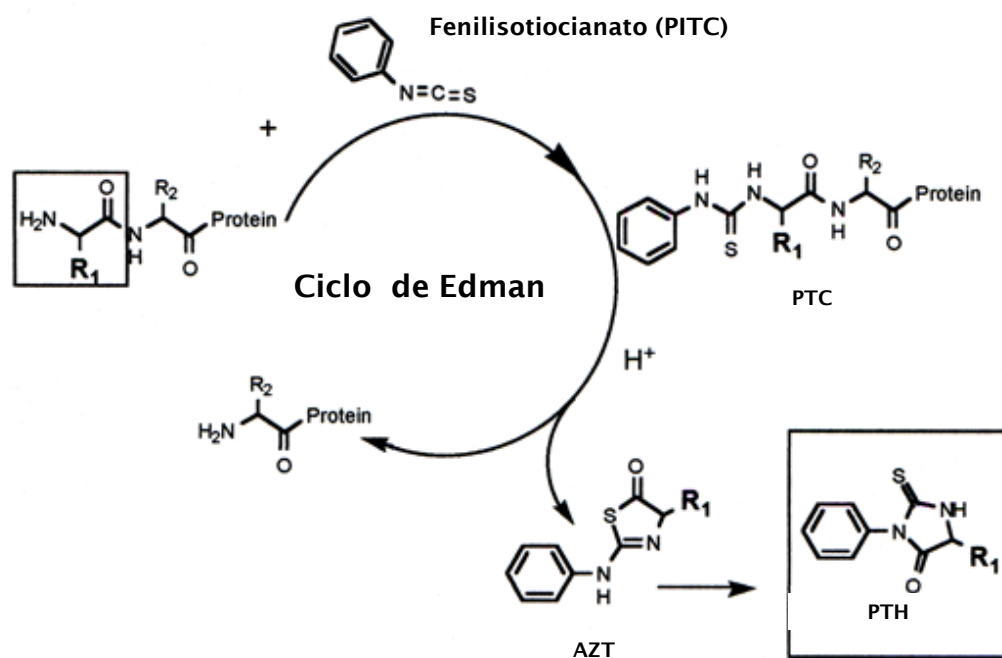


Figura 4. Ciclo de Edman. La formación de fragmentos peptídicos con un anillo cíclico de cinco miembros permite relacionar los tiempos de retención de dichos fragmentos peptídicos con estándares comerciales para posteriormente identificarlos.

XI. Identificación de la proteína con actividad esterasa purificada de la membrana plasmática de *Alicyclophilus* sp BQ1.

Una vez obtenidas e identificadas las fracciones del proceso de purificación que presentaron actividad esterasa utilizando el ensayo de p-NPA y zimograma, se corrió la muestra con la proteína de interés en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Leamlli, 1970) al 12% y se tiñó con azul de Coomassie. Una vez desteñado el gel, se envió al laboratorio de Dr. Guillermo Mendoza Hernández (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM) para la digestión de la proteína. Para la identificación de los péptidos obtenidos de la digestión se utilizó el método de espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) (ABI 3200 Q TRAP® LC/MS/MS System, IET Ltd.) y los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Mascot (Matrix Science Ltd.) (<http://www.matrixscience.com>).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 *Alicycliphilus* sp. BQ1 cultivado en un medio mínimo con PU sólo presenta una actividad esterasa.

Con base en la estructura del PS-PU, se ha propuesto que las actividades enzimáticas que podrían actuar sobre sus diferentes enlaces serían actividades de tipo proteasa, ureasa y esterasa (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). En un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró que *Alicycliphilus* sp BQ1 era capaz de crecer en un medio mínimo cuya única fuente de carbono era el Hydroform (MM-PUh), un barniz de poliuretano, y que este polímero era hidrolizado en sus enlaces éster al ser utilizado para el crecimiento de *Alicycliphilus* sp. (Oceguera *et al.*, 2007). También se detectó una actividad esterasa en el SN del medio de cultivo (Oceguera, 2005). Akutsu y colaboradores (1998) encontraron que *Comamonas acidovorans* TB35 posee dos enzimas tipo esterasa capaces de atacar PS-PU: una extracelular que se localizó en el sobrenadante del medio de cultivo y otra unida a la membrana plasmática de la bacteria. En ese trabajo también se determinó que la pérdida de peso de cubos de PU incubados con la enzima de membrana, extraída con detergente, era diez veces mayor que la obtenida con la enzima extracelular. Ambas enzimas ya han sido purificadas y se ha determinado que atacan la porción éster del PU. Sin embargo, la esterasa unida a la membrana es capaz de atacar los enlaces éster dentro de la molécula de PU, mientras que la esterasa extracelular ataca las porciones éster de la materia prima en la molécula de poli-adipato de polietilenglicol y su ataque es menor cuando ya se ha polimerizado (Akutsu *et al.*, 1998).

Dado lo anterior, en este trabajo nos dimos a la tarea, primero, de determinar si existía una actividad esterasa asociada a membrana en *Alicycliphilus* sp BQ1 cultivado en MM-PUh. Así, se realizó el fraccionamiento de las membranas y el citosol de este cultivo. Una vez obtenidas las dos fracciones celulares (EC y EM) las proteínas fueron separadas en un gel desnaturante (SDS-PAGE) y con el objetivo de identificar cuáles presentaban actividad enzimática tipo esterasa se empleó un zimograma para esterasa. Aunque en ambas fracciones se observa un gran número de proteínas, tanto de origen citoplásmico (EC), como proteínas periféricas e

intrínsecas a la membrana celular (EM) (figura 5A), en el zimograma sólo se observó una banda, es decir solo una proteína, con actividad esterasa asociada principalmente al extracto membranal. Esta señal presenta una masa molecular aproximada de 33 kDa (figura 5B).

Este resultado coincide con lo reportado por Akutsu y colaboradores (1998) en cuanto a la presencia de una esterasa en la membrana citoplásmica. Sin embargo, el tamaño reportado para esa esterasa fue de 62 kDa mientras que para la encontrada en *Alicyclophilus* sp BQ1 fue de 33 kDa.

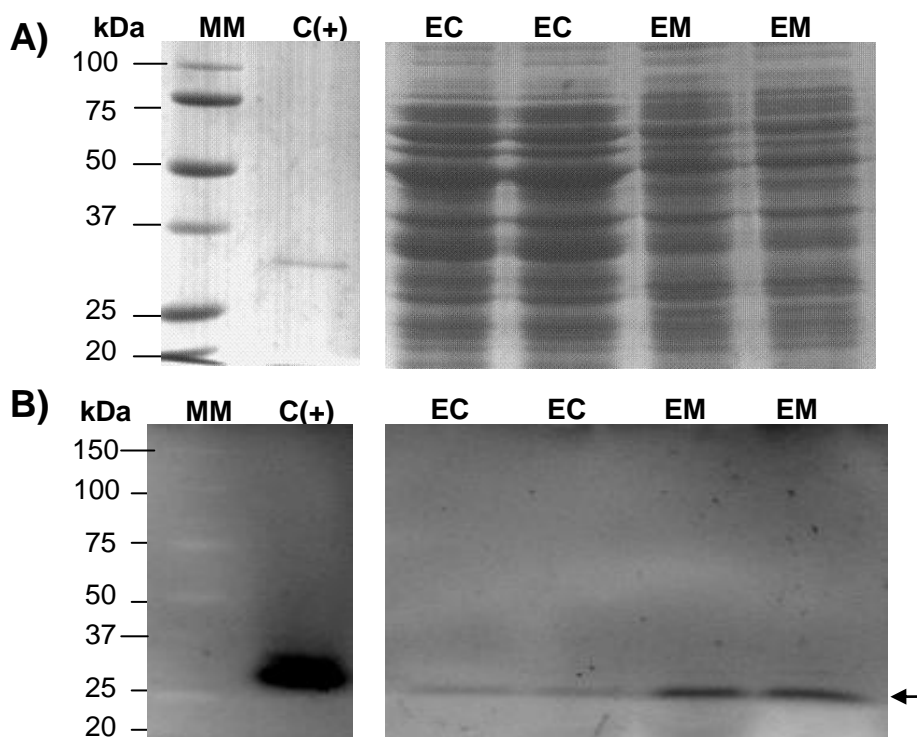


Figura 5. Actividad esterasa de extracto citoplásmico y extracto membranal de *Alicyclophilus* sp. BQ1 cultivada en un medio mínimo con PU. A) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. MM, marcadores de masa molecular; C(+), control positivo, lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (3 mg/mL, 40 U); EC, extracto citoplásmico; EM, extracto membranal, cada carril se cargó con 30 μ g de proteína. B) Zimograma para detectar actividad esterasa equivalente al gel en A). La flecha indica la presencia de actividad esterasa en los extractos (la señal original es blanca con un fondo obscuro, pero se presenta en negativo para más claridad).

7.2 Estabilización del extracto membranal.

Debido a que en los primeros ensayos de determinación de actividad esterasa obtenida de EM se observó que la vida activa de la enzima no era mayor de 3 días después de haber sido extraída de la membrana, se consideró la posibilidad de identificar alguna condición con la cual estabilizar la enzima para conseguir mantener su actividad por tiempos más largos. Con este propósito se realizaron una serie de experimentos basados en la congelación de la enzima, dentro de su entorno membranal, a -70 °C probando el efecto de varios crioprotectores y empleando el zimograma para determinar cualitativamente la actividad de la enzima después del tratamiento.

Las moléculas utilizadas para estabilizar a la enzima congelada fueron seleccionadas a partir de una revisión de trabajos de preservación de actividad de esterasa, en los cuales se identifican como buenos agentes crioprotectores al acetato de sodio, al cloruro de sodio (Xu *et al.*, 2005) y al glicerol al 30% (Kermasha *et al.*, 2000). Los primeros dos corresponden a agentes estabilizantes de tipo iónico, mientras que el tercero es un agente estabilizante de tipo osmótico.

Los resultados obtenidos en los experimentos de estabilización de la actividad enzimática de la esterasa en el extracto membranal, se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Estimación del efecto de congelación y uso de crioprotectores en la estabilidad de la esterasa de membrana de *Alicyclophilus* sp BQ1.

Tiempo (h)	Crioprotector	Intensidad *
0	Sin	+++
	Acetato de sodio	++
	NaCl	++
	Glicerol	+++
24	Sin	+++
	Acetato de sodio	++
	NaCl	++
	Glicerol	+++
48	Sin	++
	Acetato de sodio	+
	NaCl	+
	Glicerol	++
72	Sin	—
	Acetato de sodio	—
	NaCl	—
	Glicerol	+
96	Sin	—
	Acetato de sodio	—
	NaCl	—
	Glicerol	—

* La intensidad de las bandas de actividad en el zimograma se asignó con base en una escala cualitativa: (+++) muy intensa, (++) moderadamente intensa (+) poco intensa (-) no detectable.

Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática de la esterasa asociada a membrana es muy sensible a cambios en el medio que la rodea. Esto debido a que después de realizar el zimograma al tiempo cero de haber agregado el agente crioprotector la intensidad de las bandas que contenían agentes crioprotectores de tipo iónico (moderadamente intensas) eran menores con relación a la banda que correspondía a la muestra sin crioprotector (muy intensa), mientras que con glicerol la intensidad de la banda era muy semejante (muy intensa) a la del control. Este comportamiento indica que la naturaleza de los crioprotectores afecta la estabilidad de la esterasa asociada a membrana,

A las 24 h de almacenamiento, la actividad enzimática no presentó ningún cambio con relación al tiempo cero, con lo cual se puede decir que la estabilidad de la enzima se mantuvo constante. Sin embargo, a las 48 h se comenzó a observar una disminución en la intensidad de las bandas, siendo las bandas de la muestra sin crioprotector y la que contenía glicerol moderadamente intensas, mientras que las bandas de la muestra con crioprotectores de tipo iónico eran poco intensas.

A las 72 h, la intensidad de las bandas de la muestra sin crioprotector y de la muestra con glicerol fueron poco intensas, pero ya no fue posible observar las bandas de actividad correspondientes a las muestras con los crioprotectores de tipo iónico. Finalmente, a las 96 h, ya no se detectó ninguna banda de actividad enzimática tipo esterasa, ni en las muestras con crioprotector, ni en la muestra sin él.

De los agentes crioprotectores utilizados, el que estabilizó a la enzima por más tiempo fue el glicerol, lo cual probablemente se debió a que este tipo de crioprotector es un cosolvente que ayuda a mantener la estabilidad de las interacciones hidrofóbicas dentro de la proteína al incrementar la densidad molecular de la solución sin cambiar la constante dieléctrica de la misma (Coligan, 1999; Simpson, 2004), mientras que los otros crioprotectores pudieron haber ocasionado precipitación de la proteína por la concentración a la que fueron utilizados (Simpson, 2004). Sin embargo, no fue posible lograr un incremento significativo en la estabilidad de la actividad enzimática, comparada con el tratamiento en el que no se aplicó crioprotector.

Dentro de los factores que ocasionan inestabilidad de las enzimas se encuentran: alteraciones en las condiciones de la solución que contiene a la enzima (concentración, temperatura, pH), pérdida de cofactores esenciales, exposición a proteasas, oxígeno o metales pesados y cambios físicos de la muestra (congelar o descongelar) (Simpson, 2004). En el caso de la enzima en estudio, se identificaron la mayoría de estos factores, excepto quizá la exposición a metales pesados, lo cual seguramente está provocando la inestabilidad de la proteína y consecuentemente la disminución en la actividad enzimática.

En el caso particular de la proteína de interés, sería recomendable probar otras modificaciones al protocolo propuesto. Se podría contemplar el uso de inhibidores de proteasas, siempre y cuando no afecten la estabilidad de la enzima, y evitar cambios fisicoquímicos drásticos, lo cual podría lograrse almacenando la muestra en una solución con concentración de sales y/u otros compuestos adecuada, al igual que el pH, a una temperatura de 4 °C.

7.3 La actividad enzimática del extracto membranal fue capaz de hidrolizar ésteres de longitud de cadena intermedia.

Al realizar reacciones de hidrólisis con diferentes sustratos se observó que la actividad esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 era mayor en los ensayos realizados con p-NPB. La actividad enzimática con los otros sustratos fue menor, observándose el siguiente orden decreciente: p-NPC, p-NPL, p-NPA y p-NPP (figura 6).

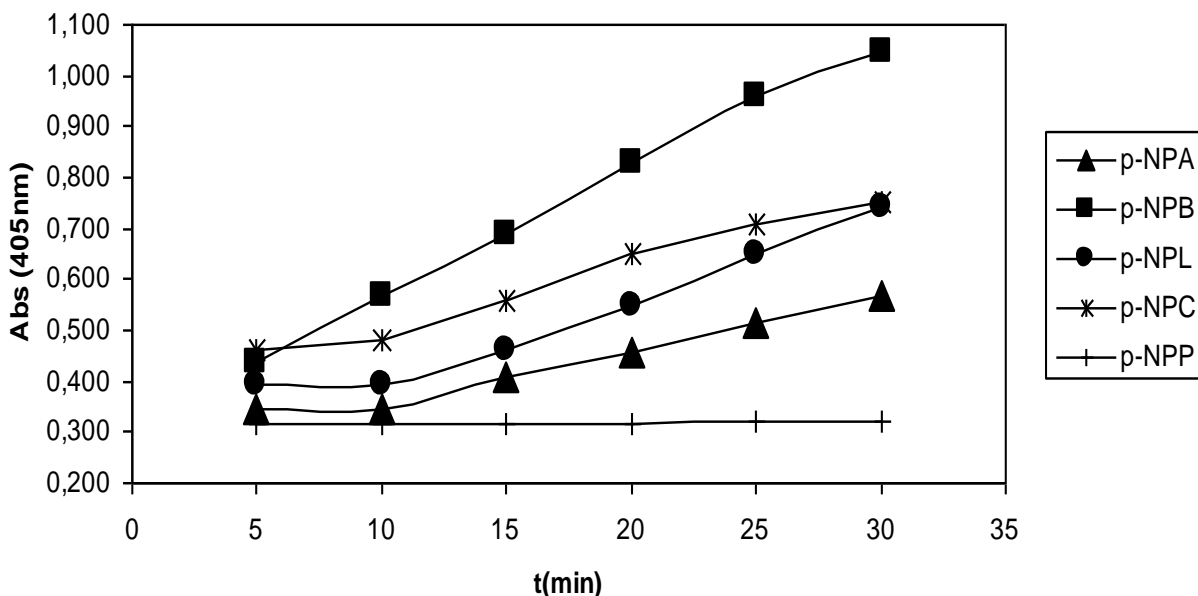


Figura 6. Actividad esterasa del extracto membranal sobre derivados de p-NP con diferentes longitud de cadena de carbonos. Se determinó la capacidad de hidrólisis de la esterasa empleando extractos membranales. Cantidad de proteína: 2.6 μg /reacción. Los sustratos probados fueron p-nitrofenil acetato (p-NPA) (C₂), p-nitrofenil butirato (p-NPB) (C₄), p-nitrofenil caproato (p-NPC) (C₈), p-nitrofenil laurato (p-NPL) (C₁₀) y p-nitrofenil palmitato (p-NPP) (C₁₆).

El comportamiento observado indica que la actividad enzimática asociada a membrana tiene cierta especificidad ante sustratos con cadena de carbonos de longitud media (p-NPB, (C₄), p-NPC (C₈) y p-NPL (C₁₀)), seguidos por los sustratos con cadena de carbono corta (p-NPA (C₂)). En el caso del p-NPP (C₁₆) no se detectó actividad enzimática. Estos resultados indican que la enzima asociada a membrana con actividad esterasa no corresponde a una “lipasa verdadera”, ya que este tipo de enzimas puede hidrolizar fácilmente ésteres con ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono), como el p-NPP (C₁₆), mientras que el hecho de hidrolizar ésteres con ácidos grasos de longitud de cadena media y corta indican un comportamiento semejante a las carboxilesterasas (Jaeger *et al.*, 1999; Fojan *et al.*, 2000).

7.4 Purificación de la proteína con actividad esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. cultivada en MM-PUh.

Con base en los primeros resultados en los que encontramos solo una actividad esterasa en el EM, nos propusimos realizar un proceso de purificación a dicha fracción celular, el cual permitiría obtener mayor información de la proteína con actividad enzimática tipo esterasa.

Después de tratar la fracción membranal con el Zwittergent para extraer las proteínas de membrana y las asociadas a ella, se realizó una diálisis para eliminarlo. Posteriormente, se llevó el EM al 12.5% de saturación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) para posteriormente hacerlo pasar a través una columna cromatográfica de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose CL-B4), obteniéndose tres fracciones: fracción no unida, fracción de lavado y fracción unida, siendo la fracción no unida la que presentaba actividad esterasa en el ensayo con p-NPA como sustrato. De esta forma, la proteína presente en la fracción no unida disminuyó a un valor cercano al 4% con relación a la proteína total inicial y se logró que la actividad específica se incrementara 13 veces (tabla 4), lo cual indica que con esta columna cromatográfica fue posible disminuir de forma considerable la cantidad de proteínas presentes de acuerdo a las propiedades hidrofóbicas de las mismas.

Tabla 4. Purificación de esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp.

Paso	Volumen (mL)	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg proteína)	Incremento de actividad específica
Extracto membranal	104	1.07×10^{-2}	235	4.54×10^{-6}	1
Phenyl Sepharose	21	5.50×10^{-3}	8.88	6.19×10^{-4}	13
Mono-Q	0.5	4.7×10^{-3}	3.26	1.44×10^{-3}	31

Para el segundo paso del proceso de purificación se utilizó una columna cromatográfica de intercambio aniónico obteniéndose nuevamente tres fracciones, de las cuales, sólo la fracción unida presentó actividad esterasa. En la última columna utilizada en el proceso de purificación de la proteína, la cantidad de proteína presente disminuyó a un valor cercano al 1% con relación a la proteína inicial y también se logró un incremento en la actividad específica de 31 veces.

Se realizó un gel SDS-PAGE que permitió observar como iba disminuyendo la cantidad de proteínas presentes en las fracciones en las cuales se detectaba la actividad esterasa al ir realizando el protocolo de purificación (figura 7).

Para confirmar que la proteína purificada presentaba actividad esterasa se realizó un zimograma, el cual permitió observar la actividad enzimática anteriormente mencionada (figura 8).

Los datos de actividad enzimática específica obtenidos y el gel SDS-PAGE sirven para que, en conjunto, se pueda sustentar el protocolo utilizado para purificar la proteína con actividad esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp.

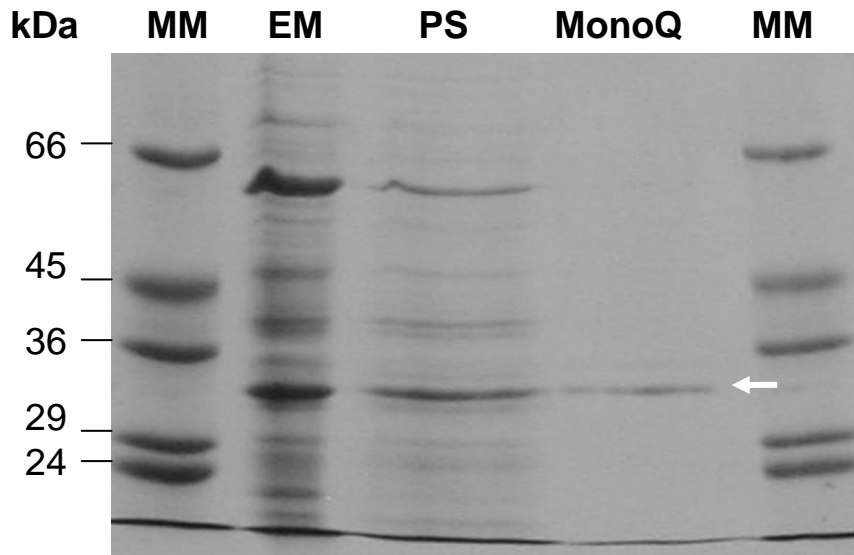


Figura 7. Purificación de la esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1. SDS-PAGE al 12.5% teñido con azul de Commasie. MM, marcadores de masa molecular; EM, extracto membranal; PS, fracción no unida a la columna Phenyl Sepharose; Mono Q, fracción unida a la columna MonoQ. La flecha indica la proteína purificada.

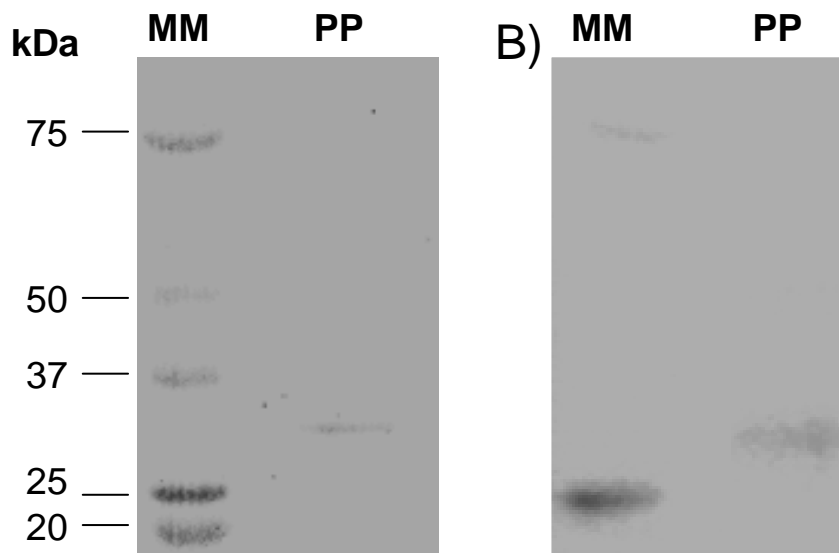


Figura 8. Actividad esterasa de la proteína purificada a partir de extractos membranales de *Alicyclophilus* sp. A) SDS-PAGE teñido con azul de Commasie. MM, marcador de masa molecular; PP, proteína purificada (10 μ g de proteína) **B)** Zimograma de actividad de esterasa correspondiente al gel en A) (la señal original es blanca con un fondo oscuro, pero se presenta en negativo para más claridad).

5. Determinación de la masa molecular de la proteína con actividad esterasa.

Una vez realizada la extracción de proteínas asociadas a membrana de *Alicyclophilus* sp., se inyectó la muestra en el equipo al que estaba acoplada la columna de exclusión molecular.

Transcurrido el tiempo establecido se obtuvieron 60 fracciones, recordando que bajo las condiciones establecidas para este experimento, se obtiene una fracción por minuto. Con ayuda del cromatograma obtenido (figura 9) se decidió trabajar a partir de la fracción 16 hasta la fracción 50, ya que son en estas fracciones donde se observa la presencia de proteínas.

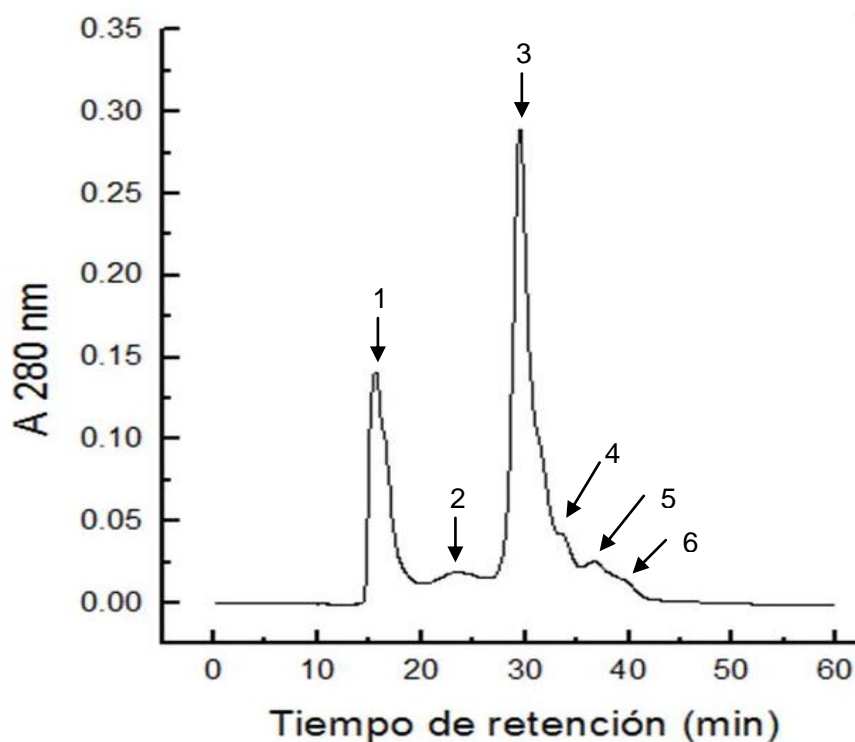


Figura 9. Proteínas presentes en extracto membranal de *Alicyclophilus* sp. Las fracciones en las que se obtuvieron valores de absorbancia diferentes a cero contienen proteínas. Cada número indica los picos de proteína identificados.

A cada fracción se le realizaron ensayos con p-NPA para identificar las fracciones que presentaban actividad enzimática de tipo esterasa. De los seis picos de proteína identificados, sólo en dos de ellos se detectó actividad esterasa: en el pico 1 y en el pico 4. Del pico 1 las fracciones 16, 17 y 18 fueron las que presentaron actividad enzimática, siendo la fracción 16 la que tuvo valores más altos, mientras que en el pico 4 presentaron actividad enzimática tres fracciones (33, 34 y 35), observándose el valor más alto en la fracción 34 (tabla 5).

Tabla 5. Actividad enzimática de diferentes fracciones obtenidas por filtración en gel.

Fracción	16	17	18	33	34	35
Actividad enzimática (nmol p-NPA·min⁻¹ / 100 µL de muestra)	147.295	116.959	117.325	141.447	233.918	117.325

En el pico 6 el valor de la absorbancia a 280 nm es muy cercano a cero (figura 9), lo cual indica que la cantidad de proteína en esas fracciones es muy baja. Sin embargo, también se les hicieron los ensayos de actividad para confirmar que no había actividad enzimática. De la fracción 1 a la fracción 15 no se hicieron ensayos de actividad debido a que la muestra entra a la columna de exclusión molecular hasta la fracción 16.

Con ayuda de una curva de calibración realizada con marcadores de masa molecular comerciales utilizando las mismas condiciones a las que se encontraba nuestra enzima de interés (figura 10) fue posible relacionar los tiempos de retención con el logaritmo de las masas moleculares de las referencias y así poder conocer un valor aproximado de la masa molecular de la esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp.

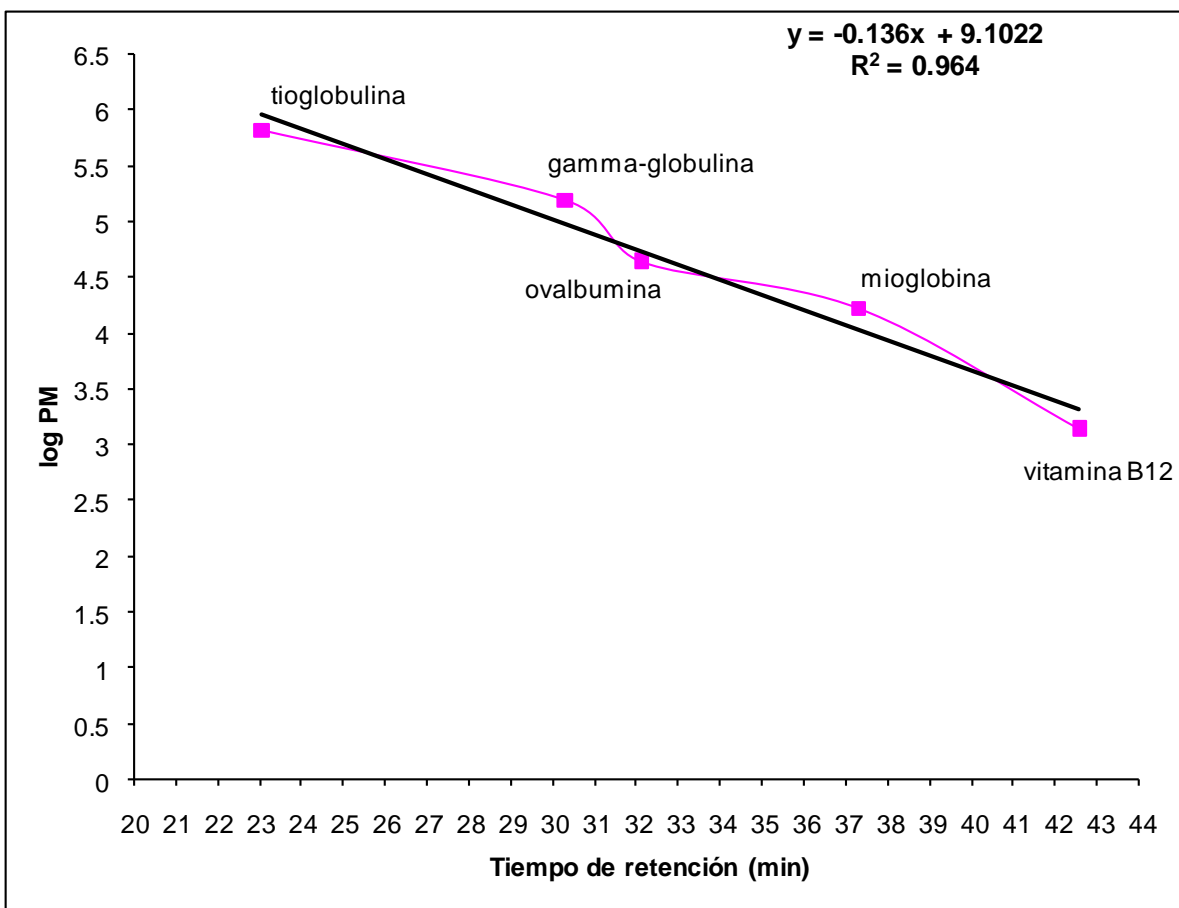


Figura 10. Curva de calibración de la columna Superdex 200 con marcador de peso molecular comercial (BIO-RAD No. Cat. 151-1901). Las masas moleculares (kDa) reportadas para cada proteína son: tioglobulina (670), gamma globulina (158), ovalbumina (44), mioglobulina (17) y vitamina B12 (1.35).

Para la fracción 16 la masa molecular calculada fue de 8,437 kDa. Es probable que esta masa molecular tan grande corresponda a aglomerados protéicos de la enzima de interés que se formaron al momento de inyectar la muestra en el equipo debido a interacciones proteína-proteína, los cuales por su elevada masa molecular salen rápidamente de la columna.

La masa molecular calculada para la fracción 34 fue de aproximadamente 31 kDa, lo cual concuerda con los valores obtenidos en los geles SDS-PAGE.

7.6 Obtención del extremo N-terminal de la proteína asociada a membrana con actividad esterasa purificada a partir de *Alicyclophilus* sp.

Los estudios para conocer el extremo N-terminal realizados por el Dr. Guillermo Mendoza no proporcionaron resultados debido a que el N-terminal se encuentra bloqueado. Se dice que el extremo N-terminal de una proteína está bloqueado cuando este segmento de la proteína no interacciona con el reactivo de Edman (fenilisotiocianato) para formar el derivado feniltiocarbamil (PTC-protein) esperado en la degradación de Edman. Algunas de las causas que originan el bloqueo, y por consiguiente, impiden la identificación del extremo N-terminal son: la acetilación (aminoácidos N-acetilados), la glicosilación (aminoácidos glicosilados) o la carboxilación (formación de grupos carboxilpirrolidona), siendo la acetilación la más común de ellas ([Alphalyse Protein Analysis Blog, http://proteinanalysis.wordpress.com/2009/08/31/why-is-my-proteins-n-terminal-blocked/](http://proteinanalysis.wordpress.com/2009/08/31/why-is-my-proteins-n-terminal-blocked/)). El bloqueo del extremo N-terminal se presenta aproximadamente en el cincuenta por ciento de las proteínas y puede ser intrínseco a la proteína o puede ocurrir durante el procesamiento de la muestra. Es por ello que no es posible obtener la secuencia del extremo N-terminal de algunas proteínas una vez que se ha determinado el bloqueo en los aminoácidos localizados en ese segmento de la proteína.

7.7 Identificación de la proteína con actividad esterasa purificada de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 cultivada en MM-PUh.

Una vez que se realizó la purificación de la proteína y se identificó mediante ensayos de actividad utilizando el método del p-NPA en qué fracciones se encontraba, se procedió a realizar un gel desnaturante (SDS-PAGE) con dichas muestras y se tiñó con azul de Comassie. De esta forma se pudo observar claramente una proteína de aproximadamente 33 kDa (figura 8A).

En el laboratorio del Dr. Guillermo Mendoza (Facultad de Medicina, UNAM) se cortó la banda de proteína anteriormente mencionada y se sometió a una técnica conocida como cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), la cual es una herramienta utilizada para identificar proteínas. El fundamento de esta técnica consiste en relacionar fragmentos de péptidos obtenidos por la espectrometría de masas con bases de datos de aminoácidos de microorganismos que ya han sido secuenciados. Esta operación se realiza utilizando el programa Mascot (Matrix Science Ltd. <http://www.matrixscience.com>), obteniéndose así, la secuencia de aminoácidos más probable y las proteínas que corresponderían a dichos fragmentos de aminoácidos. Este análisis se realizó con dos muestras obtenidas en purificaciones independientes.

En el primer análisis realizado se pudieron identificar diferentes fragmentos de péptidos que, según la base de datos, podrían corresponder a dos proteínas: una porina tipo Gram negativo de *Acidovorax ebreus* TPSY y una porina tipo Gram negativo de *Comamonas testosteroni* KF-1, siendo la primera la proteína más probable de acuerdo a los datos obtenidos.

En un segundo análisis espectrométrico se identificaron las mismas proteínas. Sin embargo, la cantidad de fragmentos peptídicos detectados en el ensayo fueron significativamente mayores para ambas proteínas, siendo nuevamente la porina tipo Gram negativo de *Acidovorax ebreus* TPSY la proteína con la que se encontró mayor identidad (Ver anexo).

Existen diferentes clasificaciones de enzimas bacterianas con actividad lipolítica dentro de las cuales se encuentran carboxilesterasas, lipasas verdaderas,

fosfolipasas entre otras. En una de estas clasificaciones (Arpigny y Jaeger, 1999) se propone un grupo de enzimas conocido como Familia de esterasas GDSL, el cual presenta algunas características interesantes con relación a los resultados espectrométricos obtenidos, de las cuales destacan los siguientes:

1. En las esterasas GDSL de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Photobacterium luminescens* el dominio carboxilo terminal presumiblemente se encuentra como 12 hojas β -plegadas con características anfipáticas, las cuales pueden formar un poro en la membrana externa de las bacterias conocido como poro tipo β -barril. El dominio amino terminal puede localizarse en el interior del poro formado y en algunas ocasiones por efecto de algún proceso proteolítico puede liberarse al medio extracelular.
2. Al analizar las secuencias de las porinas de *Acidovorax ebreus* TPSY, que fue la proteína con mayor identidad y de *Comamonas testosteroni* KF-1 la segunda en semejanza, y compararlas con secuencias de esterasas de la familia GDSL (Arpigny y Jaeger, 1999), es posible identificar algunas secuencias en las porinas analizadas, conservadas en la familia de esterasas GDSL (figura 11).

A

1 MKKSLIALAV LAASGAAMAQ SSVTLFGVVD TAFGYVDNAN AA**GDSV**YGLS
51 TSGNATSRLG FR**GVEDLGG** **LK**AGFWLEGE IFGDNGNAAG FNFQRRSTVS
101 LA**GG**FGEVRL GRDYTPGYTK FISYDVFGQV GIGQFMGWSN WN**GNN**QTTAN
151 NN**ND**ANGIRS SNLISYFTPN FSGFTAGLGY GFDEKADKTN SKKGRYVGGY
201 VAYDNGPLSV ALSYDESSAL TLGS**GA**TAVN GADRNRLLTG GSYNLNVVKL
251 NAILQQTKDD VPGGSEKRVN AYMLGASAPV GAGEVKAQYA LYDQK**FI**DSK
301 AHQISLGY**VH** NLSKR**TALYG** **TVAYLKN**KDA SNLGLNAK**NL** **STGGPGAGEN**
351 **QTGVQLGIR**H SF

B

1 MKKSLIALAV LAASGAAMAQ SSVTLFGIVD **AGVSYV**DNAD GNSSNYGMHN
51 SGNATSRLGL RGTEDL**GCL** KAGFWLEGAV LNDV**CC**GFDF RRESTVRL**LSG**
101 **NFGEVRLGRE** TTPTFRAGLK YDLFGATGIG KNQGFSDWAG AGINDADTIR
151 ADNMLSYSSP NFSGFTANVS YAFDEKKQAV AGSNKIGR**YV** **GGN**VGYENGP
201 LSVTAAAYGSQ KSVVAGFTGD RDEMSI**GA**SY NFGMAKVVGL AQQIKYKADA
251 SGVPSQKYNN YLLGVSAPVG GVGEVKAQYA LYDQKAN**DAK** AHQFSLGY**VH**
301 NLSKR**TALYG** **TVAYLKN**KEG SFMALDAKGV SNTVGLKDSG AARNQ**TGVQV**
351 GIRHAF

FIGURA 11. Análisis de las secuencias de las proteínas más probables.

Los aminoácidos que forman los fragmentos de péptidos identificados por espectrometría de masas se presentan en color rojo. Los aminoácidos sombreados en color verde, azul, rosa y gris son aminoácidos altamente conservados en la familia de esterasas GSDL. Los aminoácidos característicos de la familia GDSL se encuentran sombreados con amarillo. A) Porina de *Acidovorax ebreus* TPSY. B) Porina de *Comamonas testosteroni* KF-1

Con los resultados obtenidos mediante la espectrometría de masas en tándem y al realizar los alineamientos de las secuencias de aminoácidos, además de los reportes de porinas con actividad enzimática (Koraimann, 2003; Bishop, 2008), se puede decir que la proteína purificada es una porina asociada a membrana extracelular de *Alicyclophilus* sp. la cual presenta actividad esterasa.

Además, existe la posibilidad de que la proteína purificada comparta firmas de aminoácidos con proteínas de la familia GDSL, lo cual nos permitiría clasificarla en esta familia de esterasas, y no como una “lipasa verdadera” (Arpigny y Jaeger, 1999). Sin embargo, para tener la certeza de que la actividad esterasa si corresponde a la proteína que se purificó, es necesario realizar otras pruebas como lo sería la expresión de proteína recombinante y pruebas de actividad ante diferentes sustratos con proteína purificada.

8. CONCLUSIONES

- Se logró purificar una enzima asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. la cual tiene una masa molecular aproximada de 31Kda.
- La proteína purificada presentó actividad esterasa, la cual no fue posible estabilizar.
- Es probable que la proteína purificada se pueda clasificar como una esterasa de la familia GDSL.
- La actividad esterasa identificada no corresponde a una “lipasa verdadera”

9. ANEXO

MATERIALES Y REACTIVOS

Medios de cultivo

Medio mínimo poliuretano (MM-PUh)

Solución A (10 X, 1 L)

KH_2PO_4	20.0 g
K_2HPO_4	70.0 g

Solución B (100 X, 1 L)

NH_4NO_3	100.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 g

Solución C (1000 X, 1 L)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 g

La solución A y la solución B se esterilizan en autoclave (120 °C, 15 min). La solución C se esteriliza por filtración utilizando membranas con poro de 0.22 µm (Millipore).

Solución de Hydroform® (3% en sólidos, 100 mL)

Hydroform® comercial (30% en sólidos) 10 mL

1. Aforar a 100 mL con H_2O desionizada.
2. Esterilizar por filtración utilizando membranas con poro de 0.45 µm (Millipore).
Este procedimiento también sirve para eliminar oligómeros del Hydroform®.

Procedimiento:

1. En condiciones de esterilidad, a 700 mL de agua estéril desionizada agregar, en el siguiente orden, 100 mL de solución A, 10 mL de solución B, 1 mL de solución C y 100 mL de Hydroform al 3%.
2. Aforar a 1L y utilizar lo más pronto posible.

Medio Luria Bertani (LB) 1 L (ver nota)

Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g

Procedimiento:

Disolver en 600 mL de H₂O desionizada con agitación y aplicar un poco de calor. Aforar a 1 L con H₂O desionizada y esterilizar en autoclave (120 °C, 15 min). Si se desea que el medio sea sólido se deben agregar 15 g de agar a la formulación antes de esterilizar.

Nota: La formulación del Medio LB empleado utiliza el doble de NaCl en comparación con Medio LB convencional. Esto es con la finalidad de reducir la probabilidad de contaminación ambiental.

Formulación de las soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7 (100 mL)

KH ₂ PO ₄	2.0 g
K ₂ HPO ₄	7.0 g

Procedimiento:

1. Disolver el KH₂PO₄ en aproximadamente 90 mL de agua desionizada y posteriormente disolver el K₂HPO₄.
2. Ajustar el pH a 7 y aforar a 100 mL.
3. Esterilizar por autoclave 120 °C, 15 min.

Solución amortiguadora de fosfatos 200 mM pH 7 (500 mL)

KH ₂ PO ₄ (1 M)	38.5 mL
K ₂ HPO ₄ (1 M)	61.5 mL

Procedimiento:

1. Preparar las soluciones stock y adicionar las cantidades adecuadas de cada componente.
2. Llevar a un volumen aproximado de 400 mL y ajustar pH a 7
3. Aforar a 500 mL y almacenar a temperatura ambiente.

Solución amortiguadora de fosfatos 200 mM con Zwittergent[®]3-12 al 0.22% (m/v) (200 mL)

1. Diluir 20 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 200 mM pH 7 en 180 mL de agua desionizada.
2. Adicionar 0.44 g de Zwittergent[®]3-12 y disolver.
3. Almacenar a 4 °C para cuando se requiera utilizar.

Solución de p-NPA 20 mM en acetonitrilo (50 mL)

Procedimiento:

1. Disolver 181.1 mg de p-NPA en 40 mL de acetonitrilo.
2. Aforar a 50 mL y tapar perfectamente y dejar en lugar seco para evitar una hidrólisis acelerada del p-NPA.

Solución de butirato de metilumbeliferona 50mM

1. Disolver 185 mg de butirato de metilumbeliferona en 15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Almacenar a -20 °C. No preparar más de 15 mL de la solución stock debido a que este reactivo se hidroliza con el paso del tiempo. Es estable aproximadamente por 45 días.
3. Para realizar la dilución 1.6 mM se debe preparar sólo el necesario para revelar el gel (aprox. 15 mL)

Gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS).

Acrilamida 30% para 100 mL

acrilamida	30 g
bisacrilamida	0.8 g

Precaución: la acrilamida es neurotóxica cuando no se ha polimerizado por lo tanto siempre usar guantes para manejarla. Se supone que ya polimerizada no es

venenosa pero podrían quedar moléculas sin polimerizar. Por lo tanto **siempre** usar guantes, aún que esté polimerizada.

Pesar los compuestos, disolverlos en 80 mL de agua en una parrilla con agitación y un poco de calor. Filtrar la mezcla en un embudo con un filtro Whatman No. 1 u otro de poro grande, después de que se haya disuelto completamente y aforar a 100 mL con agua deionizada en una probeta. Almacenar a 4°C

Buffer separador para 100 mL

Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	2 mL
Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N	

Pesar el Tris, disolverlo en 80 mL de agua deionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer apilador para 100 mL.

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 mL
Ajustar el pH a 6.8 con HCl 12N	

Pesar el Tris disolverlo en 80 mL de agua deionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar con agua deionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de carga 5X para 10 mL

Tris 1M pH 6.8	3.125 mL
glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 g
azul de bromofenol 10%	0.2 mL
β-mercaptoetanol (ver abajo)	

Pesar y medir los ingredientes y llevarlos a 10 mL con agua deionizada. Almacenar a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de usar agregar 4 μ L de β -mercaptoetanol por 20 μ L de buffer de carga. El buffer de esta receta es 5 veces concentrado es decir debes usar 1/5 de buffer de carga por 1 volumen de tu muestra.

Buffer de corrida 10X para 1 Litro.

Tris-base (NO Tris-HCl)	30 g
glicina	144 g
SDS	10 g

Pesar el tris y la glicina, agregar 600 mL de agua deionizada disolver en una parrilla con agitación. Checar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8. **No ajustarlo**, si no está a ese pH es que pesaste mal el Tris o usaste Tris-HCl. Volver a pesar, **pero correctamente**. Agregar el SDS en polvo, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 mL en una probeta. Almacenar a temperatura ambiente. Antes de usarlo para correr tu gel, medir 70 mL de este buffer 10X y llevarlo a 700 mL con agua deionizada.

Persulfato de amonio al 20% para 10 mL.

persulfato de amonio	0.2 g
----------------------	-------

Este reactivo es higroscópico y puede deteriorarse creando problemas de gelificación. Se recomienda mantenerlo guardado en un desecador a temperatura ambiente. Pesar el reactivo, disolverlo en agua deionizada. Hacer alícuotas de 500 μ L en tubos eppendorf, etiquetarlas y congelarlas a -20°C. Al momento de usar, descongelar un tubo y marcarlo con la fecha, para seguir usándolo. Preparar tu gel y volver a congelar el tubo. Puedes descongelarlo hasta 3 o 4 veces más. Después mejor desecharlo y usar otro nuevo.

Colorante Coomassie para teñir geles para 100 mL.

Coomassie 1% en 50%metanol:5% ácido acético glacial

Coomassie Brilliant Blue R250	0.250 g
Metanol grado técnico	45.4 mL
Agua	45.4 mL
Acido acético glacial	9.2 mL

Pesar y medir los reactivos, disolverlos en vaso de precipitado de vidrio (no usar de plástico). El coomassie se une a proteínas por lo cual se recomienda usar guantes para prepararlo. Almacenar a temperatura ambiente.

Fijador y desteñidor para 250 mL.

20% Metanol:7.5% ácido acético

ácido acético glacial	18.75 mL
metanol grado técnico	50 mL

Medir los reactivos. Aforar a 250 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Gel Separador 12%(SDS-PAGE)

H ₂ O desionizada	1.5 mL
Buffer separador	1.1 mL
Acrilamida al 30%	1.7 mL
Persulfato de amonio al 20%	25 µL
TEMED	2.5 µL

Gel apilador 12% (SDS-PAGE)

H ₂ O desionizada	1.2 mL
Buffer apilador	522 µL
Acrilamida al 30%	353 µL
Persulfato de amonio al 20%	20 µL
TEMED	5 µL

Resumen de péptidos más probables obtenidos con el programa MASCOT al realizar la espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS)

User : Guillermo Mendoza Hernandez
Email : menher@servidor.unam.mx
Search title : D:\Analyst Data\Projects\2010\2010_01\Data\DataPorina2.wiff (sample number 1)
MS data file : mas1F0.tmp
Database : NCBI nr 20100424 (10924345 sequences; 3720199341 residues)
Taxonomy : Other Proteobacteria (2776642 sequences)
: Error tolerant search of all significant protein hits
Timestamp : 28 Apr 2010 at 22:53:49 GMT

Protein hits:

1. [gi|222109877](#) Mass: 37864 Score: 130 Matches: 3(3) Sequences: 3(3) **emPAI**: 0.18
porin Gram-negative type [*Acidovorax ebreus* TPSY]
2. [gi|221069090](#) Mass: 37143 Score: 67 Matches: 2(2) Sequences: 2(2) **emPAI**: 0.09
porin Gram-negative type [*Comamonas testosteroni* KF-1]
3. [gi|292493852](#) Mass: 90242 Score: 64 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
penicillin-binding protein, 1A family [*Nitrosococcus halophilus* Nc4]

- [gi|222109877](#) porin Gram-negative type [*Acidovorax ebreus* TPSY]

Secuencia cubierta: 11%

Los péptidos identificados están en negritas.

```
1 MKKSLIALAV LAASGAAMAQ SSVTLFGVVD TAFGYVDNAN AAGDSVYGLS
51 TSGNATSRLG FRGVEDLGGG LKAGFWLEGE IFGDNGNAAG FNFQRRSTVS
101 LAGGFGEVRL GRDYTPGYTK FISYDVFGQV GIGQFMGWSN WNGNNQTTAN
151 NNNDANGIRS SNLISYFTP N FSGFTAGLGY GFDEKADKTN SKKGRYVGGY
201 VAYDNGPLSV ALSYDESSAL TLGSGATAVN GADRNRLTLG GSYNLNVVKL
251 NAILQQTKDD VPGGSEKVN AYMLGASAPV GAGEVKAQYA LYDQKFIDSK
301 AHQISLGYVH NLSKRTALYG TVAYLKNKDA SNLGLNAKNL STGGPGAGEN
351 QTGVQLGIRH SF
```

gi|221069090 porin Gram-negative type [*Comamonas testosteroni* KF-1]
Secuencia cubierta: 6%

Los péptidos identificados están en negritas.

1 MKKSLIALAV LAASGAAMAQ SSVTLFGIVD AGVSYVDNAD GNSSNYGMHN
51 SGNATSRLGL RGTEDLGGGL KAGFWLEGAV LNDVGGGFDF RRESTVRL**LSG**
101 **NFGEVRLGRE** TTPTFRAGLK YDLFGATGIG KNQGFSDWAG AGINDADTIR
151 ADNMLSYSSP NFSGFTANVS YAFDEKKQAV AGSNKIGRYV GGNVGYENGP
201 LSVTAAAYGSQ KSVVAGFTGD RDEMSIGASY NFGMAKVVGL AQQIKYKADA
251 SGVPSQKYNN YLLGVSAPVG GVGEVKAQYA LYDQKANDAK AHQFSLGYVH
301 NLSKR**TALYG TVAYLKNKEG** SFMALDAKGV SNTVGLKDSG AARNQTGVQV
351 GIRHAF

10. LITERATURA CITADA

- Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 62–67.
- Alphalyse Protein Analysis Blog. (<http://proteinanalysis.wordpress.com/2009/08/31/why-is-my-proteins-n-terminal-blocked/>) Fecha de consulta: 24/08/2010
- Alphalyse INC. (<http://www.alphalyse.com/files/N-%20and%20Cterminal%20protein%20sequencing%2020090310.pdf>) Fecha de consulta: 24/08/2010
- American plastics council year end statistics for 2004. (http://www.americanplasticscouncil.org/s_apc/docs/1700/1678.pdf) Fecha de consulta: 16/05/2010
- Artham, T, Doble, M. 2008. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromol. Biosci.* 8(1):14–24.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Carrillo-García. 2004. Identificación de una esterasa extracelular cuya actividad está relacionada con el crecimiento de *Acinetobacter* sp. en poliuretano. Tesis de maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Coligan J, Dunn B, Ploegh H, Speicher D, Wingfield P. 1999. Current protocols in protein science. John Wiley & Sons Inc. EUA. Vol.1. Capítulo 1. pp. 1.1.1-1.3.7.
- Cutler P. Protein Purification Protocols. Humana Press, Totowa, NJ. EUA, 2004. pp. 115-118.
- Diaz, N Prim, F.I.J. Pastor. Direct fluorescent-based lipase activity assay. 1999. *Biotechniques.* 27:697-700.
- Doi Y. Microbial Polyesters. New York: VCH Publishers; 1990. pp 53.
- Frazer AC. 1994. O-methylation and other transformations of aromatic compounds by acetogenic bacteria. Drake HL, editor. *Acetogenesis.* New York: Chapman & Hall. pp. 445–483.
- Fojan P, Jonson PH, Peterson MTN. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie.* 82:1033–1041.
- Genosphere Biotechnologies (<http://www.genosphere-biotech.com/Edman-Degradation.html>) Fecha de consulta: 13/09/10
- Gu JD, Ford TE, Mitton DB, Mitchell R. 2000. Microbial degradation and deterioration of polymeric materials. In: Revie W, editor. *The Uhlig's Corrosion Handbook.* 2nd Edition. New York: Wiley. pp. 439–460.
- Hamilton JD, Reinert KH, Hogan JV, Lord WV. 1995. Polymers as solid waste in municipal landfills. *J Air Waste Manage Assoc.* 43:247–251.
- Howard GT, Ruiz C, Hilliard NP. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 43:7–12.
- Howard GT. Biodegradation of polyurethane: a review. 2002. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 40:245–252.

- Jaeger KE, Arpigny JL. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183
- Kay MJ, Morton LHG, Prince EL. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 27:205–222.
- Kermasha S, Bisakowski B, Morin A. 2000. The effect of physical and chemical treatments on the esterase activity from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Food Research International.* 33: 767-774
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Nakajima-Kambe T, F Onuma, Y Akutsu, and T Nakahara. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *J. Ferment. Bioeng.* 83:456–460.
- Nakajima-Kambe T, F. Onuma, N, Kimpara. T, Nakahara. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbón and nitrogen source. *FEMS Microbiol. Lett.* 129:39-42
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:134–140.
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños S, Cruz M, Wachter C, Loza H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *alicycliphilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6214-6223.
- Oceguera-Cervantes. 2005. Aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio con poliuretano (Hydroform) como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Sauders, JH and Frisch, K. C. 1964. Polyurethanes. In: *Chemistry and Technology*, Part II, Technology. Interscience Publishers, New York. pp. 23
- Shah A, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. 2008. *Biotechnology Advances.* 26: 246–265
- Shah A, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2007. Isolation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading bacteria and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Bacillus* sp. AF3. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60:109–15.
- Simpson R. 2004. Purifying proteins for proteomics. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA. pp. 734-745.
- Swift G. 1997. Non-medical biodegradable polymers: environmentally degradable polymers. In: Domb AJ, Kost J, Wiseman DM, editors. *Handbook of Biodegradable Polymers.* Amsterdam:Harwood Academic. pp. 473–511.
- Teeraphatpornchai T, Nakajima, Y, Shigeno, M, Nakayama, N, Nomura, T, Nakahara y H. Uchiyama. 2002. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnology Letters.* 25: 23-28.

- US EPA. 2005. Municipal solid waste. *United States Environmental Protection Agency*. (<http://www.epa.gov/epaoswer/nonhw/muncpl/facts.htm>).
- Wilson K. y Walker J. 2005. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6^o Edición. Cambridge University Press. EUA. pp. 349-405
- Xu F, Hua TC, Sun DW, Xiao JJ, Zhao XL. 2005. Enzyme activity of wheat esterase as affected by various cryopreservation conditions. *Journal of Food Engineering*. 69: 17-22