



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL SITIO ACTIVO DE LA LIPASA
DE *Bacillus pumilus***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA ELENA JANACUA VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

VOCAL: **Profesor: EUCLIDES AVILA CHÁVEZ**

SECRETARIO: **Profesor: ISMAEL BUSTOS JAIMES**

1er. SUPLENTE: **Profesor: NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG**

2° SUPLENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES _____

SUSTENTANTE:

MARÍA ELENA JANACUA VELÁZQUEZ _____

Este trabajo contó con recursos del programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM (Proyectos IN202710 e IN215613). Igualmente contamos con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyectos CB-2008-01-99857 y CB-2010-01-151189).

Índice

	Contenido	Pág.
Resumen		1
Abreviaturas usadas		2
Capítulo 1. Lipasas		3
1.1 Introducción		3
1.2 Clasificación de las lipasas bacterianas		6
1.3 Estructura		10
1.4 Aplicaciones industriales		11
1.5 Lipasa del género <i>Bacillus</i>		12
Capítulo 2. Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1		14
2.1 <i>Bacillus pumilus</i> GMA1		14
2.2 Lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1		15
2.3 Propiedades bioquímicas		16
2.3.1 Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de BplAr-6H y BplAr-6H-G28S		17
Capítulo 3. Mecanismo catalítico		19
3.1 Mecanismo catalítico		19
Capítulo 4. Objetivos		22
Capítulo 5. Materiales y Métodos		23
5.1 Esquema general de trabajo		23
5.2 Materiales		24
5.2.1 Reactivos		24
5.2.2 Instrumentos y equipos		25
5.2.3 Material de Biología molecular		25
5.2.4 Cepas utilizadas		26
5.2.5 Enzimas utilizadas		26
5.2.6 Plásmidos utilizados		27
5.2.7 Plásmidos construidos		27

5.3 Métodos	27
5.3.1 Acoplamiento Molecular <i>in silico</i> (Docking)	27
5.3.2 Reactivación de la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	28
5.3.3 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	29
5.3.4 Generación de mutantes	29
5.3.5 Amplificación del gen BpIA	30
5.3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
5.3.7 Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 α	33
5.3.8 Purificación del Plásmido	34
5.3.9 Digestión del Plásmido purificado	34
5.3.10 Secuenciación del Plásmido de DNA	35
5.3.11 Transformación en células quimiocompetentes <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	35
5.3.12 Expresión de las proteínas recombinantes	36
5.3.13 Purificación de las proteínas recombinantes	37
5.3.14 Determinación de la concentración de las lipasas	38
5.3.15 Determinación de las constantes de inactivación térmica	38
5.3.16 Caracterización cinética (k_{cat} y K_m)	39
Capítulo 6. Resultados y Análisis	41
6.1 Acoplamiento Molecular <i>in silico</i> (Docking)	41
6.2 Generación de mutantes mediante PCR	46
6.3 Purificación y análisis del Plásmido	47
6.4 Expresión de las proteínas recombinantes	47
6.5 Purificación de las proteínas recombinantes	48
6.6 Determinación de la concentración de las lipasas	50
6.7 Determinación de las constantes de inactivación térmica	51
6.8 Caracterización cinética (k_{cat} y K_m)	55
Capítulo 7. Conclusiones y Perspectivas	66
7.1 Conclusiones	66
7.2 Perspectivas	67
Bibliografía	68
Anexo 1	72

Anexo 2
Anexo 3

73
74

Resumen

Las lipasas catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos para obtener ácidos grasos libres y glicerol. En ausencia de agua, estas enzimas catalizan reacciones de síntesis de ésteres partiendo de diversos sustratos. Esto ha sido aprovechado a nivel industrial para la síntesis de compuestos de química fina con alto valor agregado.

La lipasa de *Bacillus pumilus* (BpIA) ha sido clonada, expresada en *E. coli* y purificada en nuestro grupo. Esta enzima cuenta con sólo 181 aminoácidos y es homóloga a otras lipasas de igual tamaño producidas por otros miembros del género *Bacillus*. Entre los residuos que forman parte del sitio activo, existe una enorme identidad, lo que sugiere algún comprimido estructural con su función. En el presente trabajo se eligieron residuos, dentro del sitio activo, que pudieran tener implicaciones en la catálisis y unión de sustratos. Se seleccionaron, por inspección visual y por acoplamiento molecular *in silico* (*docking*), las posiciones Gly13, Asn18, Gly80 y Gly103. Se construyeron las mutantes Gly13:Lys, Asn18:Ser, Gly103:Ala, Gly13:Asp y Gly80:Ala; estas se sobre-expresaron y purificaron mediante cromatografía de afinidad. Se determinó su estabilidad y se calcularon los parámetros cinéticos, k_{cat} y K_m , mediante el análisis de curvas de progreso de reacción. Como sustratos usamos el 4-nitrofenil acetato, como éster modelo, y el benzil 4-nitrofenil carbonato, como modelo de sustrato promiscuo de las lipasas. Se encontró que las mutaciones efectivamente tienen efectos diversos sobre la estabilidad, la k_{cat} y K_m . Dichos efectos son incluso antagónicos si comparamos los resultados obtenidos con los dos sustratos ensayados. Un resultado sobresaliente es el incremento de 20 veces en la k_{cat} de la mutante Gly80:Ala para la hidrólisis del benzil 4-nitrofenil carbonato, con respecto a la enzima parental. Las mutantes BpIAr-G103A y BpIAr-G13D mejoraron también su k_{cat} para la hidrólisis del B-4NFC, con respecto a la BpIAr-6H.

Abreviaturas usadas

4-NF	4-nitrofenol
4-NFA	4-nitrofenil acetato
BCA	Ácido bicinconínico
B-4NFC	Benzil 4-nitrofenil carbonato
BplAr-6H	Lipasa A recombinante de <i>Bacillus pumilus</i>
BplAr-G13K	BplAr-6H con la mutación Gly por Lys en el residuo 13
BplAr-N18S	BplAr-6H con la mutación Asn por Ser en el residuo 18
BplAr-G103A	BplAr-6H con la mutación Gly por Ala en el residuo 103
BplAr-G13D	BplAr-6H con la mutación Gly por Asp en el residuo 13
BplAr-G80A	BplAr-6H con la mutación Gly por Ala en el residuo 80
BplAr-G28S	BplAr-6H con la mutación Gly por Ser en el residuo 28
DO ₆₀₀	Densidad Óptica determinada a 600 nm de longitud de onda
LB	Medio Luria Bertani
LBamp	Medio Luria Bertani con ampicilina (50 µg/ml)
NaCl	Cloruro de sodio
PEG	Polietilenglicol
pH _{opt}	Valor de pH óptimo
r.p.m.	Revoluciones por minuto
T _{opt}	Temperatura óptima
UV	Revelado con luz ultra violeta

Capítulo 1. Lipasas

1.1 Introducción

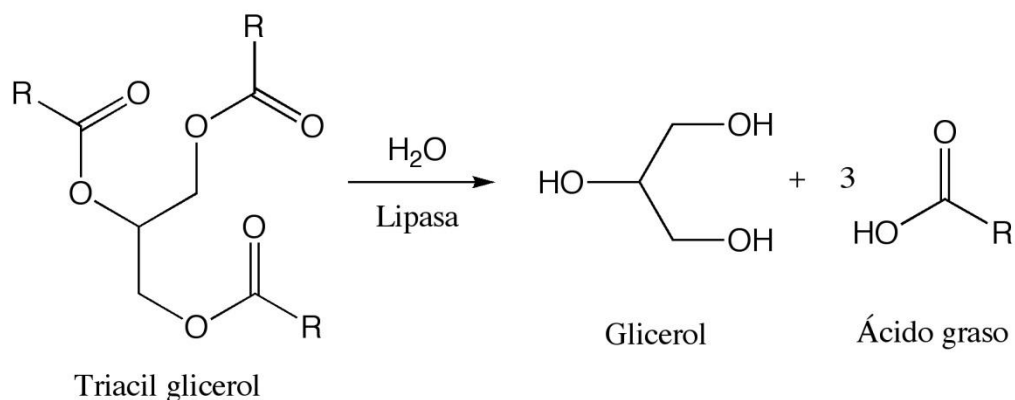
Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3.) constituyen a un grupo de enzimas con gran potencial biotecnológico. Catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster que se encuentran presentes en los triacilglicéridos, obteniendo como productos ácidos grasos libres y glicerol. En medios no acuosos las lipasas también pueden catalizar reacciones de esterificación, transesterificación o alcoholisis, interesterificación y acidólisis a partir de alcoholes, ésteres y ácidos grasos libres (Kumar y Gross, 2000) (Figura 1.1).

Los acilglicéridos están formados por uno, dos o tres ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol (mono, di y triacilglicéridos, respectivamente), y están, implicados en varias funciones biológicas: reserva energética, aislamiento, señalización intra e intercelular, etc. Estos compuestos pueden ser hidrolizados mediante la actividad de las lipasas que liberan un ácido graso cada vez (Cheetham, 1995).

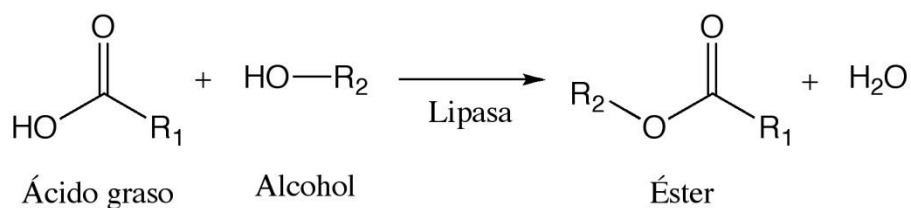
En muchos casos, la actividad lipolítica que presentan las lipasas depende del área que tenga la interfase lípido-agua por unidad de volumen. A esta relación se le llama “concentración de interfase” que sirve para determinar la concentración de sustrato disponible para la catálisis. La concentración de interfase refleja la acción de la enzima en ésta región y está estrechamente relacionada con que la lipasa requiera de permanecer en la fase acuosa para posteriormente adsorberse en la interfase y así interactuar con el sustrato.

La actividad lipolítica puede estar mediada por efectores, tales como iones de metales alcalinos o alcalinotérreos; en el caso de la lipasa pancreática porcina, se puede contar además con la presencia de las sales biliares y cofactores proteicos (O'Connor y Bailey, 1988).

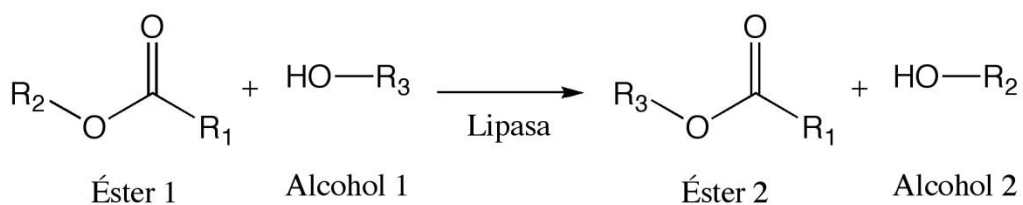
a) Hidrólisis (medio acuoso)



b) Síntesis (medio no acuoso)



c) Alcoholisis (medio no acuoso)



d) Transesterificación (medio no acuoso)

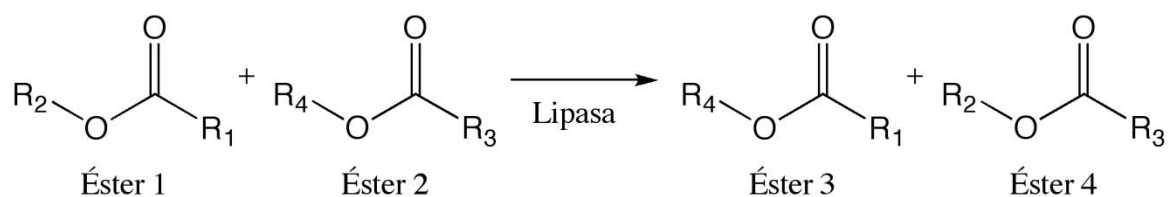


Figura 1.1 Reacciones de las lipasas. a) Hidrólisis de triglicéridos en medio acuoso
 b) Síntesis de ésteres a partir de un ácido graso y un alcohol en medio no acuoso;
 c) Reacción de alcoholisis de ésteres; d) Transesterificación en medio no acuoso.

Originalmente para definir a una enzima como “lipasa verdadera”, se necesitaba que se cumplieran dos condiciones:

- La presencia del fenómeno llamado “activación interfacial”, que es descrito como un incremento de la actividad lipolítica en presencia de una interfase lípido-agua (Sarda y Desnuelle, 1958).
- La presencia de una “tapa” cubriendo el sitio catalítico de la enzima (Brzozowsky y col., 1991; Derewenda y col., 1992; van Tilbeurgh, y col., 1993).

La activación interfacial y la presencia de una tapa que cubra al sitio activo suelen estar asociados, aunque se conocen varias lipasas que no cumplen con alguna o ambas propiedades. La tapa del sitio activo de las lipasas está constituida por un asa (Grochulski y col., 1994) ó por una y hasta dos hélices α (Brzozowsky y col., 1991; Derewenda y col., 1992; Kim y col., 1997; Schrag, y col., 1997). El motivo estructural que forma la tapa se mantiene en una configuración “abierta” en presencia de sustancias hidrófobas, exponiendo el sitio catalítico y una superficie importante de la proteína que también es hidrófoba. Se presume que ésta porción de la superficie de la proteína interactúa con la interfase lípido-agua.

Actualmente se sabe que la presencia de una tapa en la estructura de las lipasas no necesariamente está relacionada con el fenómeno de activación interfacial (Verger, 1997). Las lipasas actúan en la interfase agua-lípido, a diferencia de las esterasas que hidrolizan el mismo tipo de enlace químico pero que requieren que el sustrato sea soluble en fase acuosa (Derewenda y Sharp, 1993). Estudios de la especificidad de sustrato y comportamiento cinético de algunas carboxilesterasas de diferente origen, tamaño y estructura, permiten discriminar entre esterasas (carboxilesterasas no lipolíticas) y lipasas (carboxilesterasas lipolíticas). En resumen, los compuestos insolubles en agua y ésteres de cadena larga son hidrolizados por lipasas, no así por esterasas.

1.2 Clasificación de lipasas bacterianas

Existe una clasificación, un poco antigua, específica para las enzimas lipolíticas de origen microbiano. Esta clasificación se fundamenta en la comparación de las

secuencias de aminoácidos y de algunas propiedades biológicas fundamentales (Tabla 1.1) (Arpigny y Jaeger, 1999). La versión original de ésta clasificación comprende el análisis de 53 enzimas que se encuentran distribuidas en 8 familias.

Familia I: Comprende a 22 miembros que están agrupados en 6 subfamilias:

- Subfamilia I.1; Lipasas cuyo peso molecular aproximado es de 30 a 32 kDa. Estas lipasas son secretadas por la vía tipo II (requieren de un transportador externo).
- Subfamilia I.2; Estas lipasas presentan un peso molecular aproximado de 33 kDa como consecuencia de la inserción de una secuencia de aminoácidos que forma una doble hoja β -antiparalela en la superficie de la proteína.
- Subfamilia I.3; Las lipasas de esta subfamilia se caracterizan por poseer un peso molecular mayor al de las subfamilias I.1 y I.2, (*Pseudomonas fluorescens*, 50 kDa; *Serratia marcescens*, 65 kDa). Además carecen de un péptido señal y de residuos de cisteína. La secreción de este tipo de enzimas ocurre en un solo paso a través de la vía tipo I.
- Subfamilia I.4; Aquí se localizan algunas lipasas del género *Bacillus*. Tienen en común que en el pentapéptido consenso, el primer residuo de Gly es remplazado por un residuo de Ala (Ala-X₁-Ser-X₂-Gly). Con un peso molecular aproximado de 20 kDa son las lipasas más pequeñas conocidas hasta el momento. Comparten poca similitud en su secuencia de aminoácidos respecto a las otras lipasas de la familia I (14 a 16 %). La lipasa de *Bacillus pumilus*, se encuentra clasificada al interior de ésta subfamilia.
- Subfamilia I.5; En esta subfamilia se encuentran clasificadas algunas lipasas del género *Bacillus* y del género *Staphylococcus*. *Bacillus thermocatenulatus* y *Bacillus stearothermophilus* producen lipasas con características similares, la masa molecular de estas enzimas se aproxima a 45 kDa y muestran actividad máxima a un valor de pH 9.0 y

temperatura de 65°C. Por otro lado, con una masa molecular aproximada a 75 kDa, las lipasas de *Staphylococcus* presentan gran similitud entre sus secuencias de aminoácidos. Resulta interesante que la lipasa de *Staphylococcus hyicus* es la única que presenta una actividad de fosfolipasa.

- Subfamilia 1.6; Estas enzimas presentan una identidad del 39% respecto a otras familias y una similitud aproximada al 50% al interior de esta subfamilia. La región central de estas lipasas es idéntica hasta en un 50%, a la que poseen la lipasas de *Bacillus subtilis* y a las encontradas en la subfamilia I.2.

- Familia II (GDSL): Las enzimas que constituyen a esta familia no presentan el pentapéptido consenso Gly-X₁-Ser-X₂-Gly, en su lugar presentan una secuencia Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS (L)], motivo que contiene el residuo de serina perteneciente al sitio catalítico. En estas enzimas, el residuo catalítico está mucho más cerca del N-terminal que en otras enzimas lipolíticas.

- Familia III: Las enzimas de esta familia exhiben el plegamiento canónico de α/β hidrolasa y contienen una triada catalítica típica.

- Familia IV (HSL): Está integrada por lipasas bacterianas que presentan una alta similitud en su secuencia de aminoácidos respecto a la lipasa sensible a hormonas que se encuentra presente en los mamíferos. Las lipasas de ésta familia poseen una elevada actividad relativa a temperaturas menores de 15°C.

- Familia V: Son enzimas que proceden de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*), psicrófilas (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Estas proteínas comparten una

similitud de secuencia significativa (20 a 25%) con enzimas no lipolíticas como epóxido hidrolasas, deshalogenasas y haloperoxidasas, las cuales poseen la típica estructura α/β hidrolasa así como una triada catalítica similar a la de las enzimas hidrolíticas.

- Familia VI: Las enzimas de esta familia son las esterasas más pequeñas que se conocen actualmente, poseen una masa molecular aproximada de 23 a 26 kDa. La forma activa de estas enzimas es un dímero y poseen en cada subunidad la clásica conformación α/β hidrolasa y una triada catalítica clásica. También exhiben una similitud en la secuencia de aminoácidos cercana al 40% con las lisofosfolipasas eucarióticas (fosfolipasas A_2 independientes de Ca^{2+}).
- Familia VII: Se agrupan esterasas bacterianas con un peso molecular aproximado a 55 kDa. Comparten un 40% de similitud y un 30% de identidad en la secuencia de aminoácidos con acetilcolina esterasas eucarióticas y carboxilesterasas de hígado e intestino. Se encontró que la esterasa de *Bacillus subtilis* hidroliza de manera muy eficiente ésteres *p*-nitrobencilo, este grupo de moléculas son empleadas como grupos protectores en la síntesis de antibióticos β -lactámicos.
- Familia VIII: Está constituida por enzimas de aproximadamente 380 residuos y presentan una considerable similitud con varias β -lactamasas clase C. El sitio activo de estas esterasas involucra un motivo conservado de Ser-X1-X2-Lys en la parte N-terminal. Sin embargo se ha sugerido que en el sitio activo se presenta una secuencia Gly-X1-X2-Gly, por lo que es necesaria más información estructural para describir claramente el mecanismo catalítico de esta familia de esterasas.

Tabla 1.1. Familias de enzimas lipolíticas de origen microbiano.

Familia	Subfamilia	Cepa productora	No. de acceso	Similitud (%)		Propiedades
				Familia	Subfamilia	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	D50587	100		Lipasas verdaderas
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39		
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		
	2	<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354	35	100	Lipasas verdaderas
		<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35	100	
		<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33	78	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77	
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D11455	14	100	Lipasas verdaderas
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51	
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	100	Lipasas verdaderas
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80	
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100	Lipasas verdaderas Fosfolipasa Lipasas verdaderas
		<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	X95309	14	94	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	29	
<i>Staphylococcus aureus</i>		M12715	14	28		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		AF090142	13	26		
6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100	Lipasas verdaderas	
	<i>Streptoimycetes cinnamomeus</i>	U80063	14	50		
II (GD _{SL}) α	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100		Aciltransferasa ^a	
	<i>Streptomyces scabies</i> *	M57297	36		Esterasa ^a	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35		Esterasa ^b	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		Esterasa ^b	
	<i>Photorhabdus luminescens</i>	X66379	28		Esterasa ^a	
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i> *	M86351	100		Lipasa extracel.	
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		Lipasa extracel.	
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33		Esterasa extracel.	
IV (HSL) β	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Esterasa	
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54		Lipasa	
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE00095	48		Carboxilesterasa	
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		Lipasa putativa	
	<i>Escherichia coli</i>	AE00013	36		Carboxilesterasa	
	<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25		Esterasa extracel. 2	
V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		PHA-despolim. ^c	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Esterasa putativa	
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Esterasa extracel.	
	<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34		Esterasa extracel.	
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		Esterasa	
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		Esterasa	
VI	<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	100		Carboxilesterasas	
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50			
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	S79600	24			
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20			
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16			
VII	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		Carbamato hidrolasa	
	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		p-nitrobenzil esterasa	
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		Carboxilesterasa	
VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492	100		Esterasas	
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43			
	<i>Pseudomanas fluorescens</i>	AAC60471	40			

^asecretada; ^bunida a membrana externa; ^cpolihidroxialcanoato; ^dmotivo [Gly-Asp-Ser-(Leu)]; ^elipasa sensible a hormonas; *enzimas lipolíticas con estructura tridimensional conocida.

1.3 Estructura

El patrón común de plegamiento de todas las lipasas es una estructura α/β hidrolasa (Ollis y col., 1992), que consiste en una hoja β central que típicamente cuenta con 8 hebras paralelas, excepto la segunda que es antiparalela. Las secciones β_3 a β_8 están conectadas por hélices α que se encuentran unidas a cada lado de la hoja β central. Con base a estudios por cristalografía de rayos X, se sabe que el sitio catalítico se localiza en el carboxilo terminal de la hoja β central. Los tres residuos de aminoácidos que lo constituyen conservan de forma invariable el siguiente orden: un residuo nucleófilo (Ser, Cys o Asp), un residuo ácido (Asp o Glu) y un residuo de histidina (Figura 1.2).

En las familias de las lipasas bacterianas con estructura conocida, se ha encontrado el mismo patrón de plegamiento, con algunas diferencias características de cada familia en cuanto a la longitud y arquitectura de la cadena polipeptídica (Jaeger y Reetz, 1998).

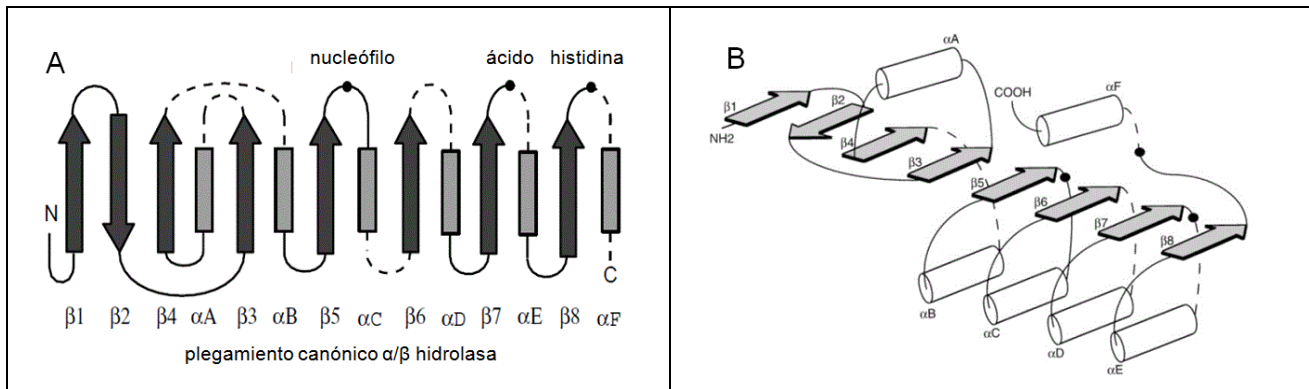


Figura 1.2. Patrón de plegamiento de las lipasas. A) Plegamiento canónico α/β hidrolasa; B) Topología de estructura secundaria. La posición de los residuos catalíticos se presenta con círculos sólidos. La línea punteada indica que se trata de asas con longitud variable.

En las lipasas bacterianas el nucleófilo es el residuo de serina que se encuentra localizado al interior de un pentapéptido altamente conservado (Gly-X₁-Ser-X₂-Gly), de manera que forma parte una hebra β seguida de un giro rígido que contiene al residuo de serina y, a continuación, una hélice α . A este arreglo se le conoce como β - ϵ Ser- α (Derewenda y Sharp, 1993). De esta forma el nucleófilo se acomoda en la superficie del sitio activo, esto permite el acceso del residuo de histidina por un costado y la entrada del sustrato por el lado opuesto. El segundo residuo catalítico (Asp) se encuentra localizado en el asa que conecta la hebra β 7 con la hélice α E; por último, el tercer residuo catalítico que es la histidina está ubicado en un asa que sigue a la hebra β 8 de la hoja central (Figura 1.2).

1.4 Aplicaciones industriales

Las lipasas constituyen un grupo importante para la biotecnología debido a la versatilidad en sus propiedades así como su facilidad de producción en masa, son algunas de las causas que las hacen atractivas para aplicaciones industriales.

Son utilizadas principalmente como catalizadores biológicos ya que actúan en condiciones de reacción suaves, son altamente estables en solventes orgánicos, pueden usar una enorme variedad de sustratos y, a pesar de ello, usualmente muestran gran regio- y/o estéreo-selectividad.

La función fisiológica de las lipasas es hidrolizar los enlaces éster carboxílicos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. También pueden catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos. Esta variedad de funciones hace a las lipasas, enzimas con aplicaciones potenciales en las industrias de alimentos, detergentes, farmacéuticos, agroquímicos, pieles, textiles, cosméticos, biodiesel y papel. Además pueden usarse como biosensores y en procesos de bioremediación (Tabla 1.2) (Hasan y col., 2006).

Tabla 1.2. Aplicaciones industriales de las lipasas.

Industria	Aplicación
De las grasas y oleoquímica	Producción de sustitutos de grasa de cacao, mantequilla, margarinas. Producción de biodiesel.
De los polímeros	Elaboración de poliésteres aromáticos, poliésteres biodegradables y aditivos para combustibles Disminución de la viscosidad biodiesel
Textil	Remoción de algunos lubricantes incorporados a las telas Mejora de los procesos de deslavado de la mezclilla Modificación enzimática de fibras sintéticas.
De los detergentes	Adición en detergentes para facilitar la remoción de manchas.
Farmacéutica y Médica	Sintetiza lovastatina (fármaco que ayuda a disminuir el nivel de colesterol sérico). Activadores del factor de necrosis tumoral (ayuda tratamiento de tumores malignos). Biosensores.
Alimentos	Aditivos para modificar o generar compuestos que imparten el sabor y aroma (síntesis de ésteres a partir de ácidos grasos de cadena corta y alcoholes).
Papel y celulosa	Adición de lipasas mejora el rendimiento y blancura del papel, reduce los residuos contaminantes.
Cosméticos	Fabricación de ingredientes emolientes en cuidado personal (isopropil miristato, isopropil palmitato, 2-etilhexil palmitato).

1.5 Lipasas del género *Bacillus*

Existen dos grupos de lipasas del género *Bacillus*; las lipasas de alto peso molecular de la subfamilia I.5 y las lipasas de menor peso molecular agrupadas en la subfamilia I.4. En las lipasas de este último grupo, la secuencia característica Gly-X₁-Ser-X₂-Gly del pentapéptido que contiene al residuo catalítico de serina se modifica a una secuencia de Ala-X₁-Ser-X₂-Gly. Además, las secuencias alrededor de los sitios catalíticos Asp e His son por completo diferentes en comparación con las presentes en las otras familias (Jaeger y col., 1999).

Las lipasas de la subfamilia I.4 son las lipasas más pequeñas conocidas con un peso molecular de 19 a 20 kDa. Hasta el año 1999, sólo tres enzimas estaban clasificadas en esta subfamilia; dos lipasas de *Bacillus subtilis* (BslA y BslB) y una lipasa de *Bacillus pumilus* (BplA) que comparte un 74% de identidad de secuencia con respecto a la BslA de *B. subtilis*.

La BplA es homóloga a la BslA, ya que ambas comparten una identidad de secuencia cercana al 75%. Esta enorme identidad permite comparar ambas lipasas en cuanto a estructura y propiedades catalíticas. Además nos permite suponer que comparten el mismo plegamiento y que las diferencias en estabilidad y propiedades catalíticas se deben a la situación estructural y dinámica de las cadenas laterales de los residuos diferentes entre sus secuencias.

Dentro de las lipasas del género *Bacillus* pertenecientes a la subfamilia I.4, la BslA es la más estudiada. Se han desarrollado estudios muy completos de la estructura del gen, mecanismo de secreción, caracterización bioquímica de la proteína y aplicaciones biotecnológicas (Dartois y col., 1992; Lesuisse y col., 1993; Dartois y col., 1994; Detry y col., 2006). Además, es la única enzima de la subfamilia I.4 de la que se ha descrito su cristalización y se ha dilucidado su estructura tridimensional (van Pouderooyen y col., 2001; Kawasaki y col., 2002). De hecho existen variedades de esta enzima generadas por evolución dirigida que exhiben una gran termoestabilidad (Acharya y col., 2004; Kamal y col., 2011; Augustyniak y col., 2012).

Capítulo 2. Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

2.1 *Bacillus pumilus* GMA1

El *Bacillus pumilus* GMA1 (Figura 2.1) es un microorganismo aislado en sedimentos de las aguas termales de Los Azufres, Michoacán, México. Esta cepa produce una lipasa que presenta preferencia por los ácidos grasos de cadena corta como sustrato (Bustos, 1995).

La actividad catalítica de esta enzima ha sido caracterizada frente a distintas condiciones fisicoquímicas, encontrándose valores óptimos de temperatura y pH interesantes para su uso en aplicaciones industriales (Wong, 2001; Alcántara, 2009).

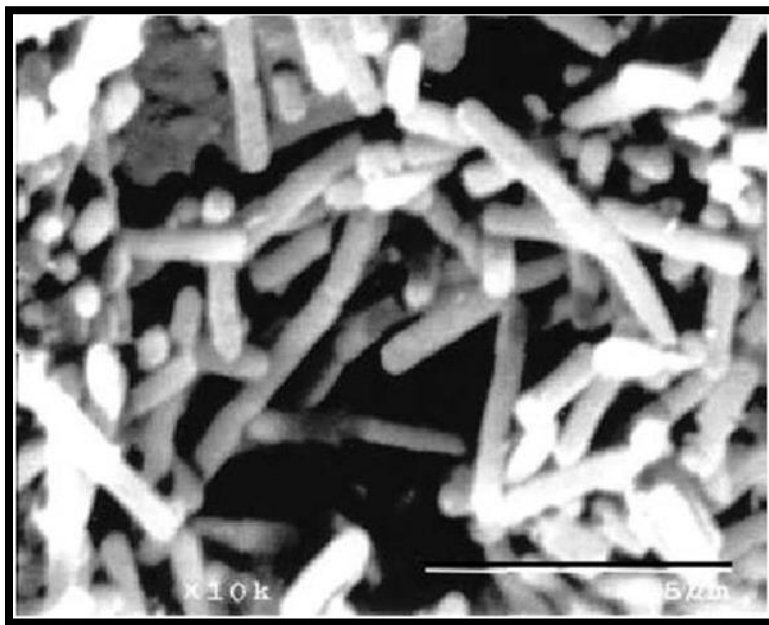


Figura 2.1. *Bacillus pumilus* GMA1 a 10,000x. La línea de escala representa 5 µm (Wong, 2001).

2.2 Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

Como se mencionó anteriormente, la BpIA es homóloga a la BslA (Bustos, 1998). Ambas lipasas en su forma madura poseen 181 residuos de aminoácidos y tienen un peso aproximado de 19.5 kDa. A partir de los datos cristalográficos de la BslA (van Pouderoyen y col., 2001) se ha modelado la estructura de BpIA tomando en cuenta la alta identidad de secuencia por ambas proteínas (Alcántara, 2009) (Figura 2.2).

La estructura modelada presenta una molécula globular con un plegamiento clásico α/β hidrolasa con 6 hebras β paralelas flanqueadas por 5 hélices α . La triada catalítica está constituida por los residuos de Ser77, Asp133 e His156. Los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 forman la cavidad oxianiónica y están en posiciones muy similares a las encontradas en otras lipasas cuya estructura es conocida. El dominio correspondiente a la tapa del sitio activo no se encuentra presente, por lo que los residuos catalíticos se encuentran expuestos al disolvente.

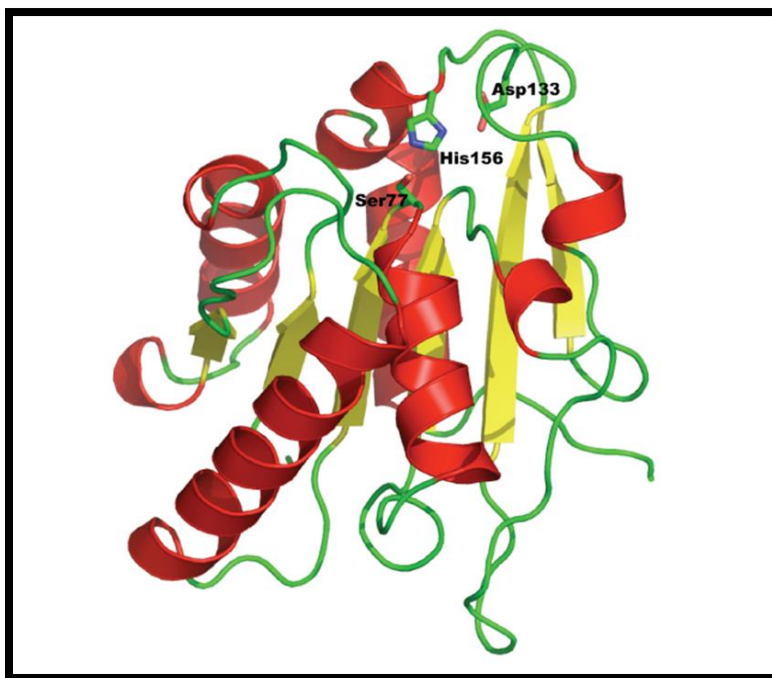


Figura 2.1. Modelo estructural de BpIA. Se resaltan los residuos catalíticos Ser77, Asp 133 e His 156 (Alcántara, 2009).

2.3 Propiedades bioquímicas

Se ha caracterizado la actividad catalítica de la BpIA en extractos parcialmente purificados. Esta caracterización se llevó a cabo estudiando la reacción de hidrólisis de una emulsión de tributirina a distintos valores de pH y temperatura. Los resultados obtenidos de este estudio muestran que los valores de temperatura y pH óptimos (T_{opt} y pH_{opt}) son 50°C y 10, respectivamente (Wong, 2001). También se sabe que esta lipasa presenta preferencia por sustratos cuyos ácidos grasos son de cadena corta (Bustos, 1998).

En la actualidad varias enzimas lipolíticas de la familia I.4 se han identificado, purificado y caracterizado. Entre éstas se encuentran lipasas y esterases de microorganismos mesófilos ó termófilos. En la tabla 2.1 se presentan las propiedades bioquímicas de algunas de estas enzimas en donde se pueden ver algunas diferencias importantes entre ellas.

Tabla 2.1. Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por microorganismos del género *Bacillus*.

Microorganismo de procedencia	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	Peso molecular (kDa)	Referencia
<i>B. pumilus</i> DSM5776	9.5	30	19.3	(Möller y col., 1991)
<i>B. pumilus</i> B26	8.5	35	19.2	(Kim y col., 2002)
<i>B. subtilis</i> 168, Lip A	10.0	37	19.3	(Lesuisse y col., 1993)
<i>B. pumilus</i> GMA1*	10.5	50	19.5	(Bustos, 1998; Wong, 2001)
<i>B. licheniformis</i>	10.0-11.5	50-60	19.2	(Nthangeni y col., 2001)
<i>Bacillus</i> sp. THL027	6.4	60	22.0	(Dharmsthiti y Luchai, 1999)

*valores obtenidos a partir de extractos parcialmente purificados de *B. pumilus* GMA1.

Dentro del grupo destacan las lipasas de *B. licheniformis* y *B. pumilus* GMA1 como las enzimas con actividad a valores de temperatura más elevados. Los valores de T_{opt} para este par de enzimas oscilan entre 50 y 60°C. En un análisis de la secuencia de estas dos enzimas se destaca un aminoácido en común (Gly28) que no se encuentra presente en el resto de las lipasas cuya T_{opt} es inferior, en cuyo caso aparece un residuo de Ser. Esto sugería que la mutación Gly28:Ser tendría repercusiones negativas en la termoactividad de la enzima. Se clonó la enzima silvestre en un vector de expresión y se le adicionó una etiqueta de His (BpIA-6H) en el C-terminal. Sobre esta construcción se realizó la mutación Gly28:Ser (BpIA-6H-G28S). Ambos genes se expresaron en *E. coli*, las proteínas se purificaron y se estudiaron sus propiedades catalíticas (Mora, 2008; Bustos-Jaimes y col., 2010).

2.3.1 Parámetros cinéticos y estabilidad térmica de BpIAr-6H y BpIAr-6H-G28S

La estabilidad térmica y los parámetros cinéticos de la lipasa recombinante de *B. pumilus* GMA1 (BpIAr-6H) y de algunas mutantes Mora (2008) estudió. En la tabla 2.2 se presentan algunos de los resultados obtenidos. El resultado de esta caracterización indicó que esta mutación aumenta la vida media de la enzima a 20°C, mientras que al aumentar la temperatura hasta 35°C, su estabilidad ($t_{1/2}$) es marginalmente mejor para la mutante que para la enzima silvestre. La k_{cat} de la enzima no cambia con la temperatura, mientras que la K_m disminuye dramáticamente al aumentar la temperatura, provocando un aumento en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de ambas enzimas al aumentar la temperatura. Esta eficiencia catalítica es mejor para la mutante, entre 2 y 3 veces, dependiendo de la temperatura. Sin embargo este experimento con la enzima recombinante no se pudo hacer a 50°C debido a que la vida media de la enzima es de pocos minutos. Esto hace suponer que es posible que la enzima descrita originalmente en

extractos crudos no sea la única causa de las propiedades lipolíticas observadas, esto es que hubiese otra u otras enzimas lipolíticas en el medio.

Tabla 2.2. Parámetros cinéticos y termoestabilidad de las lipasas BplAr-6H y BplAr-6H-G28S (Mora, 2008).

Enzima	Temperatura (°C)	K_m (μM)	k_{cat} (min ⁻¹)	$k_{cat}/K_m \times 10^2$ (μM ⁻¹ min ⁻¹)	$k_{ie} \times 10^5$ (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
BplAr-6H	20	726.48	86.28	11.88	0.76	9120.4
	25	400.67	51.10	12.75	61.74	112.3
	30	245.28	44.50	18.14	152.50	45.5
	35	97.56	45.51	46.65	291.40	23.8
	40	108.46	66.28	61.11	898.10	7.7
BplAr-6H-G28S	20	101.18	247.16	24.69	0.30	23104.9
	25	662.27	229.14	34.60	2.44	2840.8
	30	383.41	208.42	54.36	112.20	61.8
	35	250.30	228.13	91.14	169.10	41.0
	40	195.24	259.20	132.76	1198.0	5.8

*valores obtenidos a pH 7.5 y en presencia de Tritón X-100 (1% v/v), usando 4-Nitrofenil acetato como sustrato.

Capítulo 3. Mecanismo catalítico

3.1 Mecanismo catalítico

Las lipasas poseen la capacidad de catalizar reacciones de hidrólisis sobre los enlaces éster presentes en los acilgliceroles. En sistemas acuosos, cuando la hidrólisis del sustrato ocurre por completo se liberan ácidos grasos y glicerol como productos. Sin embargo, cuando el medio de reacción es de carácter orgánico las reacciones que se favorecen son las de esterificación, alcoholisis, aminólisis o tiólisis (Kumar y Gross, 2000).

El mecanismo químico que describe la reacción de hidrólisis de lípidos por la acción de las lipasas ya está establecido (Jaeger y Reetz, 1998; Jaeger y col., 1999). El primer paso que ocurre para la hidrólisis del sustrato es el ataque nucleofílico al carbono carbonílico que se encuentra formando el enlace éster, dicho ataque ocurre por parte del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo que está presente en el residuo de serina; este paso induce la formación de un intermediario tetraédrico que se caracteriza por poseer una carga negativa en el átomo de oxígeno y por estar estabilizado mediante interacciones con un macrodipolo generado por la hélice α C y por puentes de hidrógeno establecidos con un par de grupos NH (amida del enlace peptídico). Dicho intermediario es un oxianión y a la configuración estructural que adoptan los grupos que estabilizan al oxianión se le conoce como “cavidad oxianiónica”. Uno de los grupos NH con los que se establecen los puentes de hidrógeno proviene de un residuo que está localizado por detrás de la serina nucleofílica, el otro residuo que estabiliza al intermediario mediante un grupo NH está colocado en la porción final de la hoja β 3.

El ataque nucleofílico por parte de la serina es favorecido por la participación del residuo de histidina; ésta participación consiste en recibir el protón proveniente del grupo hidroxilo presente en la serina; dicha transferencia es facilitada por la

presencia de un ácido que orienta el anillo de imidazol de la histidina y neutraliza de manera parcial la carga recién generada en él, a continuación, este protón es cedido al oxígeno del enlace éster para formar un alcohol. En este punto del mecanismo, el componente ácido del sustrato es esterificado por la serina nucleofílica (intermediario que está unido covalentemente), mientras que el alcohol es liberado. La reacción continúa con un paso de desacilación, en el cual una molécula de agua participa hidrolizando al intermediario covalente; la histidina catalítica activa a esta molécula de agua quitándole un protón, el ión OH^- resultante ataca al carbono carbonílico del grupo acilo que se encuentra unido covalentemente a la serina. Posteriormente, la histidina cede un protón al oxígeno del residuo activo de serina; de esta forma, es liberado el componente acilo para formar un ácido carboxílico. Después de la difusión de éste ácido carboxílico, la enzima se encuentra disponible para un nuevo ciclo catalítico (Figura 3.1).

En la Tabla 2.2 queda claro que la mutación Gly28 por Ser aumentó significativamente la k_{cat} de la enzima. La posición 28 está localizada en un sitio lejano al sitio activo, lo que sugiere que cualquiera que sea su efecto, tiene que ser provocado por interacciones a larga distancia. Existen varios ejemplos de estas mutaciones con efecto a larga distancia (Boersma y col., 2008). En contraste, existen ejemplos de mutaciones en la vecindad del sitio activo de la BslA que modifican significativamente la estabilidad térmica así como la actividad específica de esta enzima (Akbulut y col., 2013) y en otros casos la enantioselectividad (Funke y col., 2005; Dröge y col., 2006; Boersma y col., 2008). En este trabajo decidimos hacer un análisis funcional del sitio activo de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 para probar el papel de distintos aminoácidos localizados en la vecindad del sitio activo sobre las propiedades catalíticas de esta enzima. Para ello analizamos el sitio activo y seleccionamos posiciones que potencialmente pudieran alterar la velocidad de catálisis. Construimos mutantes de dichas posiciones y analizamos su estabilidad y propiedades catalíticas para la hidrólisis de 4-nitrofenil acetato y benzil 4-nitrofenil carbonato, dos compuestos que se comportan muy distinto como sustratos de la enzima debido a sus propiedades estructurales y naturaleza química.

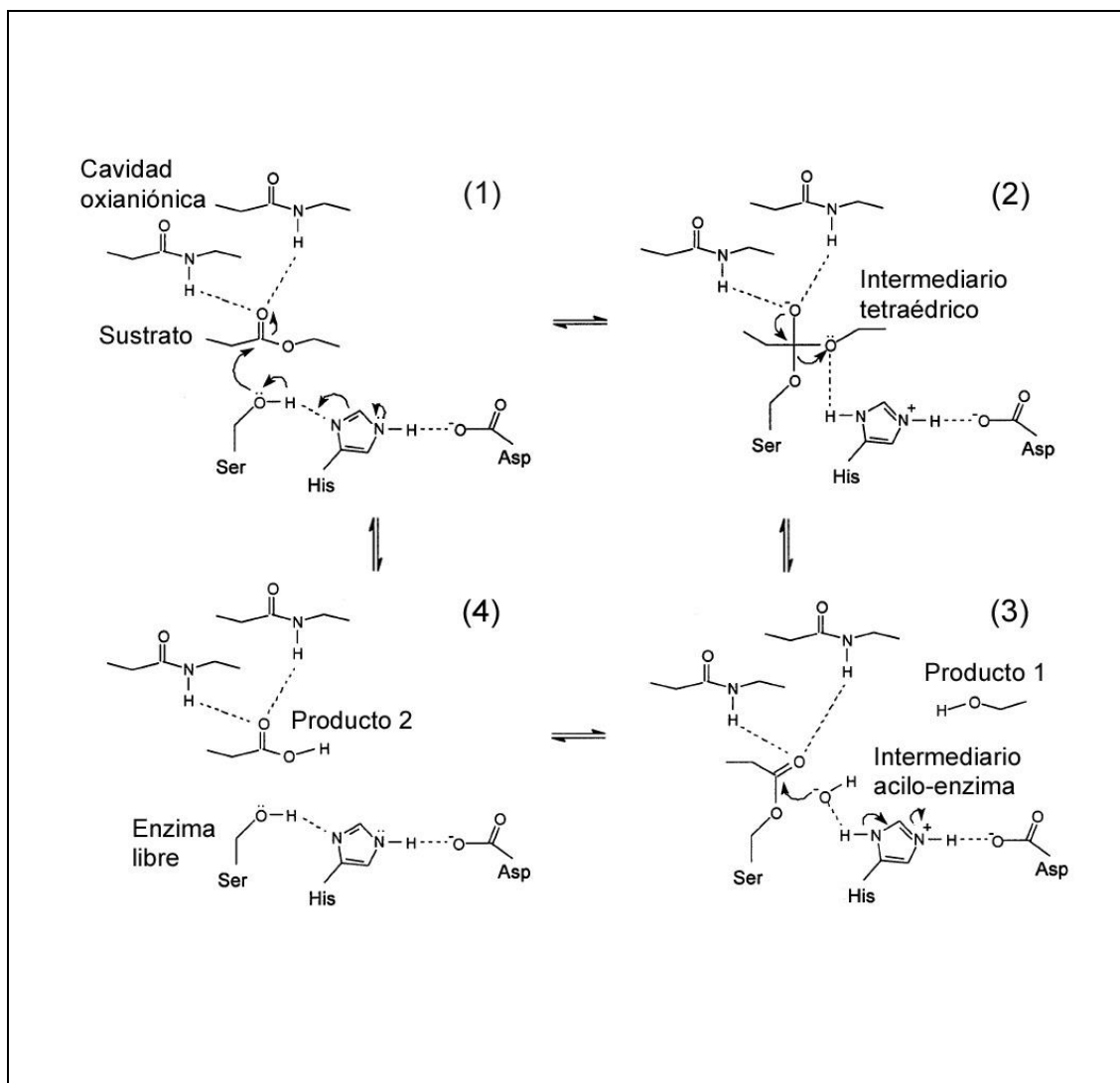


Figura 3.1 Mecanismo de reacción de las lipasas. 1) Activación del residuo nucleófilo de serina y ataque nucleofílico al carbono carbonilo del enlace éster. 2) Formación del intermediario tetraédrico, reorganización electrónica previa a la liberación del motivo alcohólico del éster y formación del intermediario covalente ("acil-enzima"). 3) La molécula de agua entrante es activada por el residuo de histidina que se encuentra próximo, el ión hidroxilo resultante ataca al átomo de carbono carbonilo del intermediario covalente ocurriendo así la liberación del alcohol (producto 1). 4) El residuo de histidina dona un protón al átomo de oxígeno del residuo activo de serina, el enlace éster entre la serina y el componente acilo se rompe para liberar al componente acilo (producto 2) y para que la enzima se encuentre disponible para un nuevo ciclo catalítico.

Capítulo 4. Objetivos

3.1 Objetivo general

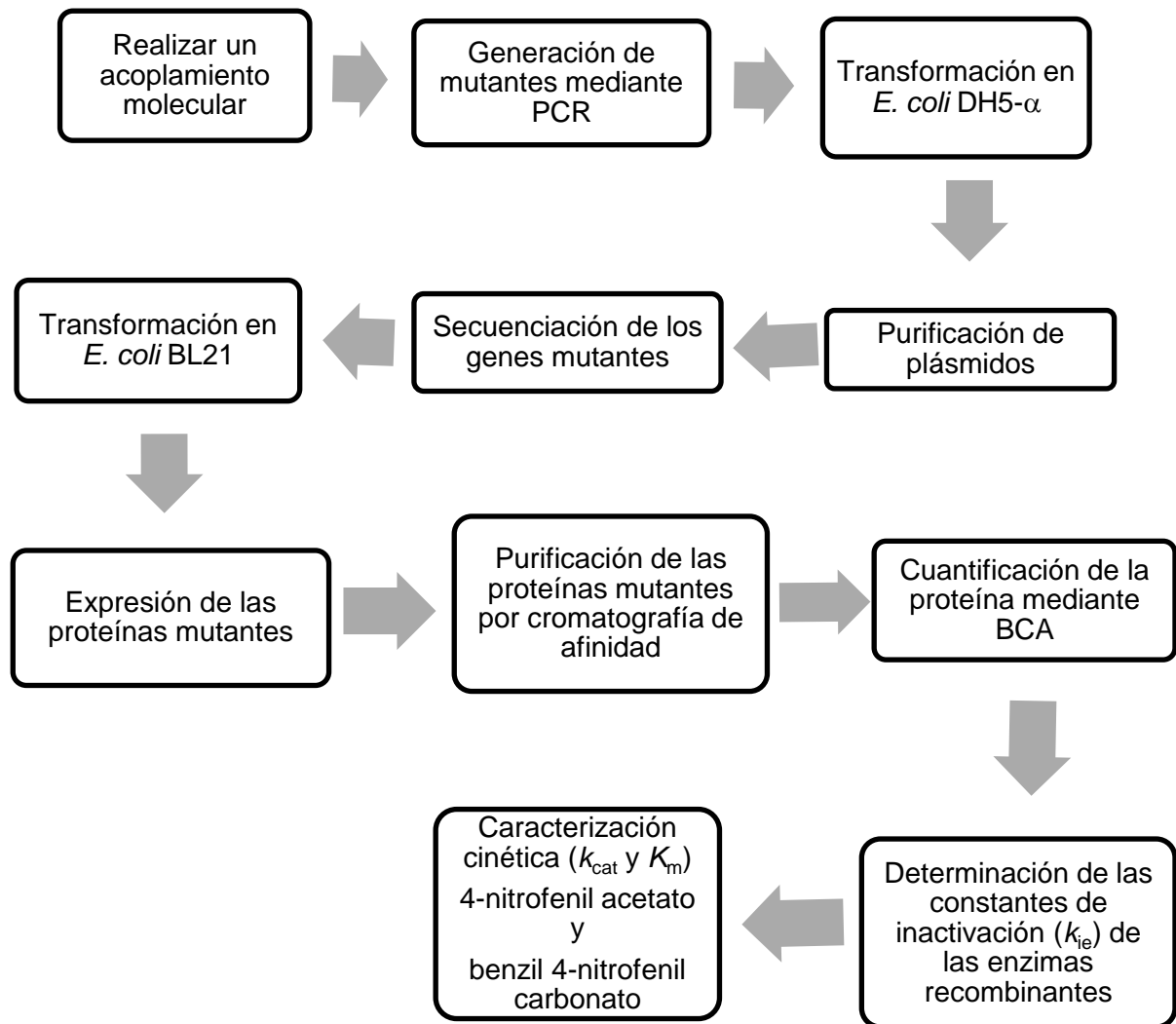
- Estudiar el efecto cinético de mutaciones seleccionadas en la vecindad del sitio activo de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1.

3.2 Objetivos particulares

- Seleccionar los sitios de mutación por inspección y acoplamiento molecular *in silico* (docking).
- Construir las mutantes seleccionadas de BplAr.
- Expresar y purificar las proteínas recombinantes propuestas.
- Determinar constantes de inactivación térmica (k_{ie}) como parámetro de estabilidad.
- Caracterizar los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m , de las enzimas recombinantes purificadas, con los sustratos 4-nitrofenil acetato y benzil 4-nitrofenil carbonato.

Capítulo 5. Materiales y Métodos

5.1 Esquema general de trabajo



5.2 Materiales

5.2.1 Reactivos

Reactivo	Marca
Acetato de etilo	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial	Sigma
Ácido bicinconínico (BCA)	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	Sigma
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Sigma
Agar LB (Luria Bertani)	Difco
Agarosa	Gibco BRL
Albúmina bovina	Sigma
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Azul brillante	Sigma
Benzil 4-nitrofenil carbonato	Aldrich
Bromuro de etidio	Gibco BRL
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma
Desoxirribonucleótidos (dNTP`s)	New England Biolabs
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	Sigma
Etanol	Sigma
Enzimas de restricción (<i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> , <i>DpnI</i>)	New England Biolabs
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Sigma
Glicerol	Gibco BRL
Hexano	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio (NaOH)	Sigma
Imidazol	Fluka
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	Sigma
Medio LB (Luria-Bertani)	Sigma
Metanol	Química Delta
Membrana para diálisis	Sigma
Poli-etilenglicol	Fluka
Resina para cromatografía de afinidad	Protino™ Ni-TED
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	Sigma-Aldrich

Reactivo	Marca
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
4-nitrofenil acetato (4-NFA)	Sigma-Aldrich
4-nitrofenol (4-NF)	Fluka
Sulfato de níquel (NiSO ₄)	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma
Tritón X-100	Sigma

5.2.2 Instrumentos y equipos

Instrumento o equipo	Marca
Balanza analítica BP2215	Sartorius
Cámara de electroforesis	Bio Rad
Centrífuga preparativa refrigerada RC-5B	Sorvall
Centrífuga universal 30RF	Hettich
Columna capilar (30 m x 0.25 mm x 0.12 µm)	Astec CHIRALDEX™ B-DM
Electropolador Micro Pulser II (Bio RAD)	Bio RAD
Espectrofotómetro DU 7500	Beckman Coulter
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Incubadora orbital	Lab-Line Instruments Inc.
Microcentrífuga refrigerada 5417R	Eppendorf
Micro pipetas (10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Eppendorf / Gilson
Potenciómetro 713	Brinkmann/Metrohm
Sonicador CV26	Cole Parmer
Termociclador PTC-200	MJ-Research
Termomixer confort	Eppendorf
Trans-iluminador UV	
Vortex	

5.2.3 Material de Biología molecular

Material	Marca
QIAprep® Spin, Miniprep kit	QIAGEN

5.2.4 Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ mb ⁻) gal dcm (λclts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ f80dlacZDM15D(lacZYAargF) U169 endA1 recA1 hsdR17(rK-mK+) DeoR thi-1 supE44 l-gyrA96 relA1

5.2.5 Enzimas utilizadas

Enzima	Nombre / Fuente
BplAr-6H	Lipasa A recombinante de <i>Bacillus pumilus</i>
BplAr-N18S	BplAr-6H con mutación Asn18:Ser
BplAr-G13K	BplAr-6H con mutación Gly13:Lys
BplAr-G103A	BplAr-6H con mutación Gly103:Ala
BplAr-G13D	BplAr-6H con mutación Gly13:Asp
BplAr-G80A	BplAr-6H con mutación Gly80:Ala

5.2.6 Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Fuente
pET22b+ (pET <i>bpl</i>)	ColE1 PT7/lac Ampr. Vector para expresión de genes dirigida por la ARN polimerasa del fago T7. Se obtiene una proteína de fusión con 6 histidinas en C-terminal.	Novagen

5.2.7 Plásmidos contruidos

Plásmido	Cepa hospedera	Características
pET <i>bpl</i> _N18S	DH5α y BL21	Derivado de pET <i>bpl</i> con la mutante Asn18:Ser en el gen <i>bplA</i> .
pET <i>bpl</i> _G13K	DH5α y BL21	Derivado de pET <i>bpl</i> con la mutante Gly13:Lys en el gen <i>bplA</i> .
pET <i>bpl</i> _G103A	DH5α y BL21	Derivado de pET <i>bpl</i> con la mutante Gly103:Ala en el gen <i>bplA</i> .
pET <i>bpl</i> _G13D	DH5α y BL21	Derivado de pET <i>bpl</i> con la mutante Gly13:Asp en el gen <i>bplA</i> .
pET <i>bpl</i> _G80A	DH5α y BL21	Derivado de pET <i>bpl</i> con la mutante Gly80:Ala en el gen <i>bplA</i> .

5.3 Métodos

5.3.1 Acoplamiento molecular *in silico* (Docking)

En el presente trabajo se utilizó la lipasa recombinante BplAr-6H en la cual se realizaron mutaciones cerca del sitio activo para observar los cambios que pueden generar en el ambiente electrónico del sitio activo. Las mutantes que se eligieron fueron Gly13:Lys, Asn18:Ser, Gly103:Ala, Gly13:Asp y Gly80:Ala. Dichas mutantes y la lipasa recombinante BplAr-6H trabajaron con los sustratos 4-nitrofenil acetato, un éster cromogénico sencillo, y el benzil 4-nitrofenil carbonato, un carbonato cromogénico usado previamente en el grupo de trabajo (Likhatcheva, 2009). Se realizó una predicción de resultados de la interacción de las mutaciones seleccionadas con los sustratos mediante acoplamiento molecular automatizado. Como no existe la estructura cristalográfica de la lipasa de *B. pumilus* GMA1, utilizamos su homóloga de *B. subtilis* 168. Justificamos el uso debido a que no sólo es homóloga, sino que presenta 71% de identidad y hasta 80% de similitud.

Finalmente, los residuos del sitio activo que se postularon, resultaron estar conservados en ambas enzimas.

Protocolo

1. Se obtuvieron las coordenadas cristalográficas de la proteína BslA silvestre del Protein Data Bank. Se utilizaron las coordenadas 1ISP ya que son de alta resolución (1.30 Å).
2. Se construyeron las estructuras de los sustratos con los que se trabajaron, 4-NFA y B-4NFC con el programa ChemDraw Ultra 11.0.

Se construyeron las mutantes propuestas con la ayuda del programa Pymol (<http://www.pymol.org>) teniendo como base la proteína 1ISP. Después de introducir las mutaciones, las proteínas se minimizaron energéticamente para evitar choques entre las cadenas laterales de los residuos recién incorporados y los previamente existentes. Para esto se utilizó el programa UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Se utilizó un protocolo de gradiente descendente (Steepest Descent) de 1000 pasos, con pasos de 0.02 Å.

3. Se ingresó al servidor de acoplamiento automatizado (<http://www.dockingserver.com>) donde se abrió una sesión y se procedió a proporcionar las estructuras de los ligandos (sustratos) y las enzimas para poder iniciar el acoplamiento. Antes de dar inicio al acoplamiento molecular, se eliminaron las moléculas del agua y del glicerol. Los ligandos se minimizaron energéticamente por el servidor usando el campo de fuerza MMFF94 (Halgren, 1998). El servidor agregó átomos de hidrógeno en caso de que faltasen y definió todos aquellos enlaces capaces de rotar. Los parámetros correspondientes a los tipos de átomos, la solvatación y las cargas electrostáticas se adicionaron por el servidor utilizando el programa AutoDock tools (Morris, Goodsell et al., 1998). Se utilizaron todas las variables por defecto que usa el servidor para el cálculo de términos electrostáticos y de van der Waals. También se usaron los valores por defecto que utiliza el servidor para las distancias de los pasos de traslación dentro de la caja de unión. Las simulaciones de acoplamiento molecular se hicieron usando el algoritmo genético Lamarckiano (LGA) y el método de búsqueda local de Solis y Wets (Solis y Wets, 1981). Las posiciones iniciales, orientación y torsiones de los ligandos se seleccionaron al azar. Cada experimento de acoplamiento molecular derivó de 200 corridas que se detuvieron después de un número máximo de 2,500,000 evaluaciones de energía. La caja de unión del ligando se centró en la Ser77 del sitio activo de la molécula con 20 Å por lado.
4. Los resultados se analizaron con el programa PyMol 1.3.

5.3.2 Reactivación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3)

Para la reactivación de las células transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) que contienen al gen que codifica para la lipasa de *Bacillus pumilus* (*bplA*) y con la que se obtiene posteriormente la lipasa BplAr-6H, se utilizó el siguiente protocolo:

Protocolo

1. Se extrae del congelador que se encuentra a -70°C el tubo que contiene a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y se coloca en baño de hielo para que la descongelación sea lenta.
2. Se procede a inocular 10 mL de medio LBamp con 100 μL de la cepa de *E. coli*, posteriormente se incuba a 37°C y con agitación orbital durante 12 h.
3. Sembrar dos placas con agar LBamp empleando el medio con crecimiento celular obtenido previamente (cada placa con 50 μL de cada una de las cepas) e incubar a 37°C durante 24 h.
4. Revisar las placas, elegir en cada caso una colonia que se encuentre aislada y transferirla a 10 mL de medio LBamp. Incubar a 37°C y con agitación orbital durante 12 h.
5. Preparar nuevos inóculos a partir del medio con crecimiento recién obtenido. Las células se deben mantener en glicerol (50% v/v) a -70°C .

5.3.3 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* BL21 (DE3)

La extracción y purificación de DNA plasmídico de *E. coli* BL21 (DE3) se realizó siguiendo el método de lisis alcalina.

Protocolo

- 1.- Centrifugar 10 mL de cultivo de la bacteria crecida toda la noche en medio LBamp, a 2655.2 g durante 5 minutos.
- 2.- Resuspender las células en 100 μL de la disolución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM y lisozima de 10 mg/mL).
- 3.- Incubar a 37°C por 1 h.
- 4.- Adicionar 200 μL de una disolución recién preparada de NaOH 0.2 M y SDS 4%.
- 5.- Incubar en hielo durante 10 min.
- 6.- Agregar 150 μL de una disolución de acetato de potasio 5 M de (pH 5).
- 7.- Incubar en hielo durante 10 minutos.
- 8.- Centrifugar a máxima velocidad 20800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 9.- Agregar 400 μL de fenol saturado de amortiguador Sigma y mezclar.
- 10.- Adicionar 400 μL de cloroformo y mezclar suavemente.
- 11.- Centrifugar a 20800 g durante 5 minutos.
- 12.- Transferir 750 μL de la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar el DNA mediante la adición de 1 volumen igual de 2- propanol. Mezclar suavemente.
- 13.- Incubar a temperatura ambiente 30 min.
- 14.- Recolectar el plásmido por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 minutos a 20800 g.
- 15.- Lavar el plásmido con etanol al 80%, hasta la eliminación del olor a fenol. Secar al vacío.

5.3.4 Generación de mutantes

Las mutantes se generaron por el método de mutagénesis sitio-dirigida por oligonucleótidos siguiendo el método de Papworth (1996). Partiendo de la cepa de

E. coli BL21 (DE3) que contiene el gen *BplA* clonado en el vector pET22b+ (pET*bpI*) que servirá como molde para amplificar por PCR. Para cada mutante se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 5.1).

Los criterios que se tomaron en cuenta para elegir estos oligonucleótidos son los siguientes:

- Tamaño de los oligonucleótidos.
- Tm's parecidas entre los pares de oligonucleótidos.
- Extremos 3' preferentemente con las bases GG, CC, CG o GC, para favorecer la unión del ADN en el extremo en que la ADN polimerasa inicia la síntesis.
- Utilización de codones preferenciales para el hospedero, en este caso *E. coli*.

Tabla 5.1. Oligonucleótidos diseñados para las mutantes.

Oligonucleótido	Secuencia de 5' a 3'	Bases	Tm(°C)	Aplicación
FG13K	CACGGCATTAAAGGTGCCTCT	21	43	Generan la mutante Gly13:Lys en el gen <i>bpI</i>
RG13K	GGCACCTTTAATGCCGTGTAC	21	43	
FN18S	CTCTTATAGCTTTTTTCTATTAAAAG	27	37	Generan la mutante Asn18:Ser en el gen <i>bpI</i>
RN18S	AGAAAAAAGCTATAAGAGGCAC	23	38	
FG13D	CACGGCATTGATGGTGCCTCT	21	63	Generan la mutante Gly13:Asp en el gen <i>bpI</i>
RG13D	GGCACCATCAATGCCGTGTAC	21	63	
FG80A	ATGGGCGCGGCGAACACATTATAC	24	52	Generan la mutante Gly80:Ala en el gen <i>bpI</i>
RG80A	GTTCCGCCGCGCCATACTATGAG	23	52	
FG103A	TCACAATTGCGGGAGCAAACG	21	60	Generan la mutante Gly103:Ala en el gen <i>bpI</i>
RG103A	TTGCTCCCGCAATTGTGACAAC	22	60	

5.3.5 Amplificación del gen *BplA*

El gen *bpI* se subclonó en el plásmido pET22b(+) (Mora 2008) que es el vector de expresión seleccionado para su expresión (Figura 5.1). Este vector de 5,493 pb

tiene un promotor del fago T7, un operador *lac*, una secuencia de unión al ribosoma o Shine-Dalgarno y el codón de inicio seguido de un conector que permite, sin romper el marco de lectura, insertar la secuencia del gen que se pretende expresar fusionada a la secuencia que codifica para 6 residuos de histidinas en el extremo C-terminal (Figura 5.2). Además, contiene un gen de β -lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina.

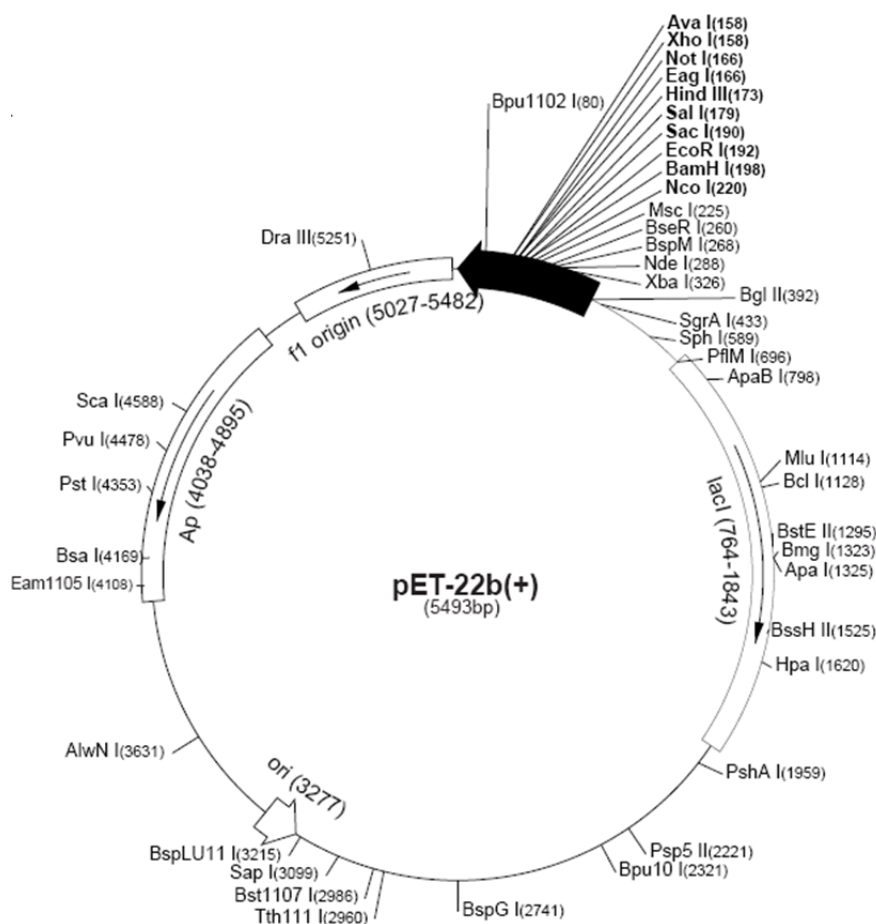


Figura 5.1. Vector de clonación pET22b(+).

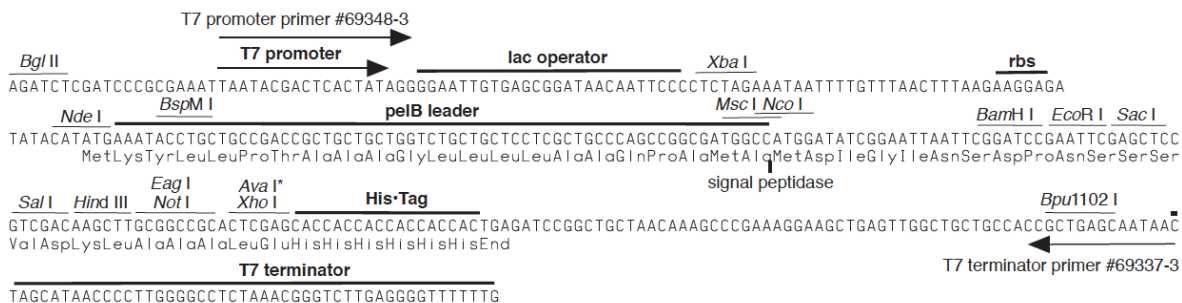


Figura 5.2. Región de clonación/expresión del vector pET22b(+).

5.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de los oligonucleótidos previamente diseñados y con el plásmido pET*bpl* como DNA molde, se realizaron las mutaciones sitio-específicas mediante PCR. Para cada mutante varía la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de acuerdo a sus T_m's calculadas.

Protocolo

1. Descongelar y mantener en baño de hielo los reactivos a utilizar durante todo el procedimiento (Tabla 5.2).
2. En un tubo de 0.2 mL se mezclan los reactivos tal y como se presenta en la Tabla 5.2 añadiendo al final a la polimerasa *Pfu*.
3. Centrifugar el tubo con la mezcla durante 5 segundos y colocar en el Termociclador previamente programado a las condiciones que se observan en la Tabla 5.3.
Se analizan los resultados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, adicionando en el pozo 5 µL de la reacción de PCR con 1 µL de amortiguador de carga y en otro pozo se colocan 2.5 µL de marcador molecular 2log 50 ng/µL y se corre a 120 V con amortiguador TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial 1.14 mL/L, pH 7.8).
4. En un recipiente se tiñe el gel con bromuro de etidio durante 20 minutos y se observa en el trans-iluminador UV.

Tabla 5.2. Reactivos para PCR

Orden de adición	Reactivo	Volumen (μL)
1	Amortiguador para <i>Pfu</i> 10x	2.5
2	Oligonucleótido F	0.5
3	Oligonucleótido R	0.5
4	Templado (DNA molde)	0.5
5	dNTPs	1
6	Agua destilada	19
7	Polimerasa <i>Pfu</i>	1

Tabla 5.3. Ciclos de PCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	2
24	94	1
	T de alineamiento	1
	68	16
1	68	15

5.3.7 Transformación de células *E. coli* DH5α

Los productos de PCR correspondientes a cada una de las mutantes se utilizaron para transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5α. El procedimiento se basó en el protocolo de Mora (2008).

Protocolo

1. Agregar 4 μL de la enzima *DpnI* al producto de PCR e incubar a 37°C por una hora.
2. Se extrae un vial de células electrocompetentes de aproximadamente 60 μL congeladas a -70°C y se coloca en baño de hielo para una descongelación lenta.
3. Una vez descongeladas las células se les adiciona 4 μL del plásmido de PCR y se deja reposar en baño de hielo durante 5 minutos.
4. Se traspasa la mezcla a una celda de electroporación pre-enfriada (15 min a -20°C).
5. A continuación se procede al “pulso eléctrico” colocando la celda en el equipo electroporador (*Gene pulser II*, BIO-RAD) con la siguientes condiciones: 25 μF, 200 W y 1.8 kV.5.

6. Se traspasa la mezcla a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionan 500 μ L de medio LB estéril, se mezclan y se incuban a 37°C con agitación durante 1 hora.
 7. Se siembran alícuotas de 250 μ L en dos placas con agar LBamp y se incuban a 37°C durante 24 h.
-

5.3.8 Purificación del Plásmido

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en el manual QIAprep Miniprep Handbook 2006, usando columnas QIAprep[®] spin QIAquick[®]. El protocolo se describe a continuación:

Protocolo

1. Cultivar el microorganismo en 10 mL de LBamp hasta una D.O. de 0.6, centrifugar por 5 min 10825.8 g/15°C. Conservar el pellet.
 2. Resuspender el pellet en 250 μ L de amortiguador P1 y transferirlo en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
 3. Adicionar 250 μ L del amortiguador P2 y mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo 4-6 veces.
 4. Adicionar 350 μ L del amortiguador N3. Mezclar inmediata y vigorosamente invirtiendo el tubo 4-6 veces. Centrifugar el tubo por 10 min/17949.5 g.
 5. Transferir el sobrenadante con una micropipeta a una columna QIAprep spin. Centrifugar por 1 min/17949.5 g. Descartar el sobrenadante.
 6. Lavar la columna QIAprep spin con 750 μ L con amortiguador PE. Centrifugar 1 min/17495.5 g. Descartar el sobrenadante. Centrifugar 1 min/17949.5 g. para descartar el amortiguador restante.
 7. Transferir el contenido de la columna QIAprep spin en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Añadir 50 μ L de amortiguador EB. Centrifugar 1 min/17949.5 g. Dejar reposar el tubo durante 1 min. Centrifugar 1 min/17949.5 g.
-

5.3.9 Digestión del plásmido purificado

Para corroborar la identidad del plásmido recuperado de las células transformantes, éste se sometió a una digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, ya que el gen *bplA* fue clonado en el pET22b(+) entre estos sitios de restricción. En la

Tabla 5.4 se presentan los reactivos con los que se llevó a cabo la digestión a 37°C/1 h. Posteriormente se corrió un gel de agarosa 1% con amortiguador TAE 1X y se tiñó con bromuro de etidio.

Tabla 5.4. Reactivos para llevar a cabo la digestión.

Reactivos	Volumen (μL)
Amortiguador 2	1
Enzima <i>NdeI</i>	0.25
Enzima <i>XhoI</i>	0.25
Plásmido purificado	1
Agua destilada	7.5

5.3.10 Secuenciación de los DNA plasmídicos

La secuenciación de los distintos plásmidos se realizó por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Se utilizaron los oligonucleótidos universales para las regiones promotora y terminal de T7 (Figura 5.2) para secuenciar los plásmidos.

5.3.11 Transformación en células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3)

Una vez que la secuenciación del DNA nos indicó que la mutación había sido exitosa, se prosiguió a introducir el plásmido en células quimiocompetentes *E. coli* BL21 (DE3) con el protocolo descrito a continuación.

Protocolo

1. Se toma un tubo eppendorf de células quimiocompetentes congeladas a -70°C y se coloca en hielo para una descongelación lenta.
2. Una vez descongeladas las células se les añaden 8 μL del plásmido de DNA purificado y se mantienen durante 30 min en hielo.

3. A continuación se procede al “choque térmico” colocando el tubo en un baño de agua a 42°C durante 1 min y posteriormente se coloca en hielo por 5 min.
 4. Se traspasa la mezcla a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se adicionan 500 µL de medio LB estéril, se mezclan y se incuban a 37°C con agitación durante 1 h.
 5. Se siembran alícuotas de 250 µL en dos placas con agar LBamp y se incuban a 37°C durante 16 h.
 6. Revisar las placas, elegir en cada caso una colonia que se encuentre aislada e inocular 10 mL de medio LBamp. Incubar a 37°C con agitación orbital durante 12 h.
 7. A partir del medio con crecimiento recién obtenido, traspasar 500 µL de cultivo a un tubo con glicerol (50% v/v) y guardar las cepas a -70°C.
-

5.3.12 Expresión de las proteínas recombinantes

Las condiciones requeridas para favorecer la expresión de las proteínas recombinantes fueron descritas por Santillán (2012).

Protocolo

1. Preparar un preinóculo (10 mL de medio LBamp) a partir de 100 µL de las células que se encuentran en glicerol (50% v/v) a -70°C. Incubar a 37°C y con agitación orbital durante 24 h.
 2. Inocular un matraz con capacidad de 250 mL que contenga 50 mL de medio LBamp, para ello se adicionan los 10 mL de preinóculo obtenido previamente. Se incuba durante 4 h a 37°C y con agitación orbital.
 3. Para incrementar la generación de biomasa se inocula un matraz con capacidad de 2 litros con 1 L de medio LBamp con los 60 mL de medio de cultivo obtenidos previamente y se incuban a 37°C y con agitación orbital.
 4. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6 a 0.8) se añaden 1000 µL de una solución de IPTG 0.5 M, la concentración final de agente inductor debe ser de 0.5 mM. Se mantienen las condiciones de incubación durante 4 h más.
 5. Obtener la biomasa por centrifugación a 10825.8 g por 10 minutos a 10°C.
 6. Resuspender la biomasa obtenida a partir de 300 mL de medio de cultivo en 20 mL de solución amortiguadora para lisis/lavados (fosfato de potasio 35 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 6.3).
 7. Tomar una alícuota de 20 µL y correr geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS).
 8. Mantener en refrigeración las células que fueron resuspendidas para su posterior purificación.
-

5.3.13 Purificación de las proteínas recombinantes

Las lipasas recombinantes tienen una etiqueta constituida por seis residuos de histidina, ésta característica permite su purificación mediante cromatografía de afinidad. Las columnas empleadas fueron empacadas con una resina que en su matriz posee iones de níquel, éste metal presenta afinidad por los residuos de histidina presentes en las proteínas.

El protocolo se desarrolló por analogía con el sistema de Mora (2008) y a partir de la información provista por el fabricante de la resina. Sin embargo se hicieron modificaciones menores al protocolo para mejorar el rendimiento de la proteína.

Protocolo

1. Para evitar el riesgo de contaminación entre lipasas es conveniente empacar varias columnas y desarrollar el proceso de manera independiente. Cada columna con que se cuenta tiene la capacidad para contener 20 mL de agua, sin embargo bastan 6 g de la resina Protino™ Ni-TED para ocupar dicho volumen.
2. Equilibrar cada columna con 30 mL de la solución amortiguadora para “lisis/lavado” (fosfato de potasio 35 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 6.3).
3. Descongelar la biomasa. Es conveniente que siempre se mantenga en hielo para que el cambio de temperatura sea paulatino.
4. Colocar la biomasa en un vaso de precipitados de 50 mL y adicionar 14 mL de solución amortiguadora de “lisis/lavado”. Es necesario mantener el vaso en baño de hielo.
5. Someter la biomasa a 4 ciclos de 5 pulsos en el sonicador, cada pulso con duración de 20 s y una potencia de 40-50 W. Entre cada ciclo esperar 1 minuto y mantener el extracto a 4°C.
6. Centrifugar el extracto obtenido a 10825.8 g durante 20 min y conservar el sobrenadante (fracción soluble) a 10°C.
7. Una vez obtenido el sobrenadante, es posible introducir a la columna de afinidad un volumen de 10 a 14 mL de la fracción soluble. Es recomendable que todas las soluciones amortiguadoras (Anexo 1) se mantengan a 5°C durante el proceso de purificación.
8. Comenzar recolectar el “volumen muerto” de la columna en cuanto comienza la adición del extracto a la columna. A continuación se coloca el recipiente destinado para coleccionar el “frente de elución” a partir de que el volumen coleccionado sea igual a 12 mL.
9. Adicionar a la columna 15 mL de solución amortiguadora para “lisis/lavado”. En cuanto concluya la adición éstos 15 mL, se coloca el recipiente destinado para coleccionar la solución de lavado.
10. Verter en la columna 50 mL de solución amortiguadora para “lisis/lavado”. A continuación se adiciona a la columna un volumen de 70 mL de solución amortiguadora para “último lavado” (fosfato de potasio 30 mM, NaCl 300 mM, imidazol 75 mM, pH 6.3).
11. Comenzar la adición de 25 mL de solución amortiguadora para “elución” (fosfato de potasio 30 mM, NaCl 300 mM, imidazol 130 mM, pH 6.3) e inmediatamente comenzar a coleccionar los 12 mL que corresponden al “volumen muerto”.
12. En cuanto concluya la colección del “volumen muerto” se procede a coleccionar fracciones de 4 mL en tubos de ensayo, es recomendable que los tubos se mantengan en baño de hielo.

13. Adicionar a la columna 15 mL de solución amortiguadora para “limpieza” (fosfato de potasio 30 mM, NaCl 300 mM, imidazol 275 mM, pH 6.3) y a continuación 10 mL de solución amortiguadora para “lisis/lavado”. La colección en los tubos de ensayo debe suspenderse en cuanto concluya la adición del amortiguador para “lisis/lavado”.
 14. Tomar alícuotas de las fracciones colectadas y correr geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las fracciones donde la cantidad y pureza de las lipasas sea elevada se juntan.
 15. Las fracciones donde la cantidad y pureza de las lipasas sea elevada se dializan frente a 2 L de solución amortiguadora (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.0 a 6°C durante 4 h). Se repite esta diálisis durante 4 h.
 16. Las enzimas dializadas se concentran con PEG 35000, hasta obtener una concentración 50% v/v y se guardan en tubos falcon estériles a 4°C.
 17. Antes de comenzar un nuevo ciclo de purificación es necesario equilibrar la columna mediante la adición de soluciones amortiguadoras en el siguiente orden: 30 mL para “lisis/lavado”, 20 mL para “ultimo lavado” y nuevamente 30 mL para “lisis/lavado”.
 18. Después de someter la resina a tres ciclos de purificación es recomendable su regeneración. Para ello es necesario atender las especificaciones del fabricante (Anexo 2).
-

5.3.14 Determinación de la concentración de las lipasas

La concentración de las lipasas conservadas en glicerol se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Este método requiere de la preparación de una curva patrón empleando las soluciones que se indican en el Anexo 3.

Protocolo

1. Es importante señalar que la curva patrón y las muestras deben prepararse simultáneamente y bajo las mismas condiciones. Todas las determinaciones se hacen por triplicado.
 2. Preparar en tubos eppendorf (1.5 mL) las soluciones que corresponden a las muestras y a cada uno de los puntos de la curva según se indica en el Anexo 3.
 3. Agitar cada tubo en el vortex por 10 s e incubar a 37°C durante 30 min.
 4. Después del periodo de incubación se determinó la absorbancia que presentan los puntos de la curva y las muestras a una longitud de onda de 562 nm. Se empleó el espectrofotómetro Beckman DU 7500.
 5. Con los valores obtenidos se construye la curva patrón y por interpolación se determina la concentración de las muestras.
-

5.3.15 Determinación de las constantes de inactivación térmica de las enzimas (k_{ie})

La termoestabilidad que presentan las lipasas BplAr-6H y sus mutantes se estudió mediante la pérdida de actividad que sufren estas enzimas bajo las

condiciones empleadas en los ensayos. Para ello se hizo el seguimiento de la actividad hidrolítica residual después de ser incubada a cierta temperatura a tiempos variables, usando como sustrato al benzil 4-nitrofenil carbonato.

Mora (2008) propuso un protocolo que permitió el análisis comparativo de la estabilidad que presenta la BpIAR-6H y el efecto que generan algunas mutaciones sitio-específicas en su actividad catalítica.

Protocolo

1. A una celda para espectrofotómetro con capacidad de 1 mL adicionar la mezcla de sustrato (10 μ L sustrato Benzil 4-nitrofenil carbonato, 970 μ L solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, Tritón X-100 al 1% v/v, pH 7.5 y 20 μ L de enzima), incubar a 25°C por 1 min y adicionar la enzima de estudio (concentración final 1 μ M).
2. Medir el cambio de absorbancia contra un blanco a 410 nm (mezcla de sustrato sin enzima) durante un par de minutos (Abs_{410}/min) a 30°C. Se empleó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian).
3. Calcular la actividad inicial (μ M/min) empleando el valor de la pendiente que se obtiene a partir del cambio de absorbancia y la pendiente de una curva patrón de 4-NF (Abs_{410}/μ M).
4. Incubar en Termomixer a 25°C sin agitación.
5. A tiempos determinados, tomar una alícuota de la enzima de estudio y determinar su actividad inicial como se indica en los pasos 1, 2 y 3.
6. Graficar los valores de actividad relativa ($\ln(Act_t/Act_0)$) contra el tiempo. La pendiente del gráfico equivale a $-k_{ie}$.

Los detalles del modelo matemático empleado para el cálculo de las k_{ie} se encuentra descrito con detalle en la sección 6.9.

5.3.16 Caracterización cinética (k_{cat} y K_m)

Los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m se calcularon a partir de curvas de progreso de la reacción de hidrólisis de los sustratos cromogénicos el 4-nitrofenil acetato (4-NFA) y el benzil 4-nitrofenil carbonato (B-4NFC). El análisis de los datos obtenidos a partir de las curvas de progreso de la reacción fue realizado con el programa *Encora 1.2* (Willeman y col., 2000; Straathof, 2001). El programa se basa en la integración numérica de la ecuación diferencial de Michaelis-Menten-Henry por el método de Runge-Kutta. Este programa puede, de ser necesario, considerar la constante de inactivación de la enzima e inclusive la hidrólisis química del

sustrato. Se utilizaron dos diferentes sustratos y se realizaron los siguientes procedimientos:

Protocolo (4-NFA)

1. A una celda para espectrofotómetro con capacidad de 1 mL, adicionar la siguiente mezcla: 10 μL sustrato 4-NFA de una solución 10 mM disuelto en acetonitrilo, 970 μL solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, Tritón X-100 al 0.226% v/v, pH 7 y 20 μL de enzima.
 2. Medir el cambio de absorbancia en el tiempo a 410 nm ($\text{Abs}_{410}/\text{min}$) contra un blanco (solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, Tritón X-100 al 0.226% v/v, pH 7) a 25°C durante 3 h. Se empleó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian).
 3. A partir de los datos anteriores, calcular la formación del producto, 4-Nitrofenol (4-NF), y el consumo de sustrato en el tiempo. Para ello se emplea el valor de la pendiente de una curva patrón de 4-NF ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$).
 4. Modificar el volumen final de sustrato a 8, y 12 μL . Realizar por triplicado con los tres diferentes volúmenes de cada enzima.
 5. Alimentar al programa *Encora 1.2* con los datos recién obtenidos para obtener los valores de k_{cat} y K_{m} . Incorporar también el valor de k_{ie} de la enzima en análisis.
-

Protocolo (B-4NFC)

1. A una celda para espectrofotómetro con capacidad de 1 mL, adicionar la siguiente mezcla: 10 μL sustrato B-4NFC de una solución 1.5 mM disuelto en acetonitrilo, 970 μL solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, Tritón X-100 al 1% v/v, pH 7.5 y 20 μL de enzima.
 2. Medir el cambio de absorbancia en el tiempo a 410 nm ($\text{Abs}_{410}/\text{min}$) contra un blanco (solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, Tritón X-100 al 1% v/v, pH 7.5) a 25°C durante 4.5 h. Se empleó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian).
 3. A partir de los datos anteriores, calcular la formación del producto (4-NF) y el consumo de sustrato en el tiempo. Para ello se emplea el valor de la pendiente de una curva patrón de 4-NF ($\text{Abs}_{410}/\mu\text{M}$).
 4. Realizar por triplicado.
 5. Alimentar al programa *Encora 1.2* con los datos recién obtenidos para obtener los valores de k_{cat} y K_{m} . Incorporar también el valor de k_{ie} de la enzima en análisis.
-

Capítulo 6. Resultados y análisis

6.1 Acoplamiento molecular *in silico* (Docking)

Mediante la inspección del sitio activo, así como por los resultados observados en estudios de evolución dirigida (Dröge y col., 2006), se seleccionaron diversas posiciones alrededor del sitio activo para evaluar su papel en distintas propiedades de la enzima, como son sus propiedades cinéticas, su promiscuidad catalítica y su enantioselectividad. La enantioselectividad no se incluye en este estudio, aunque ya se está trabajando este aspecto con estas mutantes dentro de nuestro grupo de trabajo. Se seleccionaron las posiciones Gly13, Asn18, Gly80 y Gly103. También se escogieron otras posiciones de interés, como la His76 que tiene importancia en catálisis y enantioselectividad (Funke y col., 2005), pero las mutantes propuestas no se pudieron obtener. La mutación que introdujimos en primer término fue la del aminoácido original por Ala. Sólo cuando el acoplamiento con esta variante produjo complejos cuya energía libre de formación es positiva o muy cercana a cero, entonces utilizamos otros residuos. En orden se usaron Ser, como residuo pequeño polar, Asp, como residuo cargado negativamente, y finalmente Lys, como residuo cargado positivamente. No se incluyeron residuos no polares grandes.

La Gly13 forma parte de la asa $\beta 1-\alpha 1$ y forma una de las paredes del sitio activo (Figura 6.1). Asumimos que la incorporación de una cadena R más voluminosa podría restringir la entrada del sustrato al sitio activo así como disminuir la movilidad estructural de esta asa, influenciando la catálisis. La Asn18 es un residuo crítico para definir la enantioselectividad del sitio activo de la BslA (Dröge y col., 2006), se encuentra en el primer giro de la hélice $\alpha 1$ y completa la pared del sitio activo del lado en que se acomoda el residuo alcohólico del éster (Dröge y col., 2006). La Gly80 se encuentra en la hélice $\alpha 3$, apenas 3 residuos adelante de la Ser77, que es el nucleófilo de la BslA. Este residuo está enfrentado a la Thr101 que se encuentra en la región C-terminal de la hebra $\beta 4$, quien a su vez sostiene a

la asa $\beta 4-\alpha 4$ que está vecina a la asa catalítica. Suponemos que un cambio en el empaquetamiento de la región C-terminal de la hebra $\beta 4$ repercutirá en el ambiente electrónico de la Ser77. La última mutante propuesta está en la misma zona, en la asa $\beta 4-\alpha 4$. Nuevamente el cambio de una Gly por un residuo más voluminoso puede alterar la movilidad de la Ser77 así como la de su recambiador de protones, la His156.

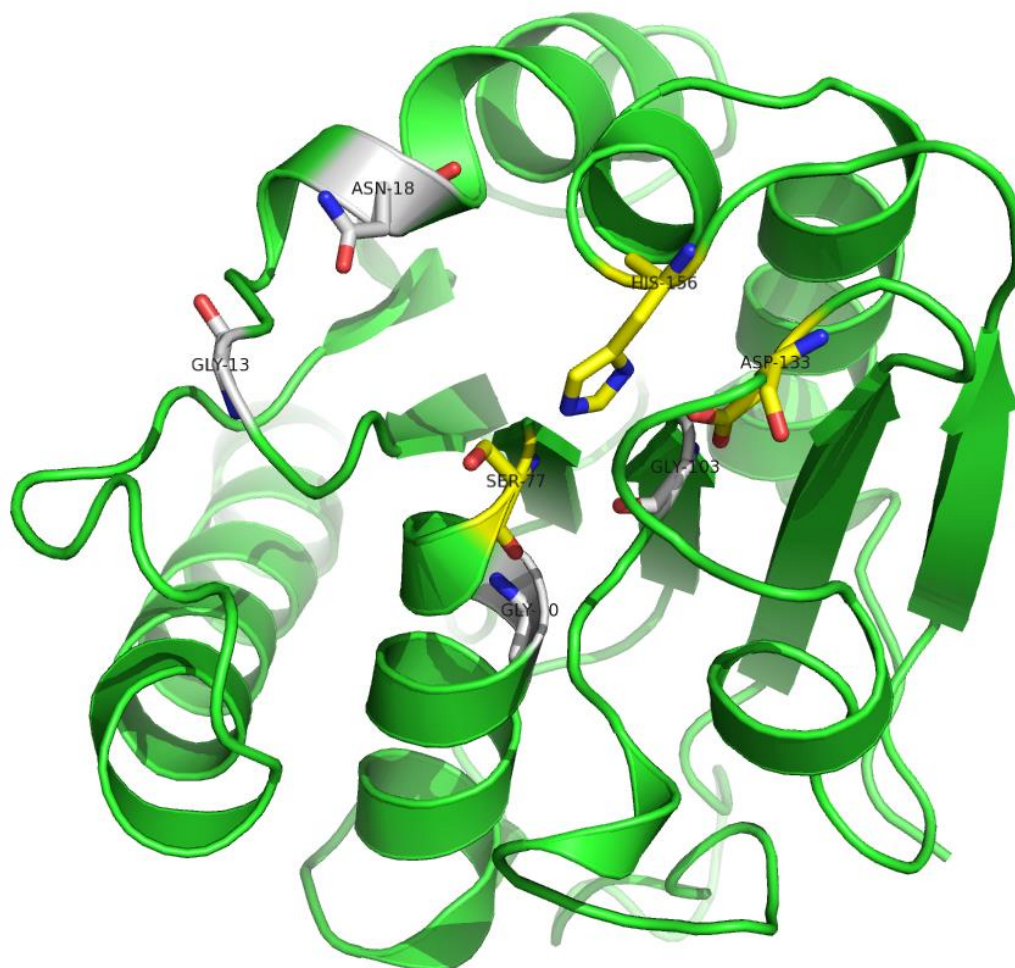


Figura 6.1. Posiciones seleccionadas para mutagénesis sitio-dirigida usando como modelo la estructura cristalográfica de la BslA (PDB 1ISP). En Gris se presentan los residuos Gly13, Asn18, Gly80 y Gly103. En amarillo se observa la triada catalítica: Ser77, Asp133 e His156.

Se realizó un acoplamiento molecular utilizando las formas energéticamente minimizadas de las enzimas silvestre y mutantes en las posiciones seleccionadas. Se utilizó la estructura cristalográfica de *B. subtilis* 168 (PDB 1ISP), las mutantes propuestas se construyeron con el programa Pymol usando como base la estructura 1ISP. Con el programa UCSF Chimera, las proteínas se minimizaron energéticamente para evitar choques entre las cadenas laterales de los residuos recién incorporados y los previamente existentes. Posteriormente se ingresó al servidor donde se introdujeron las estructuras de los sustratos y las enzimas, previamente se eliminaron las moléculas de agua y de glicerol. Se realizaron 200 corridas de acoplamiento por enzima. Se utilizaron como ligandos a los sustratos 4-NFA y B-4NFC. En la tabla 6.1 se presentan los resultados resumidos para aquellas formas de la enzima que resultaron ser interesantes por su capacidad de unir a los ligandos. Aquellas mutantes cuyas energías de interacción fueron positivas se eliminaron para futuros análisis. Cabe destacar que cada lipasa arrojó más de una forma de unión con cada sustrato. En consecuencia se seleccionó la opción con mayor frecuencia de unión y que al medir la distancia del carbono carbonilo del sustrato con la serina catalítica de la lipasa fuera la distancia más corta (Figura 6.2). En la mayoría de los casos la opción con mayor frecuencia de unión tenía menor distancia entre el carbono carbonilo con la serina catalítica y una constante de inhibición (K_{inb} , equivalente a una constante de disociación) menor. Sin embargo no en todos fue así, como en el caso de la mutante BslA-G80A; el acoplamiento molecular de esta mutante con el sustrato B-4NFC presenta una opción con mayor frecuencia de unión a la elegida, con el 49% pero con una distancia mayor entre la serina catalítica y el carbono carbonílico, de 5.3 Å. En este caso, la opción elegida tiene una K_{inb} de 113.25 μM , mejor que la que se obtiene con la opción de unión de mayor frecuencia cuyo valor fue de 274.33 μM (Figura 6.3).

En la predicción de resultados del acoplamiento molecular se observa que las lipasas tienen mayor afinidad por el sustrato B-4NFC a pesar de tener distancias similares entre la serina catalítica a los carbonos carbonílicos de cada sustrato. También cabe destacar que en la mayoría de los acoplamientos moleculares

realizados se obtuvieron más opciones de unión para el sustrato B-4NFC que con el 4-NFA. Esto se puede ejemplificar con la mutante Gly103:Ala, que con el B-4NFC tuvo 9 opciones de pegue mientras para el 4-NFA solo se obtuvieron 2. Esto se podría deber a que el 4-NFA es un sustrato más pequeño y en consecuencia sus probabilidades de interacción con energía libre negativa son menores al ocupar una menor área superficial que el B-4NFC.

En la figura 6.1 se presenta una imagen en general con todas las posiciones propuestas para mutación con la triada catalítica como referencia. Se puede observar que las mutaciones Gly103:Ala y Gly80:Ala podrían modificar más fácilmente el ambiente electrónico del sitio activo debido a la cercanía que presentan con la Ser catalítica.

Tabla 6.1 Resumen del acoplamiento molecular *in silico*.

Lipasa	Sustrato	K_{inh}	Distancia (Å)	Frecuencia de unión
BslA-6H	4-NFA	1.17 mM	3.4	51%
	B-4NFC	63.71 μ M	3.6	66%
BslA-G13K	4-NFA	1.77mM	3.8	59%
	B-4NFC	103.79 μ M	3.7	41%
BslA-N18S	4-NFA	2.44 mM	3.5	78%
	B-4NFC	159.76 μ M	3.8	40%
BslA-G80A	4-NFA	2.30 mM	3.4	88%
	B-4NFC	113.25 μ M	3.6	42%
BslA-G103A	4-NFA	1.90 mM	3.4	97%
	B-4NFC	123.38 μ M	3.6	38%
BslA-G13D	4-NFA	2.07 mM	3.3	98%
	B-4NFC	206.44 μ M	3.7	44%

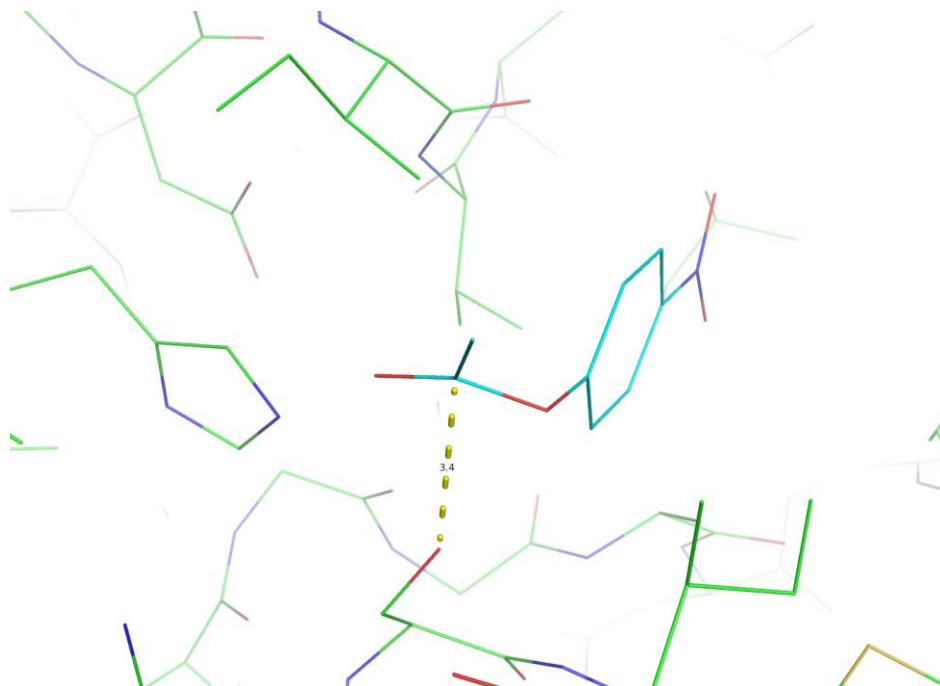


Figura 6.2. Imagen de Pymol donde se observa la distancia de la serina catalítica de la lipasa BslA silvestre con el carbono carbonilo del sustrato 4-NFA.

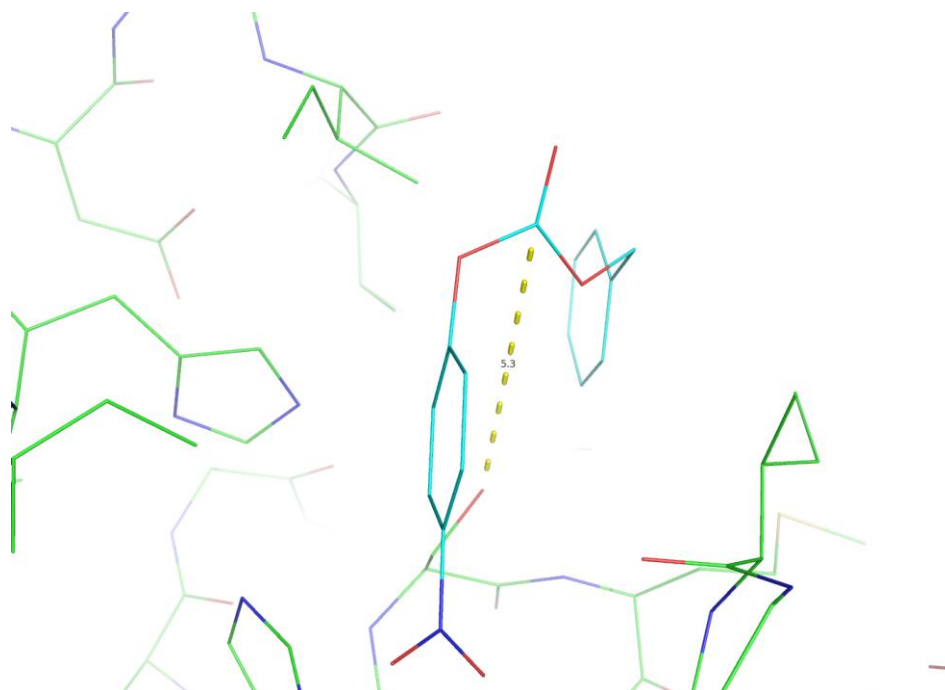


Figura 6.3. Imagen de Pymol donde se observa la distancia de la serina catalítica de la lipasa mutante BslA-G80A con el carbono carbonilo del sustrato B-4NFC en la conformación que tuvo un 49% de frecuencia de unión.

6.2 Generación de mutantes mediante PCR

Se logró reactivar a las células transformantes de *E. coli* BL21 (DE3) y se purificó el DNA plasmídico, el cual se utilizó para la generación de mutantes por PCR. Se logró amplificar el plásmido correspondiente al pETbpl con los oligonucleótidos correspondientes de la Tabla 6.2. En el gel de agarosa (Figura 6.4) se detectó una banda de aproximadamente 6.0 kb que corresponde al peso esperado para el vector y el gen de la lipasa, *lipA*, que es de aproximadamente 6 kb.

Tabla 6.2. Relación de construcción de mutantes.

Oligonucleótidos		Mutante	Mutación	Tm experimental (°C)
FG13K	RG13K	BplAr-G13K	✓	48
FG103A	RG103A	BplAr-G103A	✓	50
FN18S	RN18S	BplAr-N18S	✓	52
FG13D	RG13D	BplAr-G13D	✓	52
FG80A	RG80A	BplAr-G80A	✓	52

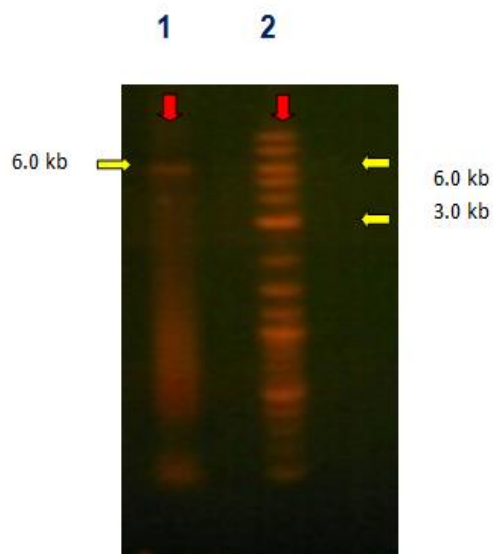


Figura 6.4. Ejemplo de gel de agarosa al 1% que presenta las bandas del vector con el amplicón correspondiente al par de oligonucleótidos F80A-R80A. Carril 1: (5 μ L producto de PCR + 1 μ L de amortiguador de carga). Carril 2 : (2.5 μ L marcador de peso molecular 2-log DNA Ladder).

6.3 Purificación y análisis de los plásmidos.

Se seleccionó una colonia de la transformación correspondiente de cada plásmido y se purificaron los plásmidos por el método QIAprep[®] Miniprep (Qiagen). Se procedió a realizar la digestión para verificar la inserción del plásmido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Se realizó un gel de agarosa al 1% y se observaron dos bandas de 5500 pb y 600 pb que corresponden al plásmido pET22b(+) y al gen *lipA*, respectivamente. Se mandó a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y se corroboró la identidad del inserto.

6.4 Expresión de las proteínas recombinantes

Se procedió a inocular en un matraz con 50 mL de medio LBamp a partir del preinóculo obtenido previamente. Se escaló el medio de cultivo a un volumen final de 1.0 L y se mantuvieron las condiciones de incubación hasta alcanzar una DO_{600}

de 0.6. Se tomaron muestras de cada mutante correspondiente antes de agregar el agente inductor. Se adicionó el agente inductor Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM y se restablecieron las condiciones de incubación de 4 horas al finalizar se tomaron muestras correspondientes de cada mutante después de la inducción para corroborar la producción de proteína (Figura 6.5).

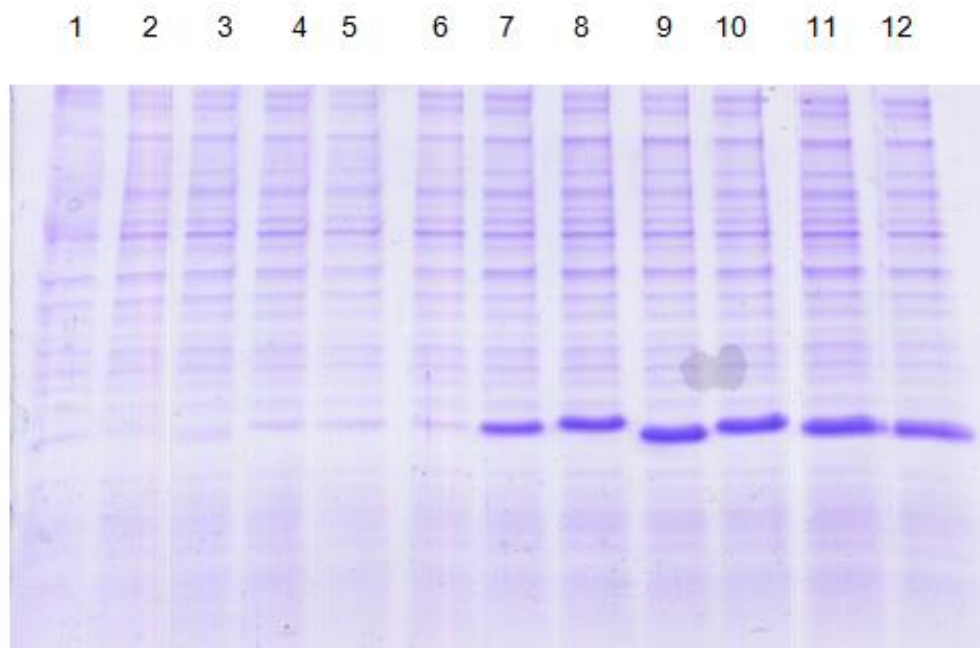


Figura 6.5. Expresión de la lipasa BpIAR-6H y sus mutantes. Carriles 1-6: muestras sin IPTG. Carriles 7-12: muestras con IPTG. Carril 1 y 7: BpIAR-6H; Carril 2 y 8: BpIAR-G13K Carril 3 y 9: BpIAR-N18S; Carril 4 y 10: BpIAR-G103A; Carril 5 y 11: BpIAR-G13D; Carril 6 y 12: BpIAR-G80A.

6.5 Purificación de las proteínas recombinantes

Se purificaron las mutantes y la proteína parental mediante cromatografía de afinidad en una columna Protino Ni-TED. En la Figura 6.6 se muestra la purificación de la proteínas recombinante BpIAR-G13K, con los lavados y las

fracciones purificadas que tiene el ciclo de purificación. Se observan otras bandas contaminantes en baja concentración. La proteína se dializó dos veces contra 2 L de amortiguador (fosfatos 50 mM / NaCl 100 mM / pH 7) durante 4 horas, se concentró sobre una cama de PEG 35,000. Para evaluar la pureza, se analizaron las proteínas concentradas por SDS-PAGE (Figura 6.7).

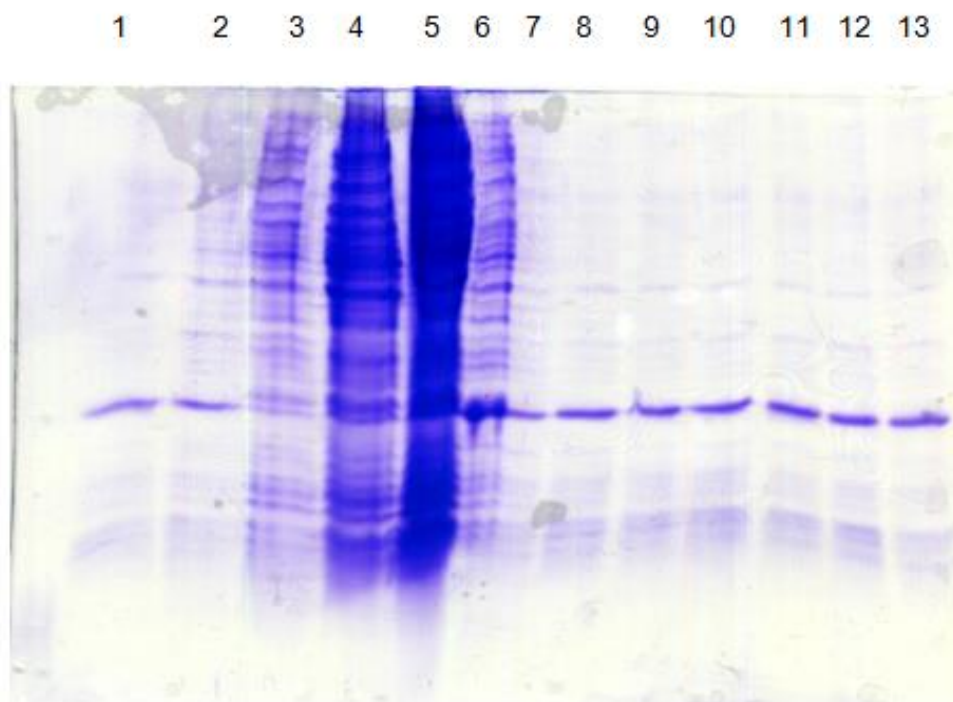


Figura 6.6. Purificación de BpIAr-G13K. Gel SDS-PAGE que presenta las bandas de proteína presente de las fracciones colectadas. Carriles 1,2: últimos lavados, 3: primer lavado, 4,5,6: frente de elución, carriles 7-13 fracciones purificadas.

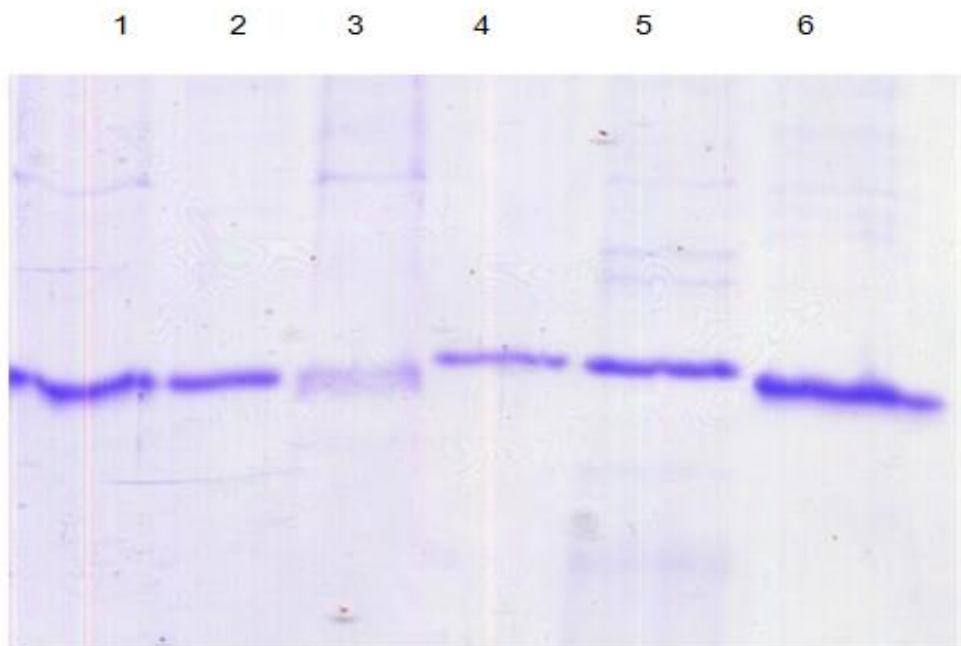


Figura 6.7. Muestras de las lipasas purificadas por afinidad y concentradas sobre PEG 35,000. Carriles 1: BplAr-6H; 2: BplAr-G13K 3: BplAr-N18S; 4: BplAr-G103A; 5: BplAr-G13D; 6: BplAr-G80A.

6.6 Determinación de la concentración de las lipasas

Se determinó la concentración de las lipasas purificadas mediante el método del ácido bicinonínico. Las concentraciones se muestran en la tabla 6.3. Se observa que las concentraciones son bajas respecto a trabajos previos (Mora, 2008), quien purificó usando HPLC. En el presente trabajo se purificó también con una columna de afinidad pero sin HPLC. Las concentraciones de la proteína a pesar de ser bajas, son adecuadas para caracterizarlas cinéticamente.

Tabla 6.3. Concentraciones de las lipasas purificadas.

Lipasa	mg/mL	mg totales	mL totales
BplAr-6H	0.128	1.541	12
BplAr-G13K	0.138	1.656	12
BplAr-N18S	0.166	1.822	11
BplAr-G80A	0.133	1.463	11
BplAr-G103A	0.022	0.202	9
BplAr-G13D	0.142	1.992	14

6.7 Determinación de constante de inactivación térmica (k_{ie})

La estabilidad de las lipasas se calculó por medio de constantes de inactivación térmica (k_{ie}) así como el tiempo de vida media. En todas ellas se utilizó el seguimiento de la actividad hidrolítica en el tiempo frente a B-4NFC.

Para calcular las constantes de inactivación enzimática se consideró que la enzima sólo tiene dos estados, el nativo N (enzima con actividad) y el desnaturalizado D (enzima que carece de actividad). La transición de N a D está dada por:



Donde la velocidad del proceso está mediada tanto por la constante de inactivación como por la concentración de la enzima nativa:

$$v = k_{ie} [N]$$

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

$$d[D] / dt = k_{ie} [N]$$

Esta condición también puede expresarse en función de la enzima nativa:

$$-d[N] / dt = k_{ie} [N]$$

El signo negativo hace referencia a que la concentración de la enzima nativa disminuye a medida que ésta se desnaturaliza. Al reacomodar la ecuación anterior se obtiene:

$$-d[N] / [N] = k_{ie} dt$$

Al integrar ésta ecuación tenemos que:

$$\int (-d[N] / [N]) = k_{ie} \int dt$$

Integrando esta ecuación diferencial entre los límites 0 y t obtenemos:

$$-\ln ([N]_t / [N]_0) = k_{ie} t$$

La cual también se puede expresar así:

$$\ln ([N]_t / [N]_0) = - k_{ie} t$$

En este caso, la concentración inicial de la enzima en su estado nativo es proporcional a la actividad enzimática en el tiempo 0 ($[N]_0 \propto Act_0$), ya que la enzima en estado nativo posee actividad. Por otro lado, la concentración de enzima en estado nativo en cualquier tiempo t es proporcional a la actividad remanente a ese tiempo ($[N]_t \propto Act_t$). Por lo tanto se tiene que:

$$\ln (Act_t / Act_0) = - k_{ie} t$$

Para obtener el valor de k_i se graficó $\ln (Act_t / Act_0)$ contra el tiempo y la pendiente de ese gráfico equivale a $-k_{ie}$. Una vez obtenidos los valores de las constantes de inactivación térmica (k_{ie}) se calcularon los valores de vida media con la fórmula:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{ie}.$$

Se determinaron las constantes de inactivación enzimática en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, Tritón X-100 1% (v/v) pH 7.5 a 25°C durante 360 minutos en diferentes intervalos de tiempo. Se realizó el gráfico del logaritmo de la relación de actividades final e inicial en función del tiempo. La pendiente de este

gráfico corresponde a k_{ie} . En la figura 6.8 se observa que las mutantes Gly103:Ala, Gly13:Asp y Gly80:Ala son más estables que la lipasa BplAr-6H, cuya k_{ie} es de 0.0086 min^{-1} . Este último valor es similar al obtenido por Likhatcheva (2009) y Mora (2008) para la misma lipasa en condiciones similares. La vida media de esta enzima es de 80.6 min. Las mutantes en dicho gráfico tienen un valor de vida media más alto que la lipasa BplAr-6H.

Las mutantes BplAr-G13K y BplAr-N18S se presentan en la figura 6.9, donde se observa que tienen una menor estabilidad que la lipasa parental. Estas mutantes se inactivan al poco tiempo de iniciado el ensayo, por esta razón se descartaron para futuros ensayos. Recordemos que la caracterización cinética por el método de análisis de cursos temporales requiere que la enzima sea activa durante el tiempo que dura el ensayo, que puede ser de varias horas. En la gráfica 6.10 queda claro que estas mutantes se inactivan a los pocos minutos de iniciado el ensayo. En la tabla 6.4 se presentan los valores k_{ie} y $t_{1/2}$ de las lipasas que se muestran más estables que BplAr-6H.

Tabla 6.4. Resultados de constantes de inactivación enzimática y vida media.

Lipasa	$k_{ie} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$
BplAr-6H	0.0086	80.6
BplAr-G103A	0.0075	92.4
BplAr-G13D	0.00424	163.2
BplAr-G80A	0.00194	357.3

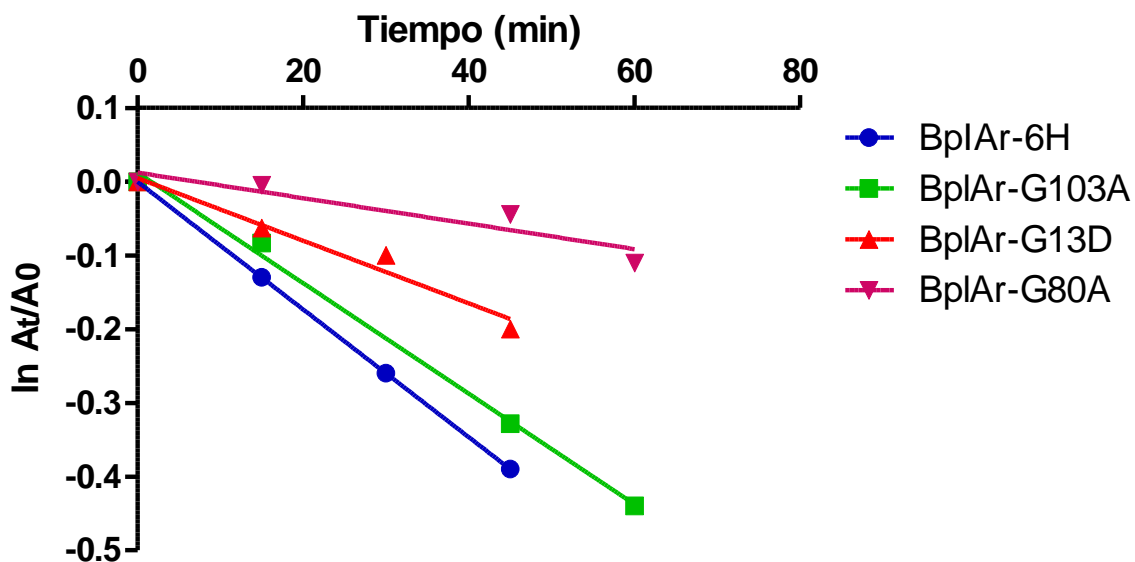


Figura 6.8. Seguimiento de la inactivación enzimática. Se presentan las mutantes con un mejor desempeño que la lipasa BpIAr-6H.

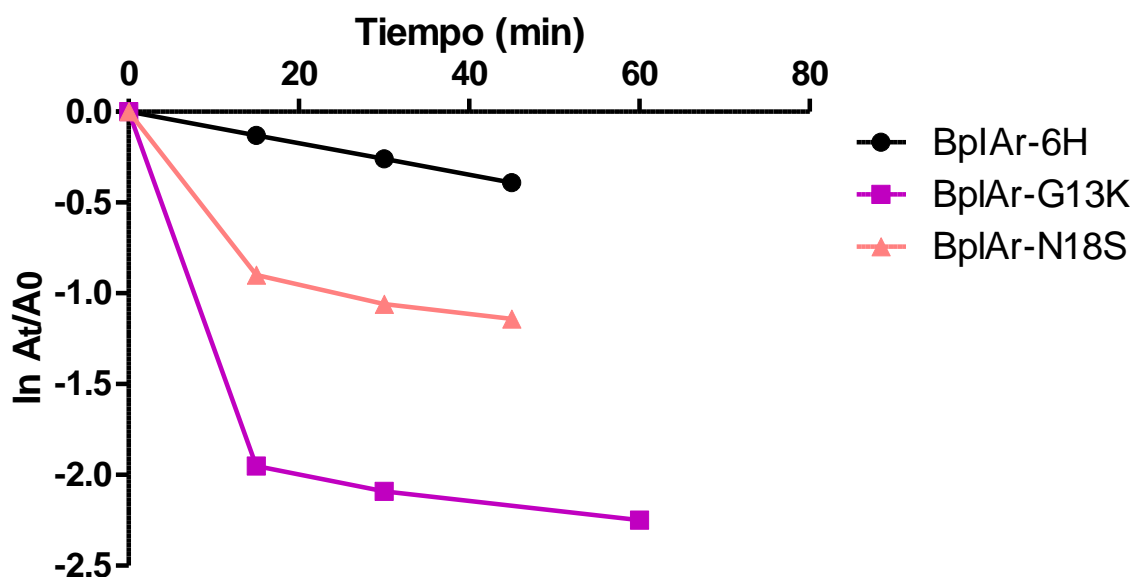


Figura 6.9. Seguimiento de la inactivación enzimática. Se muestran las mutantes que se inactivaron a tiempos más cortos que la lipasa BpIAr-6H.

Se realizaron ensayos posteriores para caracterizar a las lipasas con las que se decidió trabajar. Se calcularon las actividades específicas con los sustratos 4-NFA y B-4NFC. Para cada sustrato se utilizaron condiciones experimentales un poco diferentes, con el 4-NFA se trabajó con un amortiguador con baja concentración de tensoactivo (fosfatos 50 mM, Triton X-100 0.226% (v/v), pH=7.0), mientras que con el B-4NFC se utilizó una mayor concentración del tensoactivo (fosfatos 50 mM, Triton X-100 1% (v/v), pH=7.5). El aumento de casi cinco veces más en la concentración de Triton X100 entre los ensayos del 4-NFA y el B-4NFC se realizó debido a que el sustrato B-4NFC es muy difícil de disolver y este aumento de concentración permite mantenerlo en disolución por el tiempo que dura el ensayo. En la tabla 6.5 se presentan los resultados de las actividades específicas con ambos sustratos.

Tabla 6.5. Actividades específicas con el 4-NFA y B-4NFC.

Lipasa	U/mg (4-NFA)	U/mg (B-4NFC)
BplAr-6H	141.49	29.35
BplAr-G80A	106.24	162.23
BplAr-G103A	45.46	115.38
BplAr-G13D	78.02	17.83

6.8 Caracterización cinética (k_{cat} y K_m)

Se determinaron los parámetros cinéticos k_{cat} y K_m , a su vez con estos valores se calculó la eficiencia catalítica para la lipasa BplAr-6H y sus mutantes Gly80:Ala, Gly103:Ala y Gly13:Asp con los sustratos 4-NFA y B-4NFC. Se realizaron por triplicado los ensayos para cada lipasa, el desarrollo experimental se encuentra descrito en la sección 5.3.16.

El cálculo de las constantes cinéticas no se llevó a cabo por métodos tradicionales. Usualmente estos valores se obtienen a partir de medir la velocidad inicial de reacción a distintas concentraciones de sustrato. Sin embargo cuando la solubilidad del sustrato impide hacer variaciones en las concentraciones del mismo, las curvas de progreso de reacción son de gran utilidad. En el caso del presente trabajo se obtuvieron a partir de las curvas de progreso de la reacción de hidrólisis del 4-NFA y el B-4NFC.

La producción de 4-NF en el transcurso de las reacciones se midió por espectrofotometría a 410 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva patrón de 4-NF para obtener datos expresados en unidades de concentración. Posteriormente todos estos datos se utilizaron para alimentar el programa *Encora 1.2* (Willeman y col., 2000; Straathof, 2001). En la Figura 6.10 se observa cómo el programa ajusta los datos para obtener las constantes k_{cat} y K_m . Durante el ajuste, el programa realiza una integración numérica de la ecuación diferencial de Michaelis-Menten por el método de Runge-Kutta.

La estequiometría de la reacción del 4-NFA \rightarrow 4-NF es 1:1. Por ello se consideró un mecanismo simple en el cual se tiene un sustrato (4-NFA) y un solo producto (4-NF), aunque en realidad hay una molécula de agua que participa en la reacción de hidrólisis y los productos son un ácido y un alcohol. También se consideró irreversible el paso de 4-NFA \rightarrow 4-NF, ya que la reacción de hidrólisis en medio acuoso es esencialmente irreversible. Por último, también se consideraron las constantes de inactivación térmica de la enzima (Mora, 2008).

En el caso del sustrato B-4NFC, a pesar que no es su sustrato natural para las lipasas, lo pueden hidrolizar a 4-NF, alcohol bencílico y CO_2 ya que cuenta el grupo carbonato es similar al enlace éster de los triglicéridos o el 4-NFA, lo que permite el reconocimiento promiscuo y la hidrólisis del compuesto de un modo similar al que ocurriría con una molécula de agua (Figura 6.11). Para utilizar el programa *Encora 1.2*, consideramos un modelo con un solo sustrato (S) y un solo producto (P), aunque en realidad hay una molécula de agua que participa en la

hidrólisis y los productos finales son tres: 4-NF, alcohol bencílico y CO_2 . Suponemos que el producto de la lipasa es el bicarbonato orgánico, equivalente al ácido liberado en una reacción de hidrólisis de éster, por lo que la formación de CO_2 no es una reacción catalizada por la enzima. En nuestro caso sólo podemos medir el 4-NF y por estequiometría asumimos que los otros productos están en la misma concentración. También consideramos que el paso de S a P es irreversible, debido a que la hidrólisis en medios acuosos es esencialmente irreversible y a que la dismutación del bicarbonato orgánico evita la acumulación de uno de los productos de la hidrólisis enzimática (Likhatcheva, 2009). Al igual que con el sustrato 4-NFA, se consideraron las constantes de inactivación térmica de las lipasas para el análisis numérico.

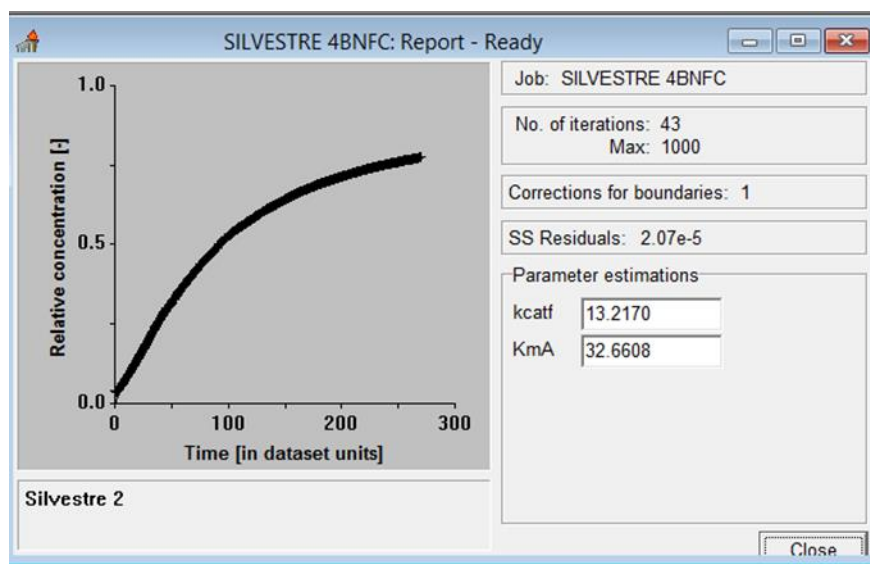


Figura 6.10. Ajuste de datos con el programa *Encora 1.2*. Curva en progreso de una reacción de hidrólisis de B-4NFC por BplAr-6H.

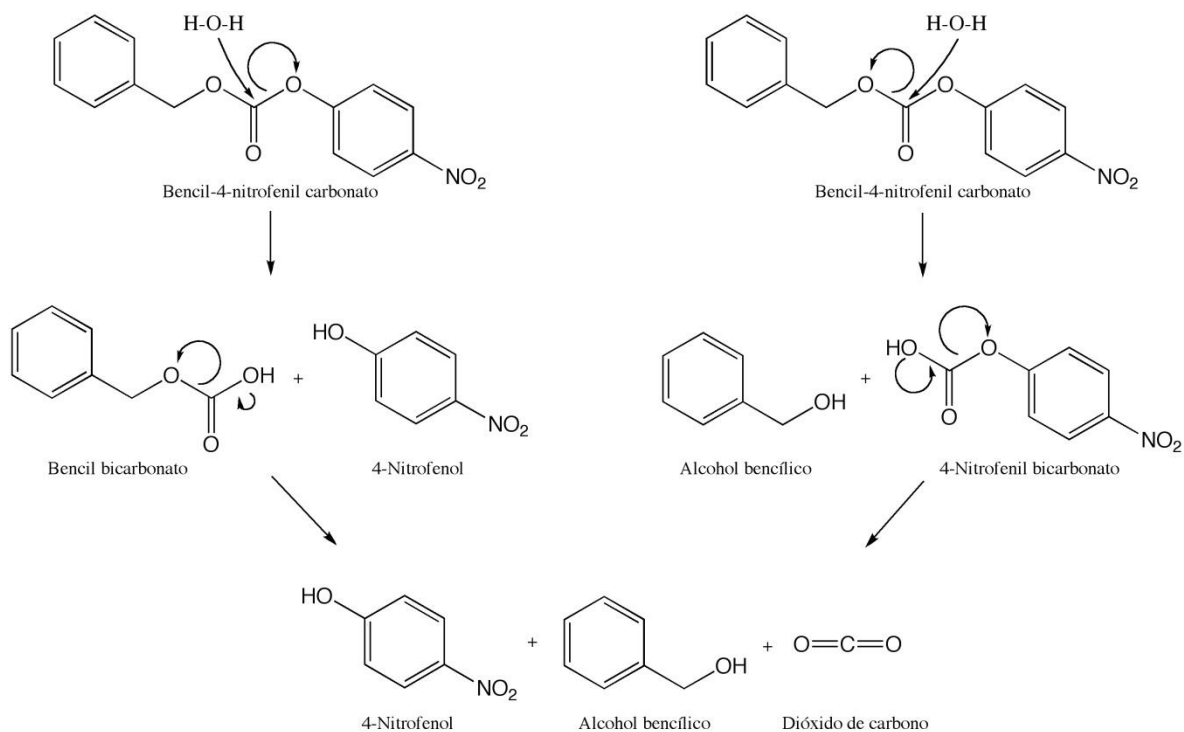


Figura 6.11. Hidrólisis de benzil 4-nitrofenil carbonato. Existen dos vías posibles para esta reacción pero las dos llevan a los mismos productos, 4-NF, alcohol bencílico y CO₂.

Se determinaron los parámetros cinéticos para ambos sustratos, en la tabla 6.6 se presentan los resultados para el sustrato 4-NFA. La mutación Gly80:Ala mejora por muy poco la k_{cat} respecto a la BplAr-6H, mientras que las otras mutantes presentan valores de k_{cat} por abajo del de la enzima parental. No obstante, todos los valores están dentro de un mismo orden de magnitud. En cuanto a su afinidad por el sustrato, la mutación Gly80:Ala tiene un valor similar al de BplAr-6H, mientras que las mutaciones Gly13:Asp y Gly103:Ala disminuyeron el valor de K_m a una quinta parte del valor de la enzima parental. Los valores bajos de K_m para estas últimas mutantes favorecen sus eficiencias catalíticas, aumentándolas incluso por arriba de la enzima parental y de la mutante con la mayor k_{cat} . Estos altos valores de k_{cat}/K_m pueden ser engañosos y no garantizan que sean mejores catalizadores.

Tabla 6.6. Parámetros cinéticos para la hidrólisis del sustrato 4-nitrofenil acetato.

Lipasa	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
BplAr-6H	175.7	1014.8	0.173
BplAr-G80A	201.6	1028.3	0.196
BplAr-G103A	110.8	207.4	0.530
BplAr-G13D	58.6	231.5	0.253

En la tabla 6.7 se presentan los resultados de la caracterización cinética usando como sustrato el B-4NFC. Aquí, la BplAr-6H tiene una k_{cat} de 13.2 min^{-1} y una K_m de $32.7 \mu\text{M}$. La baja k_{cat} se compensa por la gran afinidad de la enzima por este sustrato, aumentando así su eficiencia catalítica. Estos valores concuerdan con lo previamente descrito por Likhatcheva (2009). En contraste, todas las mutantes presentan una k_{cat} mayor que la de BplAr-6H y sus valores de K_m aumentan de forma considerable. La enzima mutante que más destaca es la BplAr-G80A, ya que su k_{cat} es de 262.2 min^{-1} , aproximadamente 20 veces más que la enzima parental. Se sabe que el paso limitante en la velocidad de reacción de proteasas, lipasas y esterases es la desacilación de la enzima. En consecuencia, al haber aumentado la k_{cat} de la enzima con respecto a la enzima parental implica haber acelerado la velocidad de este paso de reacción. Las mutantes BplAr-G103A y BplAr-G13D presentan una eficiencia catalítica muy pobre, con valores $0.084 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ y $0.035 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, respectivamente. Por su parte, la mutante BplAr-G80A presentó una eficiencia catalítica de $0.259 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, valor que se puede considerar comparable al de la BplAr-6H de $0.405 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$.

Tabla 6.7. Parámetros cinéticos con el sustrato benzil 4-nitrofenil carbonato.

Lipasa	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)
BplAr-6H	13.2	32.7	0.405
BplAr-G80A	262.2	1009.7	0.259
BplAr-G103A	85.2	1010.1	0.084
BplAr-G13D	35.7	1031.3	0.035

Se realizaron gráficos para comparar los parámetros cinéticos de las lipasas frente a los dos sustratos, 4-NFA y B-4NFC. En la figura 6.12 se presenta la comparación de los valores de k_{cat} . Resalta que la BplAr-6H tiene una k_{cat} , para el 4-NFA, 13 veces mayor que la correspondiente al B-4NFC. Las mutantes BplAr-G103A y BplAr-G13D, al igual que la BplAr-6H, presentan una mayor capacidad para hidrolizar el 4-NFA, aunque no es tan marcada la diferencia. Por otro lado, la mutación Gly80:Ala produce el valor más alto de k_{cat} para ambos sustratos, y es notable que la k_{cat} para el B-4NFC sea incluso mayor que para el 4-NFA. Es factible que la interacción de Ala80, en esta mutante, con la Thr101 en la hebra $\beta 4$ esté forzando a la Ser77 y a la asa $\beta 4$ - $\alpha 4$, que forma parte del sitio activo, a adquirir una nueva conformación con propiedades catalíticas ligeramente distintas. Esto se podría corroborar por estudios cristalográficos y/o de RMN.

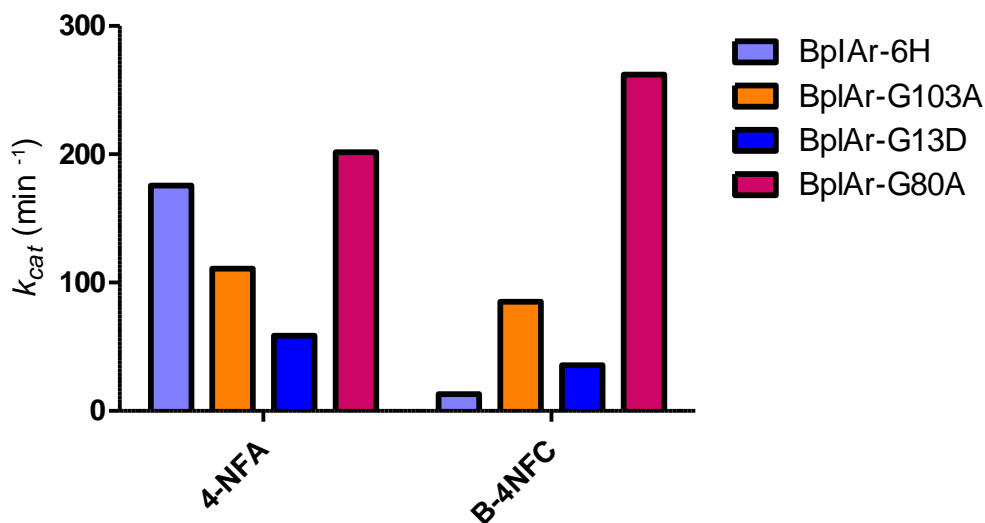


Figura 6.12 Valores de k_{cat} de BplAr-6H y sus mutantes con los sustratos 4-NFA y B-4NFC.

En la figura 6.13 se presenta la comparación de los valores de K_m de las enzimas ensayadas con ambos sustratos. Estos datos también se compararon con los resultados que nos proporcionó el acoplamiento molecular *in silico*, que se encuentran resumidos en la tabla 6.1. De manera experimental se observa que la enzima BplAr-6H presenta una mayor afinidad por B-4NFC, con una K_m 30 veces menor que aquella para el 4-NFA. Este resultado coincide, al menos de forma cualitativa, con el acoplamiento molecular *in silico* previamente hecho; los valores de K_{inh} para la enzima BplAr-6H fueron de 63.71 μM para el B-4NFC y de 1.17 mM para el 4-NFA.

La mutante BplAr-G80A presenta valores similares de K_m para ambos sustratos. Los resultados del acoplamiento molecular indicaron que tendrá una preferencia hacia el B-4NFC, lo cual no coincide con lo encontrado experimentalmente. Cabe destacar que en el acoplamiento molecular *in silico*, el 4-NFA se unió con 88% de frecuencia en la forma productiva (con el C carbonílico del éster a menor distancia del O_γ de la Ser77), mientras que la forma que podría ser la productiva en el caso del B-4NFC, se une con sólo un 42% de frecuencia y presenta otras 9 formas distintas de unión. La opción número 6 en la lista de resultados del acoplamiento

molecular tiene un 2% de frecuencia de unión, con una K_{inh} de 1.21 mM (Figura 6.14). Este valor se asemeja más a su K_m experimental. Sin embargo la distancia entre el C carbonílico del sustrato y el O_γ de la Ser77 indican que esta forma no es productiva. Esta aparente incongruencia entre los valores experimentales de K_m y los valores teóricos de K_{inh} pueden deberse al hecho de haber realizado el acoplamiento molecular con la enzima en forma rígida. Esto implica que se suprime la dinámica de la enzima y sólo se permite que el ligando pueda rotar sus enlaces. Esto suele funcionar muy bien para encontrar sitios de unión pero no es necesariamente bueno para estimar constantes de disociación. El ajuste inducido de las proteínas al unir a su sustrato es conocido y desafortunadamente no lo implementamos en este trabajo por cuestiones de capacidad de cómputo.

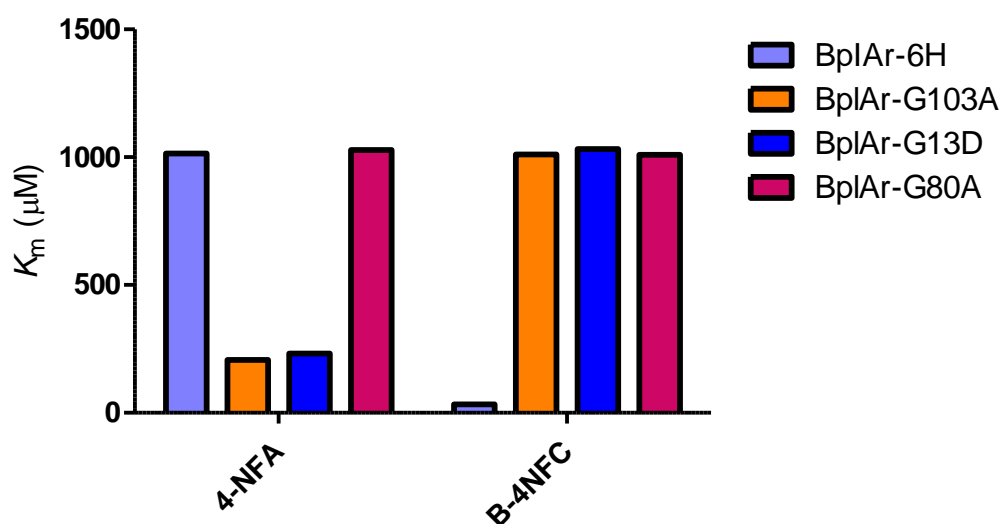


Figura 6.13 Valores de K_m de BpIAr-6H y sus mutantes con los sustratos 4-NFA y B-4NFC.

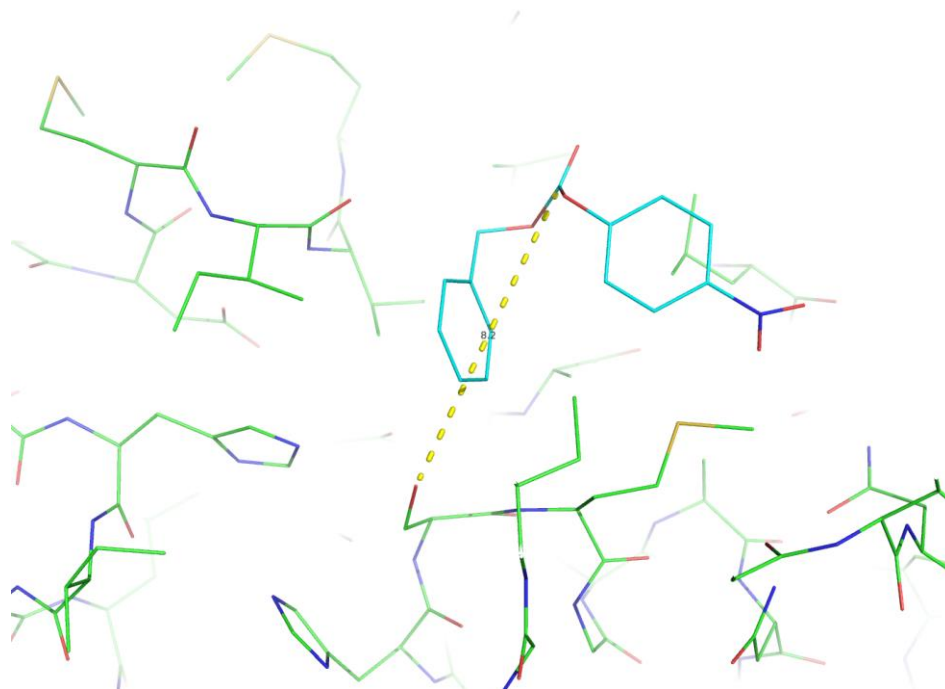


Figura 6.14. Imagen del Pymol. Se muestra una opción de unión para la mutante BpIAR-G80A con el sustrato B-4NFC, con una distancia de 8.2 Å entre el carbono carbonilo del sustrato y el O γ la serina catalítica de la lipasa.

Los valores de K_m para las mutantes BpIAR-G103A y BpIAR-G13D presentan compartimientos similares, con una afinidad 5 veces mayor por el 4-NFA que por el B-4NFC. Es probable que el aumento en el tamaño de la cadena lateral tanto en la mutación Gly13:Asp como en la Gly103:Ala permita establecer nuevas interacciones con el 4-NFA, mejorando así sus valores de K_m . Nuevamente, los valores experimentales de K_m no coinciden con lo observado por acoplamiento molecular *in silico*. Es evidente que el resultado experimental prevalece sobre cualquier simulación por computadora, de las que ya comentamos algunas de sus limitaciones.

La diferencia entre las eficiencias catalíticas de las enzimas estudiadas con los dos sustratos se encuentra representada en la figura 6.15. Se observa que la lipasa BpIAR-6H presenta una mayor eficiencia catalítica que cualquiera de sus mutantes para el B-4NFC. Este valor puede ser engañoso ya que para esta lipasa

se obtuvo una k_{cat} de tan solo 13.2 min^{-1} , lo cual indica que a concentraciones altas de sustrato, su velocidad de conversión de sustrato estará limitada por la propia k_{cat} . La eficiencia catalítica sólo tiene sentido, para fines de productividad catalítica, a bajas concentraciones de sustrato. Esto es, cuando en un gráfico de velocidad inicial vs concentración de sustrato, el comportamiento es lineal. De hecho, k_{cat}/K_m es la constante de pseudoprimer orden que define la pendiente de la recta en esta zona de la gráfica. De este modo, si se quiere evaluar la eficiencia de una enzima como catalizador, es necesario tomar en cuenta la concentración de sustrato en el proceso.

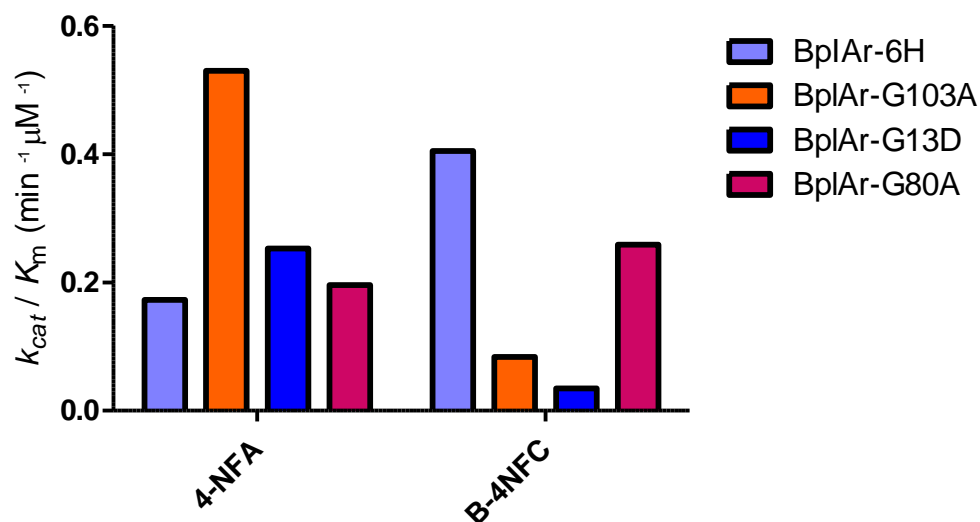


Figura 6.15. Valores de k_{cat}/K_m de BplAr-6H y sus mutantes con los sustratos 4-NFA y B-4NFC.

En conjunto, no podemos decir que hemos entendido cómo funciona el sitio activo de la lipasa de *B. pumilus* GMA1. Sin embargo esta exploración de su plasticidad nos da idea de lo intrincado de las correlaciones entre los propios residuos del sitio activo. Una de las mutaciones más interesantes fue la Gly80:Ala, que aumentó significativamente la k_{cat} de la enzima por el B-4NFC. Esta mutación ni siquiera está dentro del sitio activo. Es evidente que los efectos a larga distancia también

deben ser considerados en la ingeniería de proteínas. La enantioselectividad de estas enzimas está siendo estudiada de forma paralela a este trabajo y se tienen resultados interesantes. En un futuro esperamos contar con suficiente información para finalmente poder decir que entendemos el sitio activo de esta enzima.

Capítulo 7. Conclusiones y Perspectivas

7.1 Conclusiones

- Se generaron las mutantes BplAr-G13K, BplAr-N18S, BplAr-G80A, BplAr-G103A y BplAr-G13D por mutagénesis sitio-dirigida. Las enzimas se expresaron y purificaron de forma similar a la enzima parental, BplAr-6H, teniendo rendimientos similares.
- Se evaluó la estabilidad térmica de las lipasas BplAr-6H, BplAr-G13K, BplAr-N18S, BplAr-G80A, BplAr-G103A y BplAr-G13D a 25°C. Las mutantes BplAr-G13K y BplAr-N18S se desactivaron rápidamente, por lo que se descartó su uso para la caracterización cinética. Las mutantes BplAr-G80A, BplAr-G103A y BplAr-G13D mejoraron su vida media respecto a la lipasa BplAr-6H. La mutación Gly80:Ala aumentó más de cuatro veces la vida media de la enzima.
- La lipasa BplAr-6H mostró mayor afinidad por B-4NFC que por 4-NFA. Igualmente fue la que mayor afinidad presentó por el B-4NFC. La mutante BplAr-G80A tiene un efecto relevante ya que aumenta en un 12% la k_{cat} con el 4-NFA y 20 veces más ante el B-4NFC. Las mutantes BplAr-G103A y BplAr-G13D mejoraron también su k_{cat} para la hidrólisis del B-4NFC, con respecto a la BplAr-6H.
- Las mutantes BplAr-G103A y BplAr-G13D aumentaron la afinidad por el 4-NFA respecto a BplAr-6H.

7.2 Perspectivas

- Barrer las posiciones encontradas con otros residuos de aminoácido para evaluar el efecto de la naturaleza química de la cadena lateral sobre las constantes cinéticas.

- Generar otras mutantes que permitan establecer otras posiciones críticas para la catálisis.
- Observar el efecto de las mutaciones en la cinética del estado preestacionario de la enzima para entender qué paso del mecanismo cinético y catalítica está siendo afectado por la mutación.

Bibliografía

1. Acharya, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R., Rao, N.M. (2004). "Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase". *J. Mol. Biol.* 341:1271-1281.
2. Akbulut, N., Tuzlakoğlu Öztürk, M., Pijning, T., İşsever Öztürk, S., Gümüsel, F. (2013). "Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution". *J. Biotechnol.* 164(1):123-129.
3. Alcántara, M.P. (2009). "Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano". Tesis de Maestría, Ciencias Bioquímicas, UNAM.
4. Arpigny, J. L., Jaeger, K. E. (1999). "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties". *Biochem. J.* 343:177-183.
5. Augustyniak, W., Brzezinska, A.A., Pijning, T., Wienk, H., Boelens, R., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (2012). "Biophysical characterization of mutants of *Bacillus subtilis* lipase evolved for thermostability: Factors contributing to increased activity retention". *Protein Sci.* 21:487-497.
6. Boersma, Y. L., Dröge, M. J., van der Sloot, A.M., Pijning, T., Cool, R.H., Dijkstra, B. W., Quax, W. J. (2008). "A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A". *Chembiochem.* 9(7):1110-1115.
7. Brzozowski, A., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G., Lawson, D., Turkenburg, J., Bjorkling, F., Hüge-Jensen, B., Patkar, S., Thim, L. (1991)." A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex". *Nature.* 351:491-494.
8. Bustos, I. (1995). "Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasas proveniente de un ambiente extremo". Tesis de Licenciatura, UNAM.
9. Bustos, I. (1998). "Análisis del gen que codifica para la lipasa de *B. pumillus* GMA1". Tesis de Maestría, UNAM.
10. Bustos, I., Mora, R., Calcagno, M., Farrés, A. (2010). "Kinetic studies of Gly28: Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: changes in k_{cat} and thermal dependence". *Biochim. Biophys. Acta.*1804(12):2222-2227
11. Cheetham, P. (1995). "Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing". *Handbook of enzyme biotechnology.* UK Elis Horwood. pp. 83-234.
12. Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K., Colson, C. (1992). "Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gen from *Bacillus subtilis* 168". *Biochim. Biophys. Acta.* 1131:253-260.
Dartois, V., Coppe, J. Y., Colson, C., Baulard, A. (1994). "Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*". *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1670-1673.
13. Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M., Derewenda, Z. S. (1992). "Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase." *Biochemistry.* 31(5):1532-1541.
14. Derewenda, Z. S., Sharp, A. M. (1993) "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases". *Trends Biochem. Sci.* 18:20-25.

15. Derewenda, Z. S., Derewenda, U., Dodson, G. G. (1992). "The Crystal and Molecular Structure of the *Rhizmmaw miehei* Triacylglyceride Lipase at 1.9 Å Resolution". *J. Mol. Biol.* 227:818-839.
16. Detry, J., Rosenbaum, T., Lutz, S., Hahn, D., Jaeger, K. E., Muller, M., Eggert, T. (2006). "Biocatalytic production of enantiopure cyclohexane-trans-1,2-diol using extracellular lipases from *Bacillus subtilis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:1107-1116.
17. Dharmsthiti, S., Luchai, S. (1996). "Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL027". *FEMS Microbiology Letters.* 179(2):241-246.
18. Dröge, M. J., Boersma, Y. L., van Pouderooyen, G., Vrenken, T. E., Rüggeberg, C. J., Reetz, M. T., Dijkstra, B. W., Quax, W. J. (2006). "Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and phage display selection". *ChemBiochem.* (1):149-157.
19. Funke, S. A., Otte, N., Eggert, T., Bocola, M., Jaeger, K. E., Thiel, W. (2005)." Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution". *Protein Eng Des Sel.* (11):509-514.
20. Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., and Cygler, M. (1994). "Two conformational status of *Candida rugosa* lipase". *Protein Sci.* 3:82-91.
21. Hasan, F., Shah, A. A., Hameed A. (2006). "Industrial applications of lipases". *Enzyme and Microbial Technology.* 39:235-351.
22. Halgren T. A. (1998). "Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parametrization, and performance of MMFF94". *Journal of Computational Chemistry* 17(5-6):490-519.
23. Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (1999). "Bacterial Biocatalysts: Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases". *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315-351.
24. Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998). "Microbial lipases from versatile tools for biotechnology". *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
25. Kamal, M.Z., Ahmad, S., Molugu, T.R., Vijayalakshmi, A., Deshmukh, M.V., Sankaranarayanan, R., Rao, N.M. (2011)." In vitro evolved non-aggregating and thermostable lipase: structural and thermodynamic investigation". *J.Mol.Biol.* 413: 726-741.
26. Kawasaki, K., Kondo, H., Suzuki, M., Ohgiya, S., Tsuda, S. (2002). "Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution". *Acta Crystallogr., Sect.D.* 58:1168-1174.
27. Kim, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B., Oh, T. K. (2002). "Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26". *Biochim. Biophys. Acta.* 1583:205-212.
28. Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K., Suh, S. W. (1997). "The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveal a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor". *Structure.* 5:173-185.

29. Kumar, A. and Gross, R. A. (2000). "Candida antarctica Lipase B-Catalyzed Transesterification: New Synthetic Routes to Copolyesters". *J. Am. Chem. Soc.* 122:11767-11770.
30. Lesuisse, E., Schanck, K., Colson, C. (1993). "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme". *Eur. J. Biochem.* 216:155-160.
31. Likhatcheva, M. (2009). "Caracterización cinética de la hidrólisis de benzil-4-nitrofenil carbonato con la lipasa recombinante de *Bacillus Pumilus* GMA1". Tesis de Licenciatura, UNAM.
32. Moller, B., et al. (1991). "Alcaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and *bacillus* which produce these lipases". Patente internacional WO 91/16422.
33. Mora, R. (2008). "Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumillus* GMA1". Tesis de Maestría, UNAM.
34. Morris, G. M., Goodsell, D. S., et al. (1998)." Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function". *Journal of Computational Chemistry.* 19(14):1639-1662.
35. Nthangeni, M. N., Patterton, H., van Tonder, A., Vergeer, W., Litthauer, D. (2001). "Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report of *Bacillus* lipases". *Enzyme Microb. Technol.* 28(7-8):705-712.
36. O'Connor, K. C., Bailey, J. E. (1988). "Hydrolysis of emulsified tributyrin by porcine pancreatic lipase" *Enzyme Microb. Technol.* 10:352-356.
37. Ollis, D. L., She, E., Cyger, M., Dijkstra, B., Frolow, F., et al. (1992). "The α/β hydrolase fold". *Protein Eng.* 5:197-211.
38. Papworth, C., Bauer, J., Braman, J., Wright, D. (1996) Site-directed mutagenesis in one day with >80% efficiency. *Strategies.* 9:3-4.
39. Santillan H., (2012). "Estudio de la enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de *Bacillus pumilus*". Tesis de Licenciatura, UNAM.
40. Sarda, L., Desnuelle, P. (1958). "Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion". *Biochim. Biophys. Acta.* 30:513-521.
41. Schrag, J. D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., et al. (1997). "The open conformational of a *Pseudomonas* lipase". *Structure.* 5:187-202.
42. Solis, F. J., Wets, R. J. B. (1981). "Minimization by Random Search Techniques". *Mathematics of Operations Research* 6 (1): 19-30.
43. Straathof, A. J. J. (2001). "Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve analysis". *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* 11:991-998.
44. van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E., Dijkstra, B. W. (2001). "The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme". *J. Mol. Biol.* 309:215-226.
45. van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martínez, C., Rugani, N., Verger, R., et al. (1993). "Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography". *Nature.* 362:814-820.

46. Verger, R. (1997). "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts". *Trends Biotechnol.* 15:32-38.
47. Willeman, W. F., Hanefeld, U., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J. (2000). "Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase". *Enzyme Microb. Technol.* 27:423-433.
48. Wong, P. (2001). "Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades". Tesis de Licenciatura, UNAM.

Anexo 1

Solución amortiguadora para “lisis/lavados”:

- Fosfato de potasio 35 mM
- NaCl 300 mM
- Imidazol 10 mM
- pH 6.3

Solución amortiguadora para “último lavado”:

- Fosfato de potasio 30 mM
- NaCl 300 mM
- Imidazol 75 mM
- pH 6.3

Solución amortiguadora para “elución”:

- Fosfato de potasio 30 mM
- NaCl 300 mM
- Imidazol 130 mM
- pH 6.3

Solución amortiguadora para “limpieza”:

- Fosfato de potasio 30 mM
- NaCl 300 mM
- Imidazol 275 mM
- pH 6.3

Anexo 2

Protocolo para la regeneración de la resina:

- Adicionar a la columna 20 ml de una solución de GuHCl 6 M con 0.2 M de ácido acético.
- Adicionar 50 ml de agua desionizada.
- Adicionar 30 ml de una solución de SDS al 2%.
- Adicionar 50 ml de agua desionizada.
- Adicionar 50 ml de etanol.
- Adicionar 50 ml de agua desionizada.
- Adicionar 50 ml de una solución de EDTA 100 mM; pH 8.
- Adicionar 50 ml de agua desionizada.
- Adicionar 50 ml de una solución de NiSO_4 100 mM.
- Adicionar 100 ml de agua desionizada.

Anexo 3

Curva patrón BCA

Albumina (μL)	Agua (μL)	SDS 10% (μL)	Ácido bicinconinico (9.8mL) CuSO ₄ 4% (0.2 mL) (μL)
0	100	5	900
20	80	5	900
40	60	5	900
60	40	5	900
80	20	5	900
100	0	5	900

- Se mide a una absorbancia de 562 nm