



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CARBOXILESTERASAS DE *BACILLUS PUMILUS* GMA1 Y SU APLICACIÓN EN BIOCATÁLISIS

T E S I S

MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

DANER GALINDO DURÁN A N

VICTORIA ALVAREZ OLIVARES



México, D.F.

2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

A la UNAM por habernos formado y colmado de conocimiento y gratas experiencias.

A la Dra. Amelia Farrés por todo el apoyo y entusiasmo brindado para la realización de esta tesis, por compartir su experiencia, conocimiento, por ser una mujer ejemplar y estar siempre dispuesta a nuevos retos.

A la M en C. Carolina Peña Montes por el apoyo técnico sin el cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo, por la paciencia y dedicación para transmitir el conocimiento a los demás, por su amistad y confianza a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina por su colaboración en la secuenciación de proteínas, por el interés que siempre mostró y un especial agradecimiento por compartirnos su valioso conocimiento.

Al Dr. Ismael Bustos de la Facultad de Medicina por compartir sus anécdotas y experiencias con *Bacillus pumilus* GMA1. Un agradecimiento por dejarnos trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán por sus valiosas aportaciones y constante apoyo.

Al M en C. Augusto Gonzáles por su contribución en el proceso de purificación.

“Que la comida sea tu alimento y el alimento sea tu medicina.”

– Hipócrates

“Teoría es cuando se sabe todo y nada funciona; práctica, cuando todo funciona y nadie sabe
porque.”

– Anónimo

“Nuestro quehacer en la vida no consiste en superar a otros sino en superarnos a nosotros mismos,
romper nuestros propios récords, sobrepasar nuestro pasado con nuestro presente.”

– Stewart Johnson

*“A mi mamá dedico este trabajo
con profundo amor y gratitud.
Por darme una vida llena de sorpresas,
felicidad y buenos consejos”.*

A mi familia por darme siempre amor en abundancia.

A mis hermanos por la dicha que con ellos comparto.

A mis amigos por ser y estar.

En memoria de mis grandes ejemplos.

Victoria Alvarez Olivares

Dedicada a:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrir la puerta a un nuevo y maravilloso mundo.

Con mucho amor a mis padres por ser el motor que me lleva hasta donde yo quiera.

A mis amigos por ser el sazón de mi vida.

Gracias, muchas gracias a todos ustedes.

Dafne Galindo Durán.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO
VOCAL: Profesor: AMELIA MARIA DE GUADALUPE FARRES GONZALES SARAVIA
SECRETARIO: Profesor: FRANCISCO RUIZ TERAN
1er. SUPLENTE: Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
2° SUPLENTE: Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LAB 312 CONJUNTO E.
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM

ASESOR DEL TEMA: DRA. AMELIA MARIA DE GUADALUPE FARRES GONZALES SARAVIA
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M EN C. CAROLINA PEÑA MONTES
(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): DAFNE GALINDO DURÁN Y VICTORIA ALVAREZ OLIVARES
(nombre (s) y firma (s))

	Página
1. Resumen	7
2. Abreviaturas	9
3. Introducción	11
4. Marco Teórico	14
4.1 Enzimas y su importancia en el sector de alimentos.....	14
• Aplicación en biocatálisis.....	14
• Desarrollo de biocatalizadores.....	14
• Inmovilización.....	15
• Carboxilesterasas.....	16
• Estructura de las carboxilesterasas.....	16
• Clasificación de las carboxilesterasas.....	18
• Importancia económica.....	21
• Importancia de lípidos funcionales.....	22
• Importancia de antioxidantes.....	23
4.2 Microorganismos productores de enzimas.....	26
• Importancia de microorganismos extremófilos.....	26
• El género <i>Bacillus</i>	26
• Características del género <i>Bacillus</i>	26
• Enzimas del género <i>Bacillus</i>	27
• Carboxilesterasas de <i>B. pumilus</i>	28
4.3 Purificación de proteínas.....	29
4.4 Caracterización cinética.....	31
5. Antecedentes	33
• <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	33
• Lipasa termorresistente	34
• Antecedentes de uso de la lipasa de <i>B. pumilus</i> GMA1 en biocatálisis.....	35
• Optimización del medio de cultivo.....	35
• Reacciones preliminares.....	36
6. Justificación y objetivos	37
7. Material y métodos	39
• Reactivos.....	39
7.1 Diseño experimental.....	41
7.2 <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 y su conservación.....	42
• Método de conservación en glicerol.....	42
• Método de conservación en esporas.....	42
7.3 Reactivación de la cepa y verificación morfológica de <u><i>Bacillus pumilus</i> GMA1</u>	42
• Verificación de actividad enzimática.....	43

7.4 Producción de la enzima.....	43
• Concentración del extracto por liofilización.....	44
• Ultrafiltración de la muestra para electroforesis e Isoelectroenfoque (IEF).....	44
7.5 Métodos de determinación de proteína y actividad enzimática.....	44
7.6 Electroforesis.....	45
• Preparación de los geles de electroforesis.....	45
• Tratamiento de la muestra para geles de electroforesis.....	45
• Tinciones para geles de electroforesis.....	45
• Renaturalización enzimática.....	46
• Revelado de la actividad enzimática.....	46
• Ensayo de renaturalización con detergentes.....	47
• Secuenciación de la proteína.....	48
7.7 Purificación. Filtración en gel.....	48
• Acondicionamiento de la muestra.....	48
• Filtración en gel (Sephacryl S-300®).....	49
• Evaluación de la actividad enzimática de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel.....	49
• Concentración de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel por liofilización.....	49
7.8 Purificación. Intercambio aniónico.....	49
• Acondicionamiento de la muestra.....	49
• Intercambio Aniónico (Mono Q®).....	50
• Evaluación de la actividad enzimática de las fracciones recolectadas después del intercambio aniónico.....	50
• Concentración de las fracciones recolectadas después del intercambio aniónico por ultrafiltración.....	50
• Determinación de punto isoeléctrico (IEF) de las fracciones recolectadas después del intercambio aniónico.....	51
7.9 Caracterización de las proteínas.....	51
• Efecto del largo de cadena en la actividad enzimática.....	52
• Efecto del pH en la actividad enzimática.....	52
• Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.....	53
7.10 Inmovilización de la enzima.....	53

7.11 Reacciones de síntesis e hidrólisis con el biocatalizador.....	53
• Reacciones de transesterificación e hidrólisis en presencia del biocatalizador.....	53
• Productos de reacción.....	54
8. Resultados y Discusión.....	55
8.1 Caracterización morfológica del microorganismo.....	55
8.2 Determinación de actividad enzimática y electroforesis del extracto crudo.....	56
8.3 Ensayo de renaturalización enzimática con detergentes.....	59
8.4 Purificación por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl-300®).....	60
• Cromatograma	60
• Determinación de actividad enzimática cualitativa de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel.....	61
• Concentración de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel y determinación de actividad enzimática.....	61
• Electroforesis en gel SDS-PAGE de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel.....	63
• IEF de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel.....	65
8.5 Purificación por cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q®).....	66
• Cromatograma de las fracciones salientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®).....	66
• Determinación de actividad enzimática cualitativa de las fracciones recolectadas después de la columna de intercambio aniónico.....	67
• Determinación de actividad enzimática cuantitativa de las fracciones recolectadas después de la columna de intercambio aniónico.....	68
• Electroforesis en gel de SDS-PAGE de las fracciones recolectadas después de la columna de intercambio	70

aniónico.....	
• Determinación de punto isoelectrico (IEF) de las fracciones A y B recolectadas después de la columna de intercambio aniónico.....	72
8.6 Caracterización de las enzimas.....	74
• Efecto de longitud de cadena en la actividad enzimática.....	74
• % Actividad Relativa.....	75
• Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.....	76
• Efecto del pH en la actividad enzimática.....	77
8.7 Reacciones con el biocatalizador.....	78
• Separación de los productos de reacción de transesterificación por CCF.....	78
• Separación de los productos de reacción de hidrólisis por CCF.....	79
9. Conclusiones.....	81
10. Perspectivas.....	83
11. Referencias.....	84
12. Anexos.....	92
• Anexo I.....	92
Determinación de proteína soluble por el método de BCA	
Determinación de actividad enzimática	
• Anexo II	94
Métodos de determinación de proteína y actividad enzimática	
• Anexo III (Técnicas de purificación).....	96
• Anexo IV (Secuencia SOD).....	99
13. Índice de Tablas.....	100
14. Índice de Figuras.....	101

1. RESUMEN

Enzimas con actividad sobre diferentes tipos de lípidos han adquirido relevancia en el campo de biocatálisis, específicamente en el área de alimentos. En el presente trabajo se hizo la caracterización de dos carboxilesterasas producidas por *Bacillus pumilus* GMA1 en un medio enriquecido con aceite de olivo como inductor (Ibáñez, 2007) y se determinaron sus propiedades para identificar posibles aplicaciones.

Se encontró actividad lipolítica o esterolítica en la zona de 140-160 kDa, que no corresponde a la enzima reportada anteriormente por Bustos (1995), cuyo peso es de 21 kDa. Se secuenció una banda de proteína en este peso molecular y se observó la presencia de una superóxido dismutasa. Se procedió a la purificación del extracto crudo mediante filtración en gel e intercambio aniónico, en donde se identificaron dos enzimas con puntos isoeléctricos diferentes (9.03 Y 5.38), ambas con actividad de carboxilesterasas. Para la primera enzima se logró un factor de purificación de 9.78 y para la segunda de 12.73.

Se hizo una caracterización cinética de ambas enzimas de acuerdo a su perfil de actividad dependiendo de la longitud de cadena hidrolizada con diferentes *p*-nitrofenil ésteres: acetato, butirato y laurato. También se estudiaron las condiciones óptimas de pH (5, 7.2, 9 y 10) y temperaturas de 20, 30 y 45°C.

Se observó la preferencia de la hidrólisis sobre *p*-nitrofenil éster de cadena larga (*p*-nitrofenil laurato) para ambas enzimas. Al determinar actividad enzimática con un sustrato de cadena corta como *p*-nitrofenil acetato, la fracción de punto isoeléctrico de 9.03 presentó 13 veces mayor actividad en comparación con la fracción de punto isoeléctrico de 5.32, ambas bajo las mismas condiciones de reacción: pH de 7.2 y 30°C.

De acuerdo a la actividad enzimática determinada con *p*-nitrofenil laurato como sustrato, las dos enzimas presentan un máximo de actividad a pH de 7.2 y

30°C. La enzima con punto isoeléctrico de 9.03 mostró una temperatura óptima a 30°C con un decaimiento en la actividad a mayores temperaturas, mientras que la enzima con punto isoeléctrico de 5.32 se mostró estable al ser sometida a temperaturas mayores a 35°C.

Adicionalmente el extracto crudo producido en el medio optimizado se inmovilizó en un soporte microporoso de polipropileno (Accurel® MP1000). Con este catalizador fue posible llevar a cabo la síntesis de ácido linoleico conjugado con tricaprilina así como la desacetilación de ácido ferúlico, para la obtención de antioxidantes, ambos de interés en alimentos, demostrando la posible aplicación de las carboxilesterasas encontradas.

2. ABREVIATURAS

μ	Micra
μM	Micromolar
μL	Microlitros
®	Marca registrada
° C	Grados celsius
ADN	Acido desoxiribonucleico
AGL	Acidos grasos libres
APS	Persulfato de amonio
A _w	Actividad de agua libre
BCA	Acido bicinconíico
BHI	Infusión cerebro corazón
BSA	Albúmina bovina sérica
c/	con
Cat.	Catálogo
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
CCF	Cromatografía en capa fina
CLA	Ácido linoleico conjugado
D O	Densidad óptica
DTT	Ditioitreitól
FPLC	Fast proteína liquid chromatography
g	Gramos
h	Horas
HPLC	High performance liquid cromatography
IEF	Isoelectroenfoque
kDa	Kilodaltones
L	Litros
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NE	No especificado
nm	Nanómetros
P	Proteína
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
p-NF	Paranitrofenol
p-NFA	Paranitrofenil Acetato
p-NFB	Paranitrofenil Butirato
p-NFL	Paranitrofenil Laurato
rpm	Revoluciones por minuto
Rf	Running factor. Coeficiente de migración
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SL's	Lípidos funcionales
SOD	Superóxido dismutasa
T	Temperatura
TCA	Ácido tricloro acético
TGA	Triacilglicéridos
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
UF	Ultrafiltración
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volts
v/v	Volumen/Volumen

3. INTRODUCCIÓN

La enzimología ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones en la industria alimentaria. Los microorganismos extremófilos y sus enzimas son de particular interés industrial ya que permiten simplificar las condiciones de los procesos (Ferrer, 2007) y su estudio ha sido enfocado particularmente en sus propiedades bioquímicas como por ejemplo, la dependencia de calcio sobre su actividad, pH y temperatura (Arpigny, 1999). Las enzimas termoestables desempeñan un papel fundamental en varios procesos industriales y sus aplicaciones no han sido explotadas en su totalidad (Foresti, 2005).

La producción de una enzima por los métodos de la biotecnología clásica incluye dos etapas principales: la de fermentación, en la que se multiplica el microorganismo productor de la enzima, y la de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso (Sunil, 2005).

Tabla 1. Tipos de enzimas y su aplicación en industria de alimentos

<i>Enzima</i>	<i>Descripción</i>	<i>Aplicaciones</i>
Amilasas	Hidrólisis enlaces glucosídicos	Cervecería, panadería, hidrólisis de lactosa, clarificación de jugos
Proteasas	Hidrólisis de proteína	Cervecería, panadería
Xilanasas	Degradación enzimática de polisacáridos como la hemicelulosa	Jarabes de alta fructosa y alta glucosa
Ciclodextrin-glicosil transferasas	Degradación de almidón por reacciones de ciclización y desproporción	Solubilización del almidón, panadería
DNA-polimerasas	Polimerización del DNA	Análisis por PCR
Carboxilesterasas	Hidrólisis de lípidos, acidólisis, transesterificación, síntesis de ésteres, reacciones de desacetilación	Producción de ácidos grasos libres y glicerol, síntesis de ésteres, síntesis de compuestos con actividad antioxidante y modificación de grasas y aceites

(Casimir, 2006).

Las bacterias producen diferentes clases de carboxilesterasas incluyendo las lipasas y esterasas (EC 3.1.1.1). Estas últimas tienen la capacidad de hidrolizar pequeños ésteres parcialmente solubles en el agua (Arpigny, 1999). Se

encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos (Weete, 2002).

Los triacilgliceroles de cadenas largas son los sustratos naturales de las lipasas debido a sus características hidrófobas que les dan la capacidad de formar agregados o dispersiones en medios acuosos (Virinder, 1998). Sin embargo, se ha demostrado que estas enzimas pueden catalizar reacciones con otros solventes, lo que ha derivado su uso en el área de síntesis orgánica donde son frecuentemente utilizadas debido a su estabilidad y disponibilidad. El producto de sus reacciones depende directamente de la longitud de la cadena hidrolizada y del grado de hidrólisis del sustrato.

La especificidad posicional así como la actividad en solventes orgánicos son características importantes para la aplicación industrial y analítica de las carboxilesterasas (Dalla, 2008). Son empleadas en la síntesis de compuestos puros, perfumes y antioxidantes (Panda, 2005). El producto de sus reacciones depende directamente de la longitud de la cadena hidrolizada y del grado de hidrólisis del sustrato.

Una posible limitación del uso de enzimas es su inestabilidad a temperatura, pH o a los propios solventes, que se traduce en una vida media corta (Liese, 2000). Una estrategia para evitar estos problemas ha sido buscar enzimas de utilidad en microorganismos adaptados a ambientes extremos (extremófilos, que pueden ser termófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos, etc.) (Ferrer, 2007). Por otra parte, si las enzimas se usan en lote, todos los esfuerzos de producción del catalizador representan un alto costo.

La fijación de la enzima en una matriz sólida evita la contaminación de la enzima y permite la recuperación del biocatalizador, reutilización y operación continua, lo que disminuye considerablemente el costo de proceso.

En general, la matriz le confiere a la enzima una estructura más rígida y estabilidad térmica, así como en algunos casos un incremento en actividad (Foresti, 2007).

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Enzimas y su importancia en el sector de alimentos

Las enzimas son un tipo de proteínas presentes y esenciales en los organismos vivos. Actúan como catalizadores incrementando la velocidad de las reacciones químicas sin sufrir un cambio permanente en ellas mismas. No son consumidas en la reacción y por lo tanto continúan catalizando la reacción siempre y cuando los sustratos estén disponibles. La cinética de las reacciones que emplean biocatalizadores es similar a aquella reacción no enzimática, exceptuando que las enzimas tienen una manera única de acelerar la reacción, al acercar los sustratos para promover la reacción química.

El conocimiento de las enzimas y el de cómo usarlas en el procesamiento de alimentos se ha vuelto significativamente más sofisticado. Entre más condiciones de producción son requeridas, mayores serán los requerimientos para resolver los problemas específicos de producción (Mathewson, 1998).

Aplicación en biocatálisis

Las enzimas en biocatálisis son consideradas de gran utilidad para la obtención de compuestos puros. Las carboxilesterasas se encuentran entre las más utilizadas, no solo debido a su bajo costo, sino también a su disponibilidad a partir de diversas fuentes. En general han demostrado ser altamente selectivas durante las reacciones de síntesis de ésteres y desacetilación, además de mostrarse estables en solventes orgánicos (Liese, 2000).

Desarrollo de biocatalizadores

Para el desarrollo de un biocatalizador se emplean extractos crudos debido a que la actividad de interés se complementa por diferentes enzimas contenidas en el extracto, además de que el desarrollo de biocatalizadores con extracto crudo representa menor costo puesto que la purificación a escala industrial requiere una alta inversión. Sin embargo las enzimas catalizan reacciones de una manera más eficiente cuando se purifican, además de que su

caracterización sólo es posible cuando están libres de otras actividades enzimáticas, por lo cual es necesario extraer y homogeneizar las que se encuentran en el interior celular, o precipitar y concentrar las secretadas al medio de cultivo (Degrassi, 1998).

Inmovilización

La inmovilización de enzimas permite una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y otras muchas aplicaciones (He, 2006).

Tabla 2. Ventajas y desventajas del uso de enzimas inmovilizadas

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Aumento de la estabilidad de la enzima	La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo
Posible reutilización del derivado	Gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte
Posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada	Suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización
Disminución de los costos del proceso	El biocatalizador implica un incremento de costos (Arroyo, 2001).

La inmovilización de lipasas tanto de fuentes animales como microbianas se ha llevado a cabo mediante distintos métodos:

Tabla 3. Comparación de los diferentes métodos de inmovilización

<i>Método</i>	<i>Inclusión en Membrana</i>	<i>Atrapamiento</i>	<i>Reticulada</i>	<i>Adsorción química</i>	<i>Unión covalente</i>
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de Unión	Débil	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-Alta	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración	Posible	Imposible	Imposible	Posible	Difícil

del soporte					
Costo del proceso	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	Baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Si	Si	Si	No	No

(Arroyo, 2001).

Algunos autores han sugerido que ciertos materiales hidrofóbicos son adecuados para la inmovilización de carboxilesterasas, puesto que frecuentemente contienen regiones ricas en aminoácidos no polares, así como por el tipo de sustratos que emplean, muchos de ellos de interés para la industria alimentaria (Montero, et. al., 1993).

Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de un éster carboxílico y se obtienen como subproductos un alcohol y un carboxilato. Las lipasas catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en medio acuoso y actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilglicerolos para liberar ácidos grasos y glicerol. Se considera que cadenas a partir de diez átomos de carbono son sustratos para lipasa, mientras que la hidrólisis de cadenas menores a diez carbonos usualmente indica la presencia de una esterasa. Sin embargo, cabe resaltar que la mayoría de las lipasas son capaces de hidrolizar sustratos característicos de esterasas.

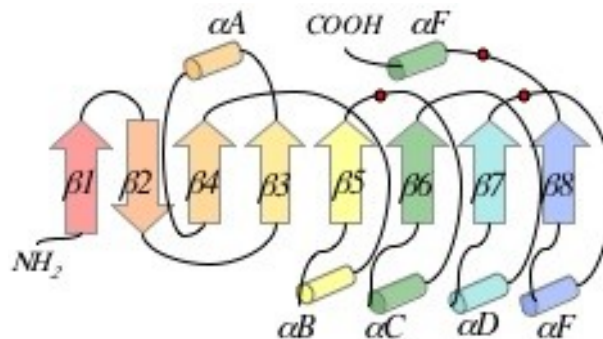
Estructura de las carboxilesterasas

En general, el patrón de plegamiento de las carboxilesterasas es una estructura α/β , formada de una estructura central β con 8 hojas paralelas, excepto la segunda, que es antiparalela (Jaeger y Reetz, 1999). Las secciones β_3 a β_8 están conectadas con α hélices, las cuales están unidas a cada lado de la hoja β central. De acuerdo a estudios de cristalografía de rayos X, se sabe que el sitio catalítico se encuentra en el grupo carboxilo terminal de la hoja β central que consiste en una tríada catalítica formada por un residuo nucleófilo (serina, cisteína o aspartato), un residuo catalítico ácido (aspartato o

glutamato), y un residuo de histidina, siempre en este orden de secuencia de aminoácidos.

En las lipasas invariablemente se ha encontrado que el nucleófilo es el residuo de serina, mientras que la región catalítica tiene un residuo de aspartato o glutamato. El residuo de serina está localizado en un pentapéptido altamente conservado (Gly-x-Ser-x-Gly) y tiene una conformación de ($\phi=62^\circ$, $\psi=-121^\circ$), compuesta de una cadena β seguida de un giro que contiene este arreglo, que presenta el residuo de serina y en seguida una α hélice, se le conoce como β -Ser- α (Derewenda y Sharp, 1993). Este posiciona al residuo libre nucleofílico a la superficie del sitio activo y permite acceder fácilmente por un lado al residuo de histidina y, por el otro, al sustrato. La histidina, que es el tercer residuo catalítico en las lipasas, se localiza en una vuelta después de la hoja $\beta 8$ de la estructura central.

Figura 1. Estructura de las α/β hidrolasas



Las α hélices están indicadas como cilindros, y las hojas β como flechas. La posición de los residuos activos se muestran como círculos negros; donde el nucleófilo es el residuo después de la $\beta 5$, el residuo de Asp/Glu está después de $\beta 7$, y el residuo de histidina se localiza en la vuelta entre $\beta 8$ y αF (Jaeger y Reetz, 1999).

Clasificación de las carboxilesterasas

Las esterasas, lipasas y colinesterasas pertenecen a una gran familia de proteínas filogenéticamente relacionadas y han sido clasificadas en base a la comparación de sus secuencias de aminoácidos y algunas propiedades biológicas fundamentales (Arpigny, 1999 y Jaeger, 1999).

Las lipasas son poco activas ante ésteres solubles o ésteres insolubles que se encuentran en una forma monodispersa. Sin embargo se ven altamente activadas cuando la solubilidad del sustrato es excedida o bien, se alcanza su concentración micelar crítica y se da como resultado el fenómeno de activación interfacial; en contraste a las carboxilesterasas simples o esterasas, no obedecen a esta regla (Desnuelle, 1975). A pesar de esta distinción, los reportes de caracterización de estas enzimas no se restringen a este concepto.

Las cutinasas, por ejemplo, son capaces de hidrolizar los sustratos típicos de lipasas sin presentar el fenómeno de activación interfacial, por lo que se dice que representan un puente entre lipasas y esterasas. Algunas enzimas nuevas provenientes de bacterias termófilas se pueden clasificar como intermediarios evolutivos en las familias de lipasas y esterasas (Dutta, 2009). Estas pueden aportar un mayor conocimiento para relacionar la evolución de la familia de las carboxilesterasas y generar diversos estudios sobre su estabilidad (Manco, et. al., 1998), aspecto fundamental para desarrollar catalizadores útiles en el área de biotransformaciones.

Se han agrupado más de 50 carboxilesterasas de bacterias en 8 familias, basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos y sus propiedades biológicas. Recientemente se han hecho varias extensiones a la clasificación original.

- La Familia I. Comprende un total de 30 enzimas que, a su vez, se dividen en 7 subfamilias:
 - Subfamilia I.1: Su peso molecular aproximado es de 30-32 kDa, y son secretadas por la vía tipo II.
 - Subfamilia I.2: Su peso molecular aproximado es de 33 kDa, debido a una intersección en la secuencia de aminoácidos que forma una doble hoja β -antiparalela en la superficie de la molécula y también son secretadas por la vía tipo II.

- Subfamilia I.3: Lipasas de gran peso molecular. No contienen péptido señal en el amino terminal no residuos de cisteína. Son secretadas por la vía del tipo I.
 - Subfamilia I.4: Lipasas de menor tamaño, con pesos moleculares de 19.6 kDa. Las lipasas conocidas de *Bacillus* tienen en común que el residuo de Ala es reemplazado por la primera Gly en el pentapéptido conservado, quedando Ala-X1-Ser-X2-Gly. También se adicionaron a ésta subfamilia dos esterasas: *Bacillus subtilis* LipB y *Bacillus licheniformis*.
 - Subfamilia I.5: La similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas lipasas es mayor al 91%, con masas moleculares de 43 kDa aproximadamente. Poseen 2 residuos de cisteína que participan en la formación de un enlace disulfuro responsable de la estabilidad térmica de la enzima.
 - Subfamilia I.6: Su peso molecular es de 75 kDa aproximadamente. Las lipasas de *Staphylococcus* presentan gran similitud en su secuencia de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas, además de ser secretadas como precursores. Entre las lipasas verdaderas, la de *Staphylococcus hyicus* es la única que presenta una actividad fosfolipídica considerable.
 - Subfamilia I.7: Su región central es aproximadamente 50% similar a las lipasas de *Bacillus subtilis* y a la de la subfamilia I.2. Sin embargo no hay similitud entre la lipasa de *Streptomyces cinnamoneus* y otras *Streptomyces* conocidas hasta ahora.
- Familia II. No presentan el pentapéptido general sobre el residuo de la serina. Sino que presentan un motivo secuencia Asp-Ser-(Leu)GDS(L). En estas proteínas es importante que los aminoácidos tiendan a estar mas cerrados para el N-terminal que en otras enzimas lipolíticas.
 - Familia III. Presentan un plegamiento ortodoxo de α/β hidrolasa y contienen una típica triada catalítica. También muestran aproximadamente 20% de similitud en su secuencia de aminoácidos con

isoformas intracelulares y plasmáticas del PAF-AH (platelet activating factor acetilhidrolase) humano (proteínas monoméricas).

- Familia IV. Presentan una similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a la HSL de mamíferos sensibles a hormonas. La clasificación de esta familia se debe particularmente a su actividad relativamente alta a bajas temperaturas retenida por la HSL y la lipasa de *Moraxella sp.*
- Familia V. Proceden de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*) Así como psicrofílicas (*Moraxella sp.*, *Psychrobacter immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*) cuyas enzimas no lipolíticas comparten una considerable similitud en su secuencia de aminoácidos (20-25%) y poseen la estructura α/β hidrolasa así como la triada catalítica. Son llamadas epoxi hidrolasas, dehalogenasas y haloperoxidasas.
- Familia VI. Incluye esterasas que han sido parcialmente identificadas de las secuencias del genoma, con un peso molecular de aproximadamente 23-26 kDa. Tienen gran especificidad con sustratos pequeños y no presentan actividad con triglicéridos de cadena larga. Exhiben aproximadamente 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos comparadas con las lisofosfolipasas eucarióticas dependientes de Ca^{2+} .
- Familia VII. Tienen un peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Comparten un 40% de similitud con las eucarióticas acetilcolin esterasa y la carboxilesterasa del hígado/intestino. Estas proteínas no han sido bien caracterizadas.
- Familia VIII. Exhiben una similitud considerable con varias β -lactamasas clase C. Estas esterasas han sido identificadas con un motivo consenso Gly-X1-X2-Leu. Se necesita más información estructural para describir claramente esta familia de esterasas.

Importancia económica

El estudio de las carboxilesterasas microbianas originalmente estaba enfocado en la obtención de compuestos como aditivos en detergentes pero se ha incrementado el uso de éstas para aplicaciones en la industria farmacéutica, de alimentos y síntesis orgánica (Montes, 2002). Su estudio se ha extendido dadas las aplicaciones potenciales de estas enzimas en diferentes campos de investigación, aumentando así su importancia económica, no solo por su bajo costo y disponibilidad, sino también por su alta enantioselectividad y estabilidad en solventes orgánicos (Keane, 2008).

Las carboxilesterasas pueden utilizarse para la síntesis estereoquímica de ésteres, que son de gran importancia en la industria farmacéutica y química como por ejemplo el Naproxen®, Ketoprofen® (Cernia, 2002) y muchos intermediarios de síntesis, tanto de medicamentos como de insecticidas y herbicidas (Hou, 1993).

Tabla 4. Áreas de aplicación industrial de las carboxilesterasas

<i>Industria</i>	<i>Efecto</i>	<i>Producto</i>
Lácteos	Hidrólisis de grasa de leche, maduración de queso y mantequilla	Saborizantes, queso, mantequilla
Panadería	Mejora sabor y prolonga la vida de anaquel	Productos de panadería
Bebidas	Mejora el aroma	Bebidas
Condimentos	Mejora la calidad	Mayonesas
Complementos alimenticios	Transesterificación y desacetilación	Lípidos funcionales y antioxidantes
Cárnicos	Sabor y remoción de grasa	Productos cárnicos
Cosméticos	Síntesis	Emulsificantes y agentes humectantes
Farmacéutico	Síntesis estereoquímica de ésteres	Intermediarios de medicamentos
Limpieza	Hidrólisis (Helmut, 1998), (Hou, 1993), (Soberón-Chávez y Palmeros, 1994).	Detergentes

En el presente trabajo se desarrollo un biocatalizador que llevó a cabo dos reacciones de interés para la industria de alimentos: la transesterificación de tricaprilina y CLA para la obtención de lípidos funcionales, y la desacetilación del ácido ferúlico para ser utilizado como antioxidante.

Importancia de lípidos funcionales

Se denomina lípidos estructurados (SL's) a los lípidos que han sido reconstruidos del estado natural. En particular, al cambiar la posición de los ácidos grasos en TGA, se promueven funcionalidad y propiedades nutraceuticas diferentes (Casimir, 2004). Los SL's se producen por métodos químicos o enzimáticos.

Tabla 5. Síntesis de SL's. Métodos químicos vs. enzimáticos

<i>Método enzimático</i>	<i>Método químico</i>
Condiciones de reacción más suaves	Condiciones de reacción extremas
No hay reacciones colaterales	Hay mayor probabilidad de reacciones alternas
Productos de fácil identificación	Difícil separación de productos

(Casimir, 2006).

Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo bajo condiciones más suaves que las reacciones químicas, además de que no hay reacciones colaterales. Los productos de un proceso enzimático son fáciles de purificar y pueden ser considerados "naturales" una propiedad que muchos consumidores prefieren (Casimir, et. Al., 2002).

"Ácido Linoleico Conjugado" (CLA) es un nombre colectivo para un grupo de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico (ácido cis-9, cis-12-octadecanoico) que involucra dobles ligaduras en las posiciones 9 y 11 ó 10 y 12 ó 11 y 13. Pueden ocurrir variaciones geométricas *cis-cis*, *cis-trans* o *trans-trans* (Kim, et al., 2000) y es sensible a la oxigenación y polimerización (Minemoto, 2003). El CLA disponible comercialmente se prepara por isomerización química y el análisis de estas preparaciones por HPLC indica que hay al menos 12 picos diferentes asociados con varios isómeros de CLA (Sheat, 1998).

Aunque se ha encontrado que el CLA tiene propiedades biológicas benéficas, el consumo de CLA dietario ha disminuido en los últimos 20 años debido al reemplazo de la grasa de leche por lípidos de origen vegetal a la limitación en

la energía total ingerida a partir de la grasa ingerida en la dieta (Casimir, 2004).

Tabla 6. Importancia del CLA

<i>Actividad</i>	<i>Vía</i>
Anticancerígena en colon	Inhibición de las enzimas extrahepáticas como la prostaglandina H sintasa.
Cáncer mamario	Inhibición del ácido araquidónico (AA) derivado del eicosanoico, como la prostaglandina E2.
Ateroesclerosis	Evidencia aún limitada
Disminución del tejido adiposo abdominal	Oxidación potenciada de ácidos grasos libres.

(Casimir, 2004).

Importancia de antioxidantes

Se han identificado cierto tipo de compuestos biológicamente activos con actividad antioxidante presentes en los alimentos, lo que ha desencadenado una serie de estudios de éstos, con la finalidad de relacionar la presencia de este tipo de compuestos en la dieta con los beneficios en la salud.

Por estos motivos existe un gran interés por introducir antioxidantes y otros compuestos con cierta bioactividad en fórmulas clásicas así como en nuevos alimentos funcionales.

Los compuestos antioxidantes, como su nombre lo indica, tienen la capacidad de eliminar los radicales libres del organismo (Fragopoulou, 2007). Funcionan como una barrera frente al efecto nocivo de los radicales libres sobre el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos de nuestro cuerpo. Su consumo contribuye a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, degenerativas e incluso de cáncer. Respecto a los productos enriquecidos con sustancias antioxidantes (vitaminas C y E, beta-carotenos, selenio, zinc y fitoquímicos o sustancias propias de vegetales). La generación de conocimiento en torno a estos fenómenos ha impulsado el aumento de productos enriquecidos con antioxidantes en el mercado, tales como jugos de fruta y bebidas de leche (Schmidt, 2000), tanto en productos clásicos como en los denominados alimentos funcionales. En la tabla 7 se muestran algunos

otros ejemplos de compuestos antioxidantes, las fuentes de las cuales se obtienen así como usos y beneficios que representan para la salud.

Tabla 7. Compuestos con actividad antioxidante

<i>Sustancia bioactiva</i>	<i>Propiedad biológica</i>	<i>Fuentes</i>	<i>Usos</i>
Tocoferoles, tocotrienoles.	Prevención del estrés oxidativo, problemas cardíacos, reducción de niveles de colesterol.	Aceites vegetales, cereales.	Lácteos y suplementos alimenticios.
Flavonoides	Prevención de problemas cardíacos, cáncer, problemas de próstata y colon	Moras, uvas, soya, cítricos, cereales y semillas	Conservación de alimentos
Compuestos fenólicos	Actividad antioxidante, prevención de enfermedades cardiovasculares	Moras, granos y cebada	Producción de bebidas
Carotenos.	Actividad antioxidante	Cítricos, jitomate, vegetales de hoja verde	Colorantes

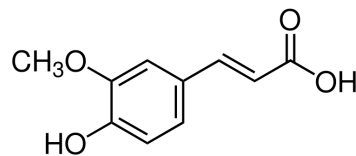
(Shi J., 2002).

El ácido ferúlico y sus derivados poseen actividades antioxidantes, anti-tumorales, fotoprotectoras y anti-hipertensivas. El derivado hidrofóbico de los ácidos ferúlicos, como por ejemplo, el alquil ferulato, tiene mayor actividad antioxidante que un ácido ferúlico sin modificar (Sun, 2007). La síntesis enzimática de derivados tanto hidrofóbicos como hidrofílicos del ácido ferúlico ha sido de gran interés y motivo de una serie de investigaciones, con la finalidad de incrementar su solubilidad tanto como algunos otros derivados fenólicos (Yoshida, 2006). El ácido ferúlico es una fuente abundante de compuestos aromáticos, y puede sufrir transformaciones en su estructura por microorganismos, como por ejemplo:

- Descarboxilación no oxidativa que genera vinilguayacol.

- Reducción del ácido para obtener aldehídos y alcoholes de cadenas saturadas.
- Oxidación del ácido para obtener vainillina o ácido vainílico que son precursores del guayacol, metoxihidroquinonas.
- Reacciones de deasacetilación para dar ácido cafeico, de interés particular debido a que puede ser transformado a acetovainillona y etilguayacol, que puede ser químicamente transformado en compuestos que son mas biodegradables (Lee, 2006).

Figura 2. Estructura del ácido ferúlico.



Se han confirmado dichas rutas de transformación del ácido ferúlico mediante estudios de una enzima capaz de descarboxilar compuestos, aislada de una especie *B. pumilus* (Degrassi, 1998).

4.2 Microorganismos productores de enzimas

Los microorganismos y sus enzimas se han utilizado para diversos procesos industriales, médicos y ambientales. Estos procesos requieren frecuentemente el uso de condiciones extremas como temperaturas, fuerza iónica, presión, pH, así como solventes orgánicos (Salameh, 2007). Estos microorganismos se pueden encontrar en distintos ambientes que para el hombre pueden parecer extremos, pero para ellos resultan óptimos o muy cercanos a lo óptimo para su desarrollo (Jeong, 2002).

Importancia de microorganismos extremófilos

El término "extremófilo" se ha usado para describir a esos microorganismos, incluyendo a estos a los termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos, osmófilos, basófilos, resistentes a radiación y a metales pesados (Virupakashi, 2005).

Los microorganismos termófilos son aquéllos capaces de crecer a altas temperaturas, superiores a 40° C generalmente. Estos microorganismos son de particular interés ya que permiten simplificar las condiciones de los procesos de producción de bienes de consumo (Jeong, 2002). Junto con los resistentes a medios alcalinos han sido el foco de atención a investigaciones debido a que son fuentes de obtención de enzimas que tienen gran estabilidad a condiciones extremas. Las carboxilesterasas de *B. subtilis* y *B. pumilus* muestran actividad óptima a valores extremos de pH y temperatura (Nthangeni, 2001).

El género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae* que a su vez pertenece al orden de las bacterias con bajo contenido de G+C (gram positivas); se trata de bacilos aerobios capaces de formar endosporas y presenta un gran número de especies. Sus esporas pueden ser termorresistentes y son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos gracias a sus enzimas hidrolíticas (Berkeley et al, 1984).

Características del género *Bacillus*

Entre los diversos microorganismos productores de enzimas el género *Bacillus* presenta ventajas respecto a otros, ya que muy pocas especies son patógenas, tiene una alta capacidad de secreción de enzimas (Harwood, 1992), y muchas enzimas industriales se producen a partir del mismo, por lo que las condiciones de manejo a gran escala son conocidas (Chaplin, 1992).

Muchas de las carboxilesterasas provenientes del género *Bacillus* han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente a partir de especies como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thermocatenulatus*, *B.*

thermoleovorans y sus genes ya han sido clonados y secuenciados. En general las lipasas provenientes de este género son de gran importancia en biotecnología debido a que tienen secuencias proteicas únicas y muchas de sus propiedades bioquímicas son poco comunes (Kim, 2002).

Se han aislado nuevas enzimas a partir de microorganismos provenientes de ambientes extremos (termófilos y psicrófilos) y han sido sobreexpresados en *E. coli* (Ogino, 2007) es necesaria su caracterización y aplicación en términos de parámetros fisicoquímicos como el perfil de actividad contra pH, estabilidad, temperatura, especificidad posicional en la hidrólisis de triacilglicéridos y especificidad por ciertos ácidos grasos (Panda, 2008).

Enzimas del género *Bacillus*

Las primeras enzimas del género *Bacillus* a las que se caracterizó bioquímicamente hicieron pensar que se trataba de enzimas de peso molecular bajo si se comparaban con otras enzimas conocidas. Dada la importancia industrial que representan estas enzimas se ha profundizado en el estudio de estos microorganismos desde un punto de vista molecular (Mora, 2008).

Tabla 8. Lipasas y esterases del género *Bacillus*

<i>Microorganismo</i>	<i>pH de máxima actividad</i>	<i>Temperatura a máxima de actividad (°C)</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Referencia</i>
<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., 1991
<i>B. subtilis</i> 168, Lip A	10.0	37	19.3	Lesuisse y col, 1993
<i>B. pumilus</i> GMA1	10.5	50	20.5	Bustos, 1995
<i>B. lichenformis</i>	10.0 – 11.0	50 – 60	19.2	Nthangeni y col., 2001
<i>Bacillus sp.</i>	6.4	60	22.0	Dharmsthiti y Luchai,

Carboxilesterasas de *B. pumilus*

La información disponible en los bancos de datos (GenBank, Swiss Protein Sequence Database) hasta el 2009, reveló un registro de 38 enzimas presentes en el genoma de *B. pumilus*, de las cuales 24 tienen actividad carboxilesterasa.

Tabla 9. Registro de carboxilesterasas en el genoma de *B. pumilus*

Enzima	Gene ID	Punto Isoeléctrico	Peso Molecular
[<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5621175	5.67	26099.70
Phospholipase/carboxylesterase family	5623012	5.36	22580.54
[<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]			
Esterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5623000	6.51	28099.17
Esterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5620384	5.06	27960.82
Carboxylesterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5622326	5.15	28456.33
Hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5622207	6.72	34100.54
Thioesterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619879	4.86	26800.54
Alpha/beta hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5622103	8.87	31,562.75
Carboxylesterase A [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619700	4.94	32,768.28
Alpha/beta fold family hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619691	4.96	30,458.67
Carboxylesterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619656	7.07	25,927.29
Hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5621987	9.13	30,672.30
Lysophospholipase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5621953	6.76	29,856.17
Dienelactone hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619568	6.17	22,358.94
Thioesterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619551	5.85	27,977.20
Cephalosporin-C deacetylase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619524	5.28	35,736.39
Alpha/beta fold family hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619469	7.83	32,708.99
Alpha/beta fold family hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619406	6.18	33419.06
Alpha/beta fold family hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619318	7.78	37,241.11
Hydrolase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5621382	5.70	28,975.6
Esterase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5621006	5.28	34,614.83
Lysophospholipase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5622206	5.76	33831.19
Acyltransferase [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5622884	9.43	67885.24
Lipolytic enzyme lipc [<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]	5619613	8.83	23834.32

Los datos de las enzimas presentes en el genoma de *B. pumilus* se tomaron de la base de datos GenBank y posteriormente se predijeron los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos para cada una de las carboxilesterasas con ayuda del programa Swiss Protein Sequence Database.

Estudios anteriores reportan que el microorganismo termófilo de estudio, *B. pumilus* GMA1, produce una enzima con actividad lipasa presentando máximos de actividad en 50°C y pH 10.5 en la región de 21 kDa (Bustos, 1995) y tiene actividad en solventes orgánicos por lo cual es de potencial interés en la industria alimentaria (Wong, 2001). Se optimizó un medio de cultivo (Ibáñez, 2007) donde se observó un incremento en la actividad de carboxilesterasas. En el presente trabajo se evaluarán las enzimas con actividad de carboxilesterasa que se producen bajo estas condiciones de cultivo para lo cual es necesaria la purificación de la enzima de interés, así como su caracterización y secuenciación.

4.3 Purificación de proteínas

Las técnicas de purificación de proteínas son empleadas para que puedan ser estudiadas propiedades como conformación, especificidad de sustrato, reacciones con otros ligandos, así como su actividad específica. El grado de pureza requerido de una proteína depende de la utilización final de la misma. Para algunas aplicaciones, como en el desarrollo de biocatalizadores, un extracto crudo es suficiente.

Cada etapa de purificación representa un cierto grado de pérdida de producto, por lo que un ideal de purificación de proteínas es en la que el mayor nivel de purificación se alcanza en el menor número de pasos y la selección de los mismos se basa en el tamaño, carga y solubilidad entre otras propiedades de la proteína de interés.

El concepto de pureza, aplicada a proteínas, no es del todo claro. La muestra proteica contiene, además de agua, iones de buffer que han sido agregados, solamente una población de moléculas, todas con estructuras covalentes y tridimensionales idénticas. El contar solo con proteínas es una meta insostenible y a veces innecesaria, pues lo que se requiere es una muestra proteica que no contenga alguna especie que interferirá con los experimentos requeridos para la proteína de interés. Este no es simplemente un punto de vista académico, ya que se volverá más y más difícil la remoción de los

contaminantes de una muestra proteica en un proceso de purificación. Serán necesarios pasos de purificación adicionales, los cuales llevan tiempo e incrementan los costos del producto y llevarán inevitablemente a rendimientos decrecientes. El criterio de pureza usado para proteínas es que unos pocos miligramos de la muestra producen una sola banda después de una electroforesis en SDS-PAGE cuando se tiñe con reactivos como azul de Coomassie o alguna tinción no específica, hay que tomar en cuenta que aún que una sola banda se muestra en este sistema, los contaminantes menores se volverán visibles si el gel está muy cargado o si la tinción que se lleva a cabo es muy sensible, como la tinción de plata.

Técnicas de purificación (Darbre, 1986)

Las técnicas de purificación explotan alguna propiedad conocida de las proteínas o eliminan el exceso de solvente. A continuación se enlistan los principales procesos.

- Liofilización de proteínas
- Concentración por ultrafiltración
- Columnas de Cromatografía
 - Filtración en gel
 - Intercambio Iónico
 - Isoelectroenfoque
 - Cromatografía de afinidad

En el primero, por ejemplo, se elimina el solvente por sublimación. La ultrafiltración elimina exceso de solvente o retiene moléculas de tamaño o carga determinados, de acuerdo al tipo de membrana utilizada. La filtración en gel se lleva a cabo cuando se conoce el peso molecular de la proteína de interés, mientras que los otros tipos de cromatografía explotan la carga o la función biológica.

En el Anexo III se explican detalladamente cada una de las técnicas de purificación antes mencionadas.

Caracterización cinética

El objetivo de los estudios de caracterización cinética es conocer los parámetros a los cuales una enzima trabaja de manera óptima, dependiendo de las características del microorganismo que la produce.

Generalmente, las carboxilesterasas han sido caracterizadas de acuerdo a su capacidad para catalizar reacciones dependiendo de las características de los sustratos (Abhinav, 2008). Una de las principales características que presentan es la capacidad de retirar grupos acetato de compuestos acetilados y realizar reacciones de transesterificación. La enzima cataliza la reacción de una manera más eficiente cuando se encuentra pura, para lo cuál es necesario tener una previa extracción y homogenización de la misma (Degrassi, 1998).

Dentro de las carboxilesterasas se encuentran las lipasas y esterasas constituyen dos de las más importantes aplicaciones en biocatálisis y aplicaciones biotecnológicas. Son esencialmente distinguidas en base a su especificidad de sustrato, además de efectos de pH, temperatura y fuerza iónica entre otras características.

Las lipasas hidrolizan preferentemente triglicéridos compuestos por largas cadenas de ácidos grasos y las esterasas usualmente hidrolizan esteres solubles en agua, incluyendo triglicéridos de cadena corta. Ambas enzimas tienen diversas aplicaciones, incluidas las modificaciones de moléculas biológicamente activas, el mejoramiento de sabores o propiedades nutracéuticas en alimentos, así como la resolución de mezclas racémicas. Notablemente, en presencia de solventes orgánicos estas enzimas llevan a cabo reacciones de esterificación, amidación y polimerización (Dalla, 2008).

5. ANTECEDENTES

***Bacillus pumilus* GMA1**

En el grupo de trabajo se aisló un microorganismo lipolítico, en las aguas termales de la región de los Azufres, Michoacán (Bustos, 1995). Este microorganismo fue identificado como *Bacillus pumilus* y la cepa se denominó GMA1. En la tabla 10 se observó el patrón de fermentación de carbohidratos y algunas pruebas bioquímicas, en donde es importante resaltar su actividad xilanolítica y proteolítica.

Tabla 10. Caracterización bioquímica de *B. pumilus* GMA1

<i>Carbohidrato</i>	<i>Resultad</i> <i>o</i>	<i>Carbohidrato</i>	<i>Resultad</i> <i>o</i>
Glicerol	(+)	Hidrólisis de xilano	(+)
Ribosa	(+)	D-arabinosa	(-)
β -metil-D-Xilósido	(-)	L-xilosa	(+)
Mannosa	(+)	Glucosa	(+)
Inositol	(+)	Rhamnosa	(-)
α -Metil-D-Glucósido	(+)	Sorbitol	(-)
Esculina	(+)	Amigdalina	(+)
Lactosa	(+)	Celobiosa	(+)
Inulina	(-)	Sacarosa	(+)
Glicógeno	(-)	Rafinosa	(-)
D-Lixosa	(-)	Gentiobiosa	(+)
D-Arabitol	(-)	D-Fructosa	(-)
5-Ceto-gluconato	(-)	Gluconato	(-)
Arginina dihidrolasa	(-)	Catalasa	(+)
		Ornitina	
Producción de H ₂ S	(-)	descarboxilasa	(-)
Producción de acetoína	(+)	Triptofano desamidasa	(+)
Lipasa	(+)	Reducción de nitratos	(-)
Eritritol	(-)	L-Arabinosa	(+)
D-Xilosa	(+)	Adonitol	(-)
Galactosa	(-)	Fructosa	(+)
Sorbosa	(-)	Dulcitol	(-)
Manitol	(+)	α -Metil-D-Mannósido	(-)
N-Acetil-glucosamina	(-)	Arbutina	(+)
Salicina	(+)	Maltosa	(+)
Melibiosa	(-)	Trehalosa	(+)
Melezitosa	(-)	Almidón	(-)
Xilitol	(-)	D-Turanosa	(-)
D-Tagatosa	(+)	L-Fucosa	(-)
L-Arabitol	(-)	2-Ceto-gluconato	(-)
Tinción de Gram	(+)	β -Galactosidasa	(+)
Lisina descarboxilasa	(-)	Uso de citrato	(-)
Ureasa	(-)	Producción de indol	(-)
Hidrólisis de gelatina	(+)	Hidrólisis de caseína	(+)

(Bustos, 1995).

Lipasa termorresistente

El microorganismo estudiado produce una lipasa con características de interés respecto a su pH y temperatura óptimos, que son 10.5 y 50°C respectivamente, determinados por el método de titulación. Se realizó la caracterización de un extracto enzimático de *Bacillus pumilus* GMA1 y se llevó a cabo su purificación parcial mediante cromatografía en columna de filtración, Superosa 12 de Pharmacia y el perfil electroforético reveló la presencia de un triplete con actividad lipolítica en la región correspondiente a 21 kDa y el punto isoeléctrico se localizó en la región correspondiente al intervalo de 8.68 – 9.3 de pH (Wong, 2001).

En la tabla 11 se muestran las propiedades bioquímicas de las lipasas del género *Bacillus* que han sido caracterizadas molecularmente. Es preciso mencionar que los primeros cuatro miembros pertenecen a la subfamilia 1.4.

Tabla 11. Propiedades bioquímicas de lipasas de *Bacillus* de la subfamilia I.4

Propiedad	Microorganismo	PM	pI	pH	T óptima	Referencia
d	Productor	(kDa)		óptimo	(°C)	
Lipasa	<i>B. subtilis</i> LipA	19.3	9.25	10	37	Eggert y col, 2001
Esterasa	<i>B. subtilis</i> LipB	N.E	N.E	11	N.E	Nthandeni y col, 2001
Lipasa	<i>B. pumilus</i> DSM5776	19.3	9.43	9.5-10	30	Nthandeni y col, 2001
Esterasa	<i>B. licheniformis</i>	19.2	9.46	10-11.5	N.E	Nthandeni y col, 2001
Lipasa	<i>B. pumilus</i> B26*	19.23	N.E	8.5	35	Hwoun y col, 2002
Lipasa	<i>B. pumilus</i> GMA1***	21	8.65- 9.3	10.5	50	Wong, 2001

*Tiene 90.7% de identidad con respecto a *B. pumilus* DSMM5776

**Tiene 98.34% de identidad con respecto a *B. pumilus* DSMM5776

N.E. No especificado (Zúñiga, 2004).

Es importante mencionar que dependiendo de las condiciones de cultivo es posible la expresión de diferentes enzimas que se encuentran presentes en el genoma del microorganismo.

Antecedentes del uso de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 en biocatálisis

En el grupo de trabajo se desarrolló un biocatalizador con el extracto crudo de *B. pumilus* GMA1 y se determinaron las condiciones óptimas de inmovilización en un soporte microporoso de polipropileno (Accurel® MP1000) que

incrementó la actividad lipolítica en un 55% en comparación con el extracto crudo libre. La concentración del extracto crudo de 2 mg proteína / mL, pH y fuerza iónica del buffer de reacción fueron de 9.0 y 50mM respectivamente, en un tiempo de 5 h a 4°C (Zúñiga, 2004).

Optimización del medio de cultivo

Se optimizó el medio de cultivo para la obtención de la lipasa de *B. pumilus* GMA1 y se observó un aumento en la actividad específica de 0.08 U/mgP y 2.69 U/mgP, es decir 33 veces.

Tabla 12. Medio Optimizado para la producción de lipasa de *B. pumilus* GMA1

<i>Componente</i>	<i>g/L</i>
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2.5
Tween 80	0.005
Glucosa	0.43
Glicerol	9.7
Sulfato de Amonio	3.26
Extracto de Levadura	2.94
Extracto de Carne	17.5
Aceite de Olivo	1.3
Condiciones	Cultivo 50°C, 24h, 100rpm Medio preparado en Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.2 (Ibáñez, 2007).

En el genoma de *B. pumilus* (tabla 9) existen 24 enzimas con actividad de carboxilesterasa. En el trabajo de Ibáñez (2007) no se determinó si el incremento de actividad fue debido a la sobreproducción de la enzima termófila reportada anteriormente (Bustos, 1995), o bien a la expresión de otras enzimas con la misma actividad. Lo que si se demostró es que el extracto crudo soluble permitía la obtención de compuestos de interés en la industria alimentaria (Ruiz, 2007) por reacciones de transesterificación y desacetilación.

Reacciones preliminares

Entre los productos importantes de interés en alimentos se encuentran los lípidos con alto contenido de ácido linoleico conjugado (CLA), al que se le han

atribuido propiedades como agente anticancerígeno, estimulante del sistema inmune, protector contra la aterosclerosis, y con capacidad para disminuir el contenido de grasa corporal, entre muchas otras funciones biológicas, así como la obtención de compuestos fenólicos, que se encuentran naturalmente en frutas y verduras frescas, granos y cereales con propiedades antioxidantes, antitrombóticas, antialérgicas, antimicrobianas (Ruiz, 2007).

6. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación

El presente trabajo tiene como finalidad determinar qué esterasa de las varias codificadas en el genoma de *B. pumilus* se incrementó con la optimización del medio de cultivo, para lo cual es necesaria una purificación y caracterización.

Una vez identificada, se busca evaluar la capacidad de la enzima de llevar a cabo reacciones de síntesis e hidrólisis. La enzima será inmovilizada en una matriz porosa para su aplicación en biocatálisis y así facilitar su comparación con preparaciones comerciales.

Objetivos Generales

- Purificar y caracterizar las carboxilesterasas producidas por *Bacillus pumilus* GMA1 en medio optimizado, con aceite de olivo como inductor.
- Elaborar un biocatalizador con el extracto crudo obtenido en estas condiciones y evaluar su aplicación en reacciones de interés en la industria alimentaria.

Objetivos Particulares

- Producción de la enzima de *B. pumilus* GMA1 en medio optimizado
- Purificación de la enzima por filtración en gel e intercambio iónico
- Caracterización la enzima obtenida en términos de T, pH y especificidad de sustrato
- Inmovilización de extracto crudo por adsorción
- Aplicación del biocatalizador en reacciones de síntesis y desacetilación.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

<i>Reactivo</i>	<i>Marca</i>
α -naftil acetato	Sigma
Aceite de Olivo	Sigma
Acetato de sodio	Baker
Acetona	Sigma
Ácido acético glacial	Baker
Ácido clorhídrico	Baker
Acrilamida/bisacrilamida	BioRad
Accurel MP 1000®	Membrana
Agar	Difco
APS	BioRad
Azul de bromofenol	BioRad
BHI	Difco
BSA	Sigma
Caldo nutritivo	Bioxon
CAPS	Sigma
CLA	Sigma
Cloroformo	Baker
Cloruro de amonio	Baker
Cloruro de hierro hexahidratado	Técnica Química
Cloruro de magnesio hexahidratado	Baker
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Baker
Cloruro de sodio	Baker
Dextrosa anhidra	Baker
Éter etílico	Baker
Éter de petróleo	Baker
Extracto de carne	Bioxon
Extracto de levadura	Oxoid
Fast Red	Sigma
Fosfato básico de sodio heptahidratado	Baker
Fosfato dibásico de sodio anhidro	Baker
Glicerol	Baker
Hidróxido de sodio	Baker
Hexano	Baker
Kit de Detergentes	Jena Bioscience
Kit de tinción de plata	GE Healthcare®
Kit de determinación de proteína BCA	Sigma
LB	Difco
Marcadores de bajo peso molecular	Fermentas
Marcadores preteñidos de bajo peso molecular	BioRad
Nitrato de amonio	Baker
<i>p</i> -nitrofenil acetato	Sigma
<i>p</i> -nitrofenil butirato	Research Organics
<i>p</i> -nitrofenil laurato	Sigma
<i>p</i> -nitrofenol	Sigma
SDS	BioRad
Sulfato de sodio	Sigma
Sulfato de amonio	Sigma
Sulfato sérico	Sigma
Tributirina	Sigma
Tricaprilina	Sigma

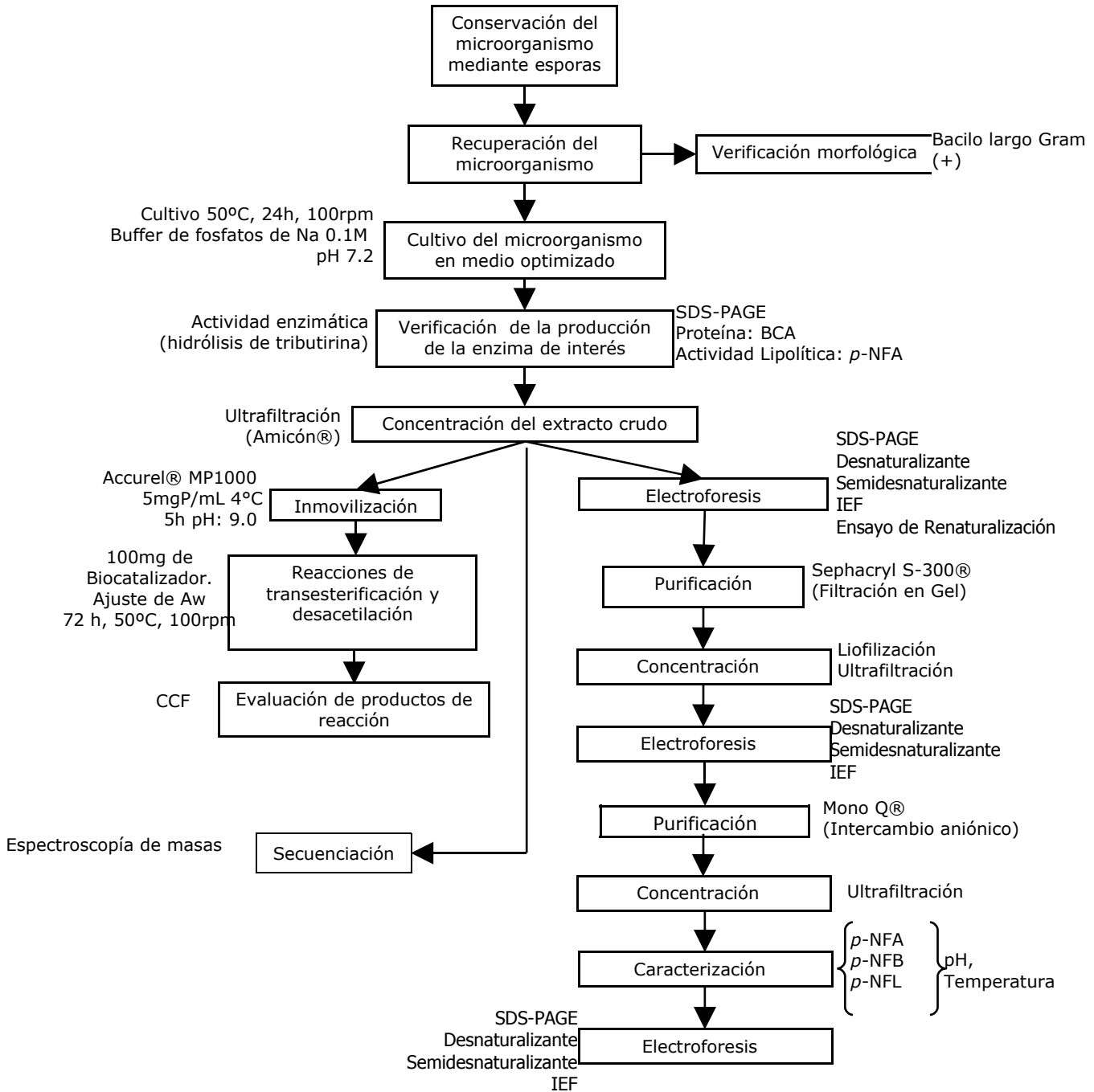
MATERIAL Y MÉTODOS

Purificación y caracterización de carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1 y su aplicación en biocatálisis.

Tolueno	Monterrey
Yodo	Sigma

7.1 Diseño experimental

Figura 3. Diseño experimental



7.2 *Bacillus pumilus* GMA1 y su conservación

Método de conservación en glicerol

La cepa fue proporcionada por el Dr. Ismael Bustos-Jaimes del Laboratorio de Físicoquímica de Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM. Fue conservada a -70°C en medio líquido LB con glicerol al 70 %. Para asegurar que la cepa mantuviera sus características se creció en un medio de cultivo sólido LB del cual nuevamente se prepararon viales de 1 mL con glicerol al 50%, partir de los cuales se realizó el experimento.

Método de conservación por esporas

Preparación del medio de cultivo para esporulación (Gerhardt, 1994).

Se preparó agar nutritivo al 1.5 % con las soluciones A y B de esporulación. Una vez estériles el agar y los tubos, se agregaron 160 μL de solución A previamente filtrada al agar nutritivo, se mezcló el caldo y se colocaron 20 mL en cada tubo. Se dejó solidificar.

- Solución A: 0.830 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.979 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.089 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 100mL de agua destilada. No se esteriliza por autoclave, sino por filtración y se almacenó a 4°C .
- Solución B: 5.35 g de NH_4Cl , 1.06 g de Na_2SO_4 , 0.68 g de KH_2PO_4 , 0.97 g de NH_4NO_3 disuelto en 80mL de agua destilada, se ajustó a pH 7 y se aforó a 100mL. Se esterilizó en autoclave al momento de preparar el agar y se almacena a 4°C .

7.3 Reactivación de la cepa y verificación morfológica de *Bacillus pumilus* GMA1

A partir de los viales de glicerol se inoculó un matraz con 100 μL a 10 mL de caldo BHI preparado en buffer de fosfatos de potasio 0.1 M, pH 7.2 con aceite de olivo al 1 % a 50°C . A partir de este cultivo se realizó una tinción de Gram (Ibáñez, 2007).

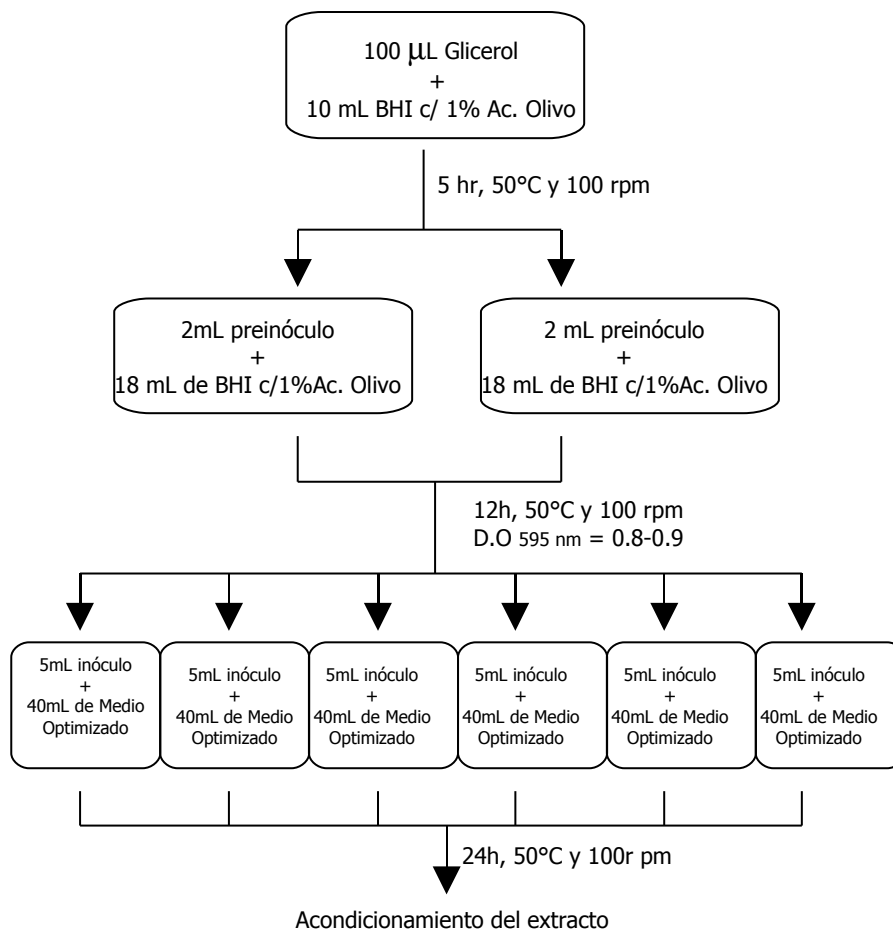
Verificación de actividad enzimática

Se prepararon cajas petri con agar y tributirina al 0.5% y se inoculó una asada de cultivo de *B. pumilus* GMA1 en BHI con 24 horas de incubación, con la finalidad de observar en el agar halos de aclaración por hidrólisis de la tributirina (Ibáñez, 2007).

7.4 Producción enzimática

Para la producción del extracto crudo se siguió la siguiente metodología.

Figura 4. Producción enzimática



Para evitar reacciones de Maillard la glucosa se esterilizó por filtración con membrana Millipore® de 22 µ. El sulfato de amonio se esterilizó en autoclave por separado.

Se realizó la fermentación en matraces de 50 mL para el preinóculo y los inóculos de BHI con 1% de aceite de oliva y en matraces de 125 mL para la fermentación del medio optimizado en una incubadora New Brunswick Scientific. Pasadas 24 h del crecimiento en el medio de cultivo optimizado, las células provenientes de dicho medio se concentraron por centrifugación

durante 30 min a 10,000 rpm y 4°C en centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA10. El extracto se decantó y se realizó una extracción con éter 1:2 con respecto al volumen de la muestra. Se eliminó la fase etérea y se colectó la fase acuosa. Se mantuvo a una temperatura de 4°C con agitación constante durante 24 h para eliminar el éter empleado para la extracción.

Concentración del extracto por liofilización

Después de realizar la extracción con éter, el extracto se dividió en envases plásticos y se congeló con hielo seco. Se mantuvieron los envases a -70°C durante 24 hrs y se liofilizaron en una liofilizadora Labconco®. A partir de 6 matraces de cultivo con 45 mL de medio, se obtuvieron 10 g de liofilizado aproximadamente. Se pesaron 10 mg de liofilizado y se resuspendieron en 100 µL de buffer de fosfatos de sodio pH 7.2 y se determinó cantidad de proteína soluble por el método de BCA y actividad enzimática cualitativa y cuantitativamente.

Ultrafiltración de la muestra en Amicon® para geles de electroforesis e isoelectroenfoque (IEF)

Se pesó 1 g de liofilizado y se suspendió en 5 mL de buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.2 y se filtró hasta reducir el volumen de 5 mL hasta 1 mL. Se colectó el saliente y el concentrado, determinando cualitativamente actividad enzimática en cada uno de ellos con la finalidad de asegurar que la enzima haya quedado en el concentrado. Una vez concentradas las muestras se realizó una electroforesis y un IEF.

7.5 Métodos de determinación de proteína y actividad enzimática

Se determinó cantidad de proteína soluble por BCA y actividad enzimática cualitativa (Karpushova, 2005) y cuantitativa (Nawani, 2000) en cada etapa de la producción enzimática: fermentación, liofilización y ultrafiltración (Anexo II).

7.6 Electroforesis

Preparación de los geles de electroforesis

Para corroborar la presencia de las enzimas de *B. pumilus* GMA1, se realizó una electroforesis en geles de SDS-PAGE. Se utilizaron concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida de 4% para el gel concentrador y 12% para el gel separador.

Tratamiento de la muestra para geles SDS-PAGE desnaturalizante

Para un gel de electroforesis con SDS, en condiciones totalmente desnaturalizantes, se preparó un buffer de la muestra 2x (0.0751 g de Tris, 0.2 g SDS, 1 mL glicerol, 0.001 g de Azul de Bromofenol aforados a 5 mL con agua destilada), el cual se mezcló en las siguientes proporciones con un agente desnaturalizante (DTT 0.5 M o beta-mercaptoetanol): 400 μ L de buffer de corrida + 100 μ L de agente desnaturalizante (DTT 0.5 M o beta-mercaptoetanol). La muestra se mezcló con una cantidad igual de buffer de corrida con agente desnaturalizante y se calentó de 5 a 10 minutos para cargar en el gel.

Tratamiento de la muestra para geles SDS-PAGE semidesnaturalizante

Se utilizó el buffer de la muestra 2x (0.0751 g de Tris, 0.2 g SDS, 1 mL glicerol, 0.001 g de azul de Bromofenol aforados a 5 mL con agua destilada) en igual proporción con la muestra, se mezcló perfectamente antes de cargar el gel.

Para los geles se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (Fermentas), cuyo rango está entre 116 a 14 kDa. La electroforesis se corrió a 50 mA durante 4 h, en una cámara de electroforesis Miniprotean II de BioRad. Los geles se tiñeron dependiendo el método deseado y para determinar el peso de las bandas se utilizó el densitómetro modelo GS 700 BioRad® y el programa Quantity-One®.

Tinciones para geles de electroforesis

Dependiendo de las características finales que se quisieran observar en los geles de electroforesis, se emplearon distintas tinciones.

- Tinción con Azul de Coomassie

Al terminar la electroforesis, el gel se sumergió durante toda la noche, en agitación constante en 20 mL de solución teñidora de Coomassie. Pasado este tiempo, el gel se mantuvo inmerso en la cantidad de solución desteñidora necesaria hasta lograr la eliminación del excedente de tinción.

- Tinción de Plata

Para teñir el gel con plata, se siguió el Silver Staining Protocol for proteins ExcelGel SDS, ExcelGel XL, SDS 12-14 ministab gels.

Renaturalización enzimática

Una vez realizada la electroforesis SDS-PAGE desnaturalizante, el gel se enjuagó con agua destilada para eliminar la mayor cantidad posible de SDS y posteriormente se incubó durante 30 minutos en las siguientes soluciones:

- 30 minutos en buffer de fosfatos 0.1M con 0.15M de NaCl.
- 30 minutos en buffer de fosfatos 0.1M con 0.15M de NaCl y 5% de tritón X-100.
- 30 minutos en buffer de fosfatos 0.05M con 0.15M de NaCl y 0.5% de tritón X-100.

Antes de revelar actividad enzimática el gel se lavó con buffer fosfatos 0.5M y 0.15M NaCl por lo menos por 3 horas.

Revelado de actividad enzimática

Para poder observar actividad enzimática en geles, se corrió un gel SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor). Al terminar la electroforesis, el gel se lavó con buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2 y se incubó en solución A de α -naftil durante 20 minutos a 37°C. Pasados los 20 minutos, se agregó una solución B de Fast Red con la cual se reveló la actividad enzimática como una banda color marrón. El gel se guardó en buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2 durante la noche a 4°C para seguir desarrollando la coloración.

Solución A: Se pesaron 5 mg de α -naftil acetato, se disolvieron en 1.25mL de acetona y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2.

Solución B: Se pesaron 12.5 mg de FastRed, se adicionaron 12.5 μ L de Tritón X-100 (0.1%) y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2.

Ensayo de renaturalización con detergentes

Se preparó una mezcla enzima-detergente con 15 μ L de muestra liofilizada de extracto crudo ultrafiltrada en Amicon® (1.5g de liofilizado en 0.5 mL de buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2) y se mezclaron con 2 μ L del detergente a evaluar (tabla 13) y 3 μ L de agua destilada. Se tomaron 20 μ L de la mezcla enzima-detergente y se le agregaron 20 μ L de buffer de carga para electroforesis. Se cargaron 30 μ L en un gel SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor) y se corrió una electroforesis a 90 V durante 4hr. Se reveló el gel para actividad.

Tabla 13. Detergentes evaluados

D 0	Control sin detergente
D 1-1	3-(N, N-Dimehtylpalmitylammonio) propane-sulfonate (ZWITTERGENT® 3-16)
D 1-2	Nonaethylene glycolmonododecyl ether (C12E9)
D 1-3	Octaethylene glycol monododecyl ether (C12E8)
D 1-4	Dodecyl- β -D-glucopyranoside
D 1-5	3-(N, N-Dimethylmyristylammonio) propane-sulfonate (ZWITTERGENT® 3-14)
D 1-6	Docecyll- β -D-maltoside
D 1-7	Decyl- β -D-maltopyranoside
D 1-8	N,N-Dimethyl dodecyl amine-N-oxide (LDAO)
D 1-9	3-(Dodecyldimethylammonio) propane-sulfonate (ZWITTERGENT® 3-12)
D1-10	Nonyl- β -D-glucopyranoside
D1-11	N-Decanoyl-N-methylglucamine (MEGA 10)
D1-12	Tetraethylene glycol monoocetyl ether (C8E4)
D 2-1	Pentaethylene glycol monoocetyl ether (C8E5)
D 2-2	3-[(3-Cholamidopropyl) dimetylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS)
D 2-3	3-[(3-Cholamidopropyl) dimetylammonio]-2- hydroxi-1-propane sulfonate (CHAPSO)
D 2-4	Pentaethyleneglycolmonodecylether (C10E5)
D 2-5	N, N-Dimethyldecylamine-N-oxide (DDAO)
D 2-6	Octyl- β -D-glucopyranoside / Octyl- β -D-glucoside
D 2-7	N-Nonanoyl-N-methylglucamine (MEGA 9)
D 2-8	3-(Decyldimethylammonio) propane-1-sulfonate (ZWITTERGENT® 3-10)
D 2-9	Heptyl- β -D-glucopyranoside
D2-10	N-Octanoyl-N-methylglucamine (MEGA 8)
D2-11	Hexyl- β -D-glucopyranoside
D2-12	3-(N, N-Dimethyloctylammonio) propane-sulfonate (ZWITTERGENT® 3-8)

Detergentes: JENA BIOSCIENCE Cat. No: CD-101; CD-102

Secuenciación de la proteína

Se realizó una electroforesis en gel de SDS-PAGE desnaturalizante (DTT, calor) con un marcador de bajo peso molecular (Fermentas) y se tiñó con azul de Coomassie. Se secuenció la región entre 21 y 25 kDa con espectroscopía de masas.

Adicionalmente se hizo otra electroforesis en gel de SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor) y se cortaron los dos últimos carriles para revelar la actividad enzimática con α -naftil acetato y FastRed; la contraparte se tiñó con plata sin glutaraldehído para la identificación de la banda correspondiente a actividad. Se secuenció la región entre 140 y 160 KDa con espectroscopía de masas. La secuenciación de ambos geles de SDS-PAGE se realizó con ayuda del Dr. Guillermo Mendoza en el Laboratorio de Bioquímica, Péptidos y Proteínas de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.7 Purificación. Filtración en gel

Acondicionamiento de la muestra

Antes de inyectar la muestra a la columna, el liofilizado del extracto crudo se resuspendió en buffer de fosfatos de sodio 0.05M, dividió en 17 lotes, los cuales se ultrafiltraron hasta un volumen de 2 mL cada uno en un equipo Amicon®. Se tomaron 2 concentrados y se diluyeron 1:1 con buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, se ultracentrifugaron a 18,000 rpm / 10 min / 4°C y se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.22 μ para clarificar la muestra. Se determinó actividad cuantitativa y cualitativa antes de inyectar a la columna.

Filtración en gel (Sephacryl S-300®)

Para cada corrida se inyectaron 10 mL de muestra diluida, ultracentrifugada y filtrada a una columna de filtración en gel Sephacryl® S-300 High Resolution 26/60 (320 mL) by General Electric con un flujo de 1 mL / min, con una velocidad en el colector de 5min / tubo (5mL / tubo).

Evaluación de la actividad enzimática de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel

Después de la filtración en la columna se hizo una lectura de absorbancia a 280 nm a los 80 tubos del colector y se hizo un cromatograma graficando la absorbancia a 280 nm en eje de las y y con respecto al número de tubo en el eje de las x. Una vez que se tuvo el cromatograma se realizó un ensayo cualitativo de actividad enzimática a los 80 tubos salientes de la columna, para la primer corrida. Para las siguientes 16 corridas, una vez hecho el cromatograma, se corroboró que tuviera el mismo comportamiento y solamente se evaluó para actividad el intervalo de fracciones que mostraron actividad en la primera corrida.

Concentración de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel por liofilización

Las fracciones con actividad obtenidas de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®) se concentraron por liofilización. Al liofilizado se le determinó cantidad de proteína y actividad cuantitativamente y se realizaron geles SDS-PAGE para evaluar el perfil de proteínas.

7.8 Purificación. Intercambio aniónico

Acondicionamiento de la muestra

Antes de inyectar a la columna de intercambio aniónico, se liofilizaron las fracciones salientes de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®) con actividad, se dividieron en 6 lotes y cada uno se ultrafiltró en Amicon® hasta un volumen de 1 mL. Se determinaron cantidad de proteína y actividad cuantitativa antes de inyectar a la columna.

Intercambio Aniónico (Mono Q®)

Las muestras concentradas se inyectaron a una columna de intercambio aniónico Mono Q® de Pharmacia con un flujo de 0.5 mL / min con una velocidad en el colector de 5 min / tubo (2.5 mL / tubo).

Evaluación de la actividad enzimática de las fracciones recolectadas después del intercambio aniónico

Después del intercambio aniónico se hizo una lectura de absorbancia a 280 nm a los 16 tubos del colector y se hizo un cromatograma graficando la absorbancia a 280 nm en eje de las y y con respecto al número de tubo en el eje de las x. Una vez que se tuvo el cromatograma, se realizó un ensayo cualitativo de actividad enzimática a los 16 tubos salientes de la columna, para la primera corrida. Para las siguientes 5 corridas, una vez hecho el cromatograma, se corroboró que tuvieran el mismo comportamiento y solamente se evaluó para actividad el intervalo de fracciones que mostraron actividad en la primera corrida.

Concentración de las fracciones recolectadas después del intercambio aniónico por ultrafiltración

Las fracciones con actividad obtenidas de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®) se concentraron por ultrafiltración en equipo Amicon®. A los concentrados se les cuantificó proteína y actividad enzimática y se analizó el perfil de proteínas mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE.

La purificación por filtración en gel y por intercambio aniónico se realizaron con ayuda del M en C. Augusto González en el Laboratorio de Patología Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, en el Hospital General de México.

Determinación de punto isoeléctrico (IEF) de las fracciones recolectadas después del intercambio aniónico

Tratamiento de la muestra

Se concentró un volumen de 1.5 mL de la fracción B saliente de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®) en filtros Centricon® con una membrana de 3,000 kDa y se centrifugó (Biofuge PrimoR Heraeus) durante 5 minutos hasta

que se obtuvo un volumen final de 500 μ L. Se determinó actividad enzimática con α -naftil acetato antes y después de concentrar la muestra.

Se realizó un isoelectroenfoque posterior a la purificación por filtración en gel y posterior a la columna de intercambio aniónico. Se realizó en un sistema de detección rápido PhastSystem® (Pharmacia, Uppsala, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se empleó un gel de isoelectroenfoque de 3 a 9. (GE Healthcare) y se empleó un marcador de estándares de alto rango de puntos isoelectrónicos (GE Healthcare).

Para los ensayos de isoelectroenfoque efectuados a lo largo de la purificación se emplearon 5 μ L de la fracción saliente de la columna de filtración en gel concentrada por ultrafiltración con una concentración de 7.90 mgP/mL. Posteriormente se emplearon 5 μ L de la fracción A provenientes de la columna de intercambio aniónico y concentrados por ultrafiltración con una concentración de 4.75 mgP/mL y 5 μ L de la fracción B provenientes de la columna de intercambio aniónico y concentrados por ultrafiltración con una concentración de 2.28 mgP/mL. Se emplearon en cada gel 5 μ L del marcador.

Las proteínas se detectaron por tinción de plata y zimogramas utilizando (α -naftil acetato) como fue descrito anteriormente.

7.9 Caracterización cinética de las proteínas

Las proteínas purificadas se caracterizaron en cuanto a afinidad por largo de cadena de sustrato, efecto del pH y efecto de la temperatura en la actividad enzimática.

Efecto del largo de cadena en la actividad enzimática

Para evaluar el efecto del largo de cadena del sustrato en la actividad enzimática, para las dos fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico "Mono Q®", se siguió la cinética de hidrólisis de diferentes *p*-nitrofenil ésteres (*p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato y *p*-nitrofenil laurato) a un pH

de 7.2 y 30°C, de manera espectrofotométrica a una longitud de onda de 410 nm.

Se preparó 1 mL de stock 10 μ M de sustrato con 2.26% de Tritón x-100 y buffer de fosfatos de sodio 0.05 M. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en una celda de 1 mL con 880 μ L de buffer de fosfatos de sodio 0.05M, 100 μ L de stock 10 μ M (la concentración final de sustrato en reacción es de 1 μ M y 0.226% de Tritón x-100) y 20 μ L de enzima (Isobe, 1998). Se siguió la reacción durante 3 minutos espectrofotométricamente (Cary 400 Varian con un controlador de temperatura Cary Varian, acoplado a una computadora Dell).

Efecto del pH en la actividad enzimática

Se evaluó el efecto del pH en la actividad enzimática de las dos fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico "Mono Q®". Se siguió la cinética de hidrólisis de *p*-nitrofenil laurato a pH 5 (buffer de acetato de sodio 0.05M), 7.2 (buffer de fosfatos de sodio), 9 (buffer tris 0.05M) y 10 (buffer CAPS 0.05M) de manera espectrofotométrica a una longitud de onda de 410 nm.

Se preparó 1mL de stock 20 μ M de sustrato con 2.26% de Tritón x-100 y el buffer a evaluar. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en una celda de 1mL con 880 μ L de buffer, 100 μ L de stock 20 μ M (la concentración final de sustrato en reacción es de 2 μ M y 0.226% de Tritón x-100) y 20 μ L de enzima (Isobe, 1988). Se siguió la reacción durante 3 minutos espectrofotométricamente (Cary 400 Varian con un controlador de temperatura Cary Varian, acoplado a una computadora Dell).

Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de las dos fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®). Se siguió la cinética de hidrólisis de *p*-nitrofenil laurato a pH 7.2 a temperaturas

de 20°C, 30°C, 45°C de manera espectrofotométrica a una longitud de onda de 410 nm.

Se preparó 1mL de stock 20µM de sustrato con 2.26% de Tritón x-100 y el buffer de fosfatos de sodio 0.05M pH 7.2. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en una celda de 1mL, incubando 5 minutos 880µL de buffer y 100µL de stock 20µM (la concentración final de sustrato en reacción es de 2µM y 0.226% de Tritón x-100). Pasado el tiempo de incubación se agregaron 20µL de enzima. Se siguió la reacción durante 3 minutos espectrofotométricamente (Cary 400 Varian con un controlador de temperatura Cary Varian, acoplado a una computadora Dell).

7.10 Inmovilización de la enzima

Tratamiento del soporte

Se sumergió 1 g de soporte Accurel®, en agitación constante en las siguientes soluciones:

- Etanol durante 30 minutos
- Etanol:Agua desionizada durante 30 minutos
- Agua desionizada durante 30 minutos

Inmovilización de la enzima

Se inmovilizó el extracto crudo de acuerdo a las condiciones establecidas (Zúñiga, 2004).

7.11 Reacciones de síntesis e hidrólisis con el biocatalizador

Reacción de transesterificación

La mezcla de reacción consistió en 43.4 mg de tricaprilina y 56.7mg de CLA (proporción molar 1:2), 100 mg de biocatalizador (con un $A_w = 0.75$) y 3 mL de hexano. La reacción se llevó a cabo en viales ámbar de vidrio con tapón de rosca a 37°C por 72 h, con una agitación de 200 rpm en una incubadora con agitación orbital Innova 4000 (Ruiz, 2007).

Productos de transesterificación

Para la separación de los productos de reacción se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) con una mezcla de Éter de Petróleo: Éter Etílico: Ácido Acético (90:10:1), donde se eluyó tricaprilina y el(los) productos de la reacción de transesterificación. La elución se llevó a cabo en un vaso de precipitado de 100 mL con una tapa de vidrio. Como revelador se empleó yodo.

Reacción de desacetilación

Para evaluar la capacidad de hidrólisis de la enzima se emplearon de 10 a 20 mg de cada uno de los sustratos acetilados dejándose incubar con 100 mg del biocatalizador durante 72 h a 200 rpm y 37 °C.

Productos de desacetilación

Dependiendo de los sustratos estudiados, los productos de reacción obtenidos se analizaron mediante una cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cloroformo; tolueno:ácido acético (7:1:0.5) v/v como eluyente. Como revelador se empleó sulfato sérico.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Verificación morfológica y de actividad enzimática de *B. pumilus* GMA1

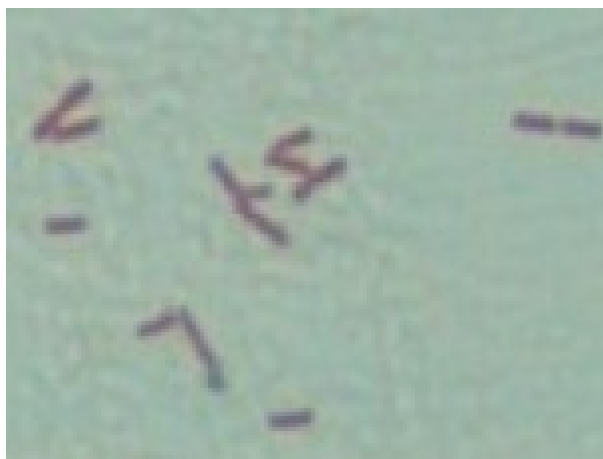
Figura 5. Crecimiento de *B. pumilus* GMA1 en medio BHI a las 24 horas de fermentación



Se aprecia el crecimiento del microorganismo en medio líquido por turbidez a las 24 horas de incubación y formación de un agregado celular en el fondo del matraz en contraste con el medio sin inocular.

En cuanto a las características microscópicas de *B. pumilus* GMA1, se observaron bacilos largos, Gram (+), con presencia de endoesporas terminales.

Figura 6. Tinción de Gram de *B. pumilus* GMA1 (100x)



Las características macroscópicas de *Bacillus pumilus* GMA1 se muestran en la figura 7. Se observan UFC amarillas con elevación mínima, de forma redonda y aspecto cremoso, con textura lisa y bordes mellados característicos de *Bacillus pumilus* GMA1.

Figura 7. *B. pumilus* GMA1 en medio sólido.



Se aprecia la formación de halos de claridad alrededor de las colonias, indicativos de la presencia de actividad enzimática, empleando como sustrato tibutirina al 0.5%. Foto tomada a las 24 h de incubación.

8.2 Determinación de actividad enzimática y electroforesis del extracto crudo

Se determinó actividad enzimática y cantidad de proteína para poder calcular la actividad específica de las enzimas de interés.

Tabla 14. Actividad enzimática específica para el extracto crudo

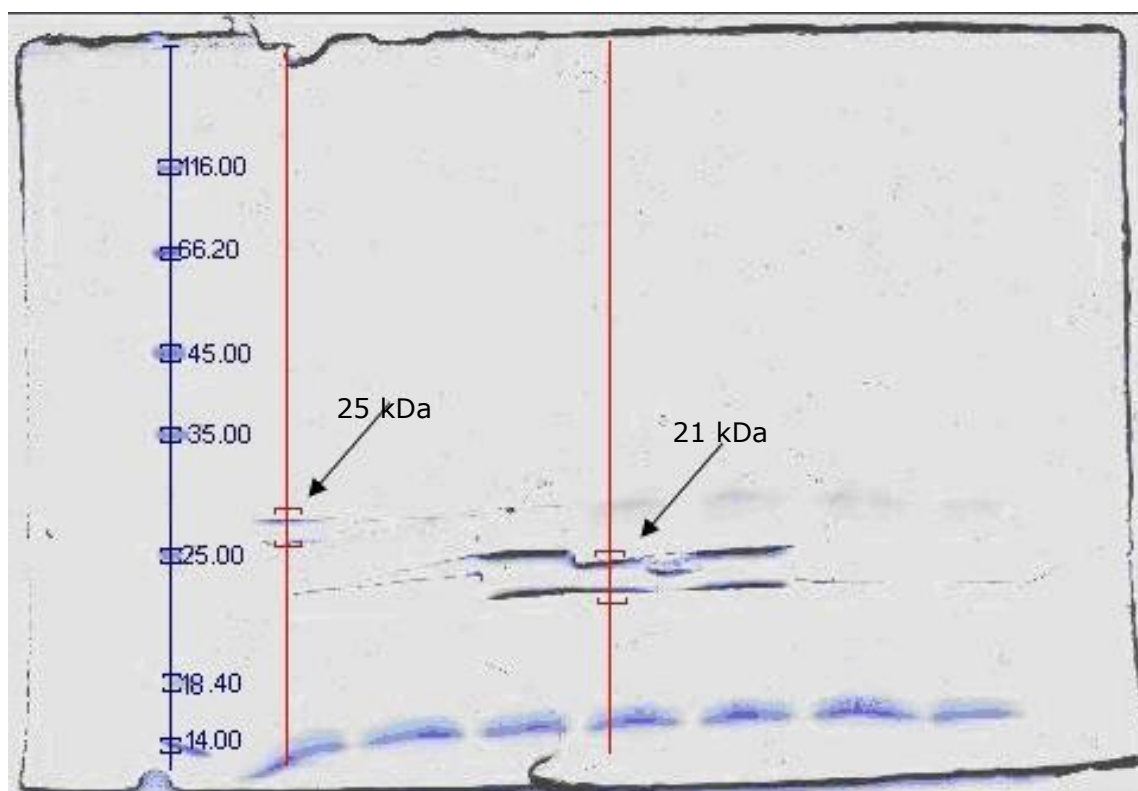
Actividad enzimática (U/mL)	0.844
Cantidad de proteína (mg P/mL)	51.03
Actividad específica (U/mg P)	0.031

- Método de determinación enzimática (Nawani, 2000).

Una manera de conocer el peso molecular real de una proteína es hacer una electroforesis en un gel PAGE con SDS para neutralizar la carga de la misma; además es necesario un agente desnaturizante como el DTT y calor para que la migración de la proteína durante la electroforesis sea únicamente debida al peso molecular. Para identificar la proteína responsable de la actividad enzimática es necesaria su renaturalización y así permitir la formación de la estructura activa de la proteína.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de SDS-PAGE desnaturizante (DTT, calor, tinción con azul de Coomassie) del extracto crudo ultrafiltrado con una membrana de 10 kDa y, por lo tanto, la detección de actividad no fue posible debido a que no se renaturalizaron las enzimas.

Figura 8. Perfil de proteínas del extracto crudo (SDS-PAGE)



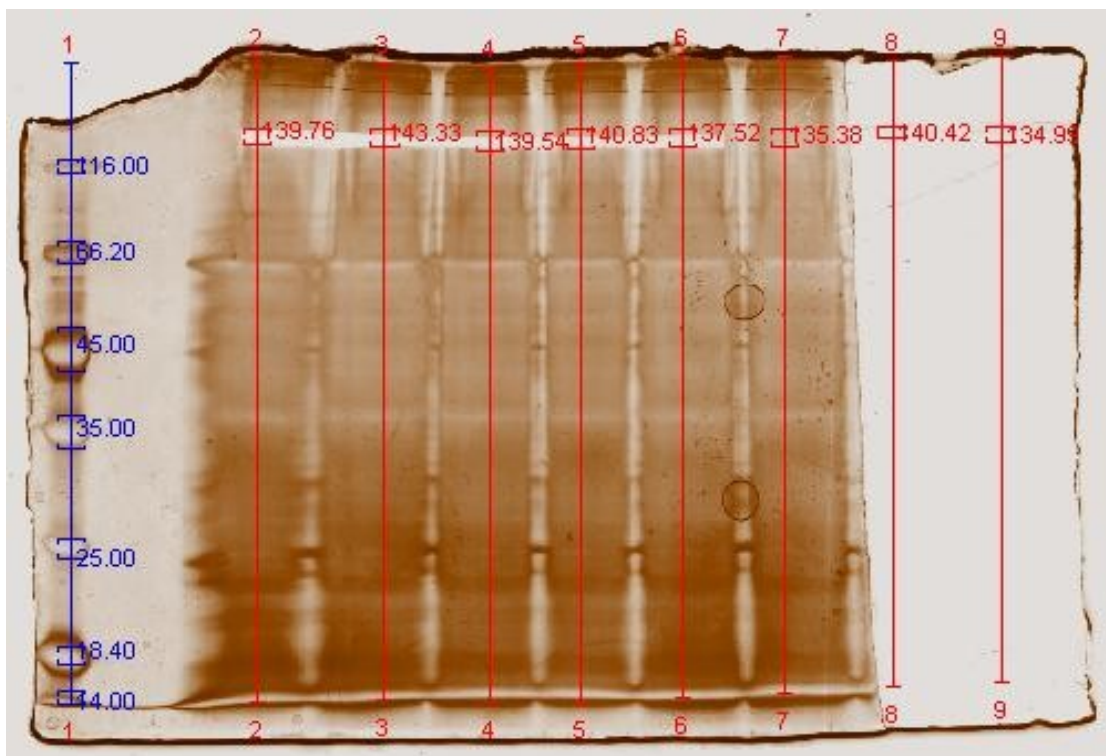
SDS-PAGE desnaturizante (DTT, calor, tinción azul de Coomassie). Carril (1) Marcador de bajo peso molecular, carriles (2 – 10) Extracto crudo.

Se hizo un corte en la región de 21 y 25 kDa y se secuenció por espectroscopía de masas. No se encontró la secuencia de la lipasa reportada por Bustos (1995). La banda en 25 kDa corresponde a la secuencia de la enzima

manganeso superóxido dismutasa SodA [*Bacillus pumilus* SAFR-032] y la secuencia de la banda en 21 kDa corresponde a una peroxiredoxina YgaF [*Bacillus pumilus* SAFR-032] (Anexo IV).

Para identificar la banda responsable de la actividad enzimática se realizó una electroforesis en gel de SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor). Se tiñó con plata sin glutaraldehído (carriles 1-7) y su contraparte se reveló para detectar actividad enzimática (Karpushova, 2005) con la finalidad de secuenciar la proteína responsable de la misma.

Figura 9. Perfil de proteínas del extracto crudo (SDS-PAGE)



SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor, tinción plata y actividad enzimática). Carril (1) Marcador, Carriles (2 - 7) Extracto crudo y Carriles (8, 9) Extracto crudo.

En la figura 9 se observa el perfil proteico del extracto crudo concentrado así como la banda responsable de la actividad enzimática.

Se hizo un corte del gel teñido con plata en la región correspondiente a la banda que reveló la actividad (140 kDa), sin embargo, a pesar de observar

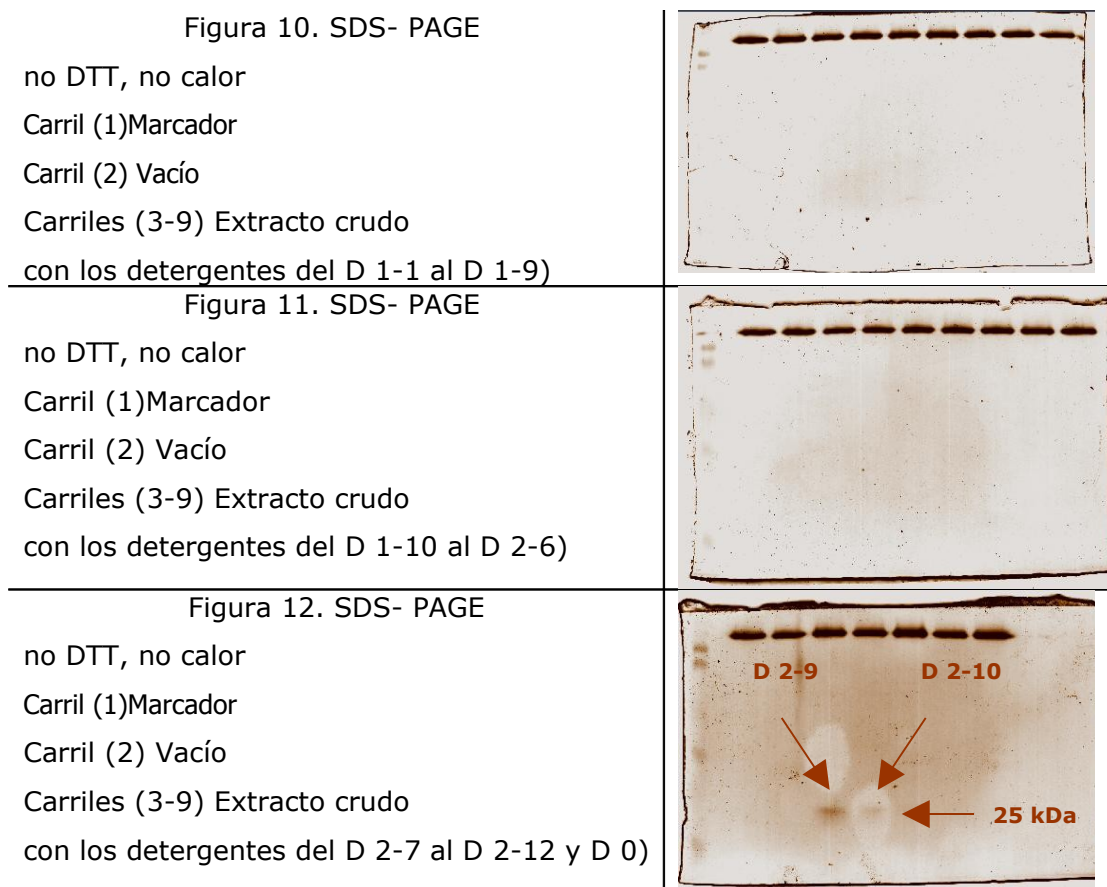
actividad enzimática, la cantidad de proteína no fue suficiente para ser secuenciada por espectroscopía de masas.

El peso molecular que se observa (140 kDa) podría tratarse de un agregado debido a la hidrofobicidad de las enzimas ya que de las 24 enzimas con actividad carboxilesterasa presentes en el genoma de *B. pumilus* (tabla 9) ninguna presenta pesos mayores a 67 kDa.

8.3 Ensayo de renaturalización con detergentes

Debido a que no fue posible la renaturalización usando Tritón x-100 se realizó un ensayo en el cual se probaron 24 diferentes detergentes para observar si alguno de ellos era capaz de disgregar a la proteína conservando la actividad enzimática. Se empleó marcador preteñido de bajo peso molecular (BioRad®).

Figuras 10 a 12. Ensayo de renaturalización con detergentes. SDS-PAGE



Se observa que dos de los veinticuatro detergentes probados D2-9(3-decyldimethyl ammonio) propane-1-sulfonate) y D2-10 heptyl-β-D-

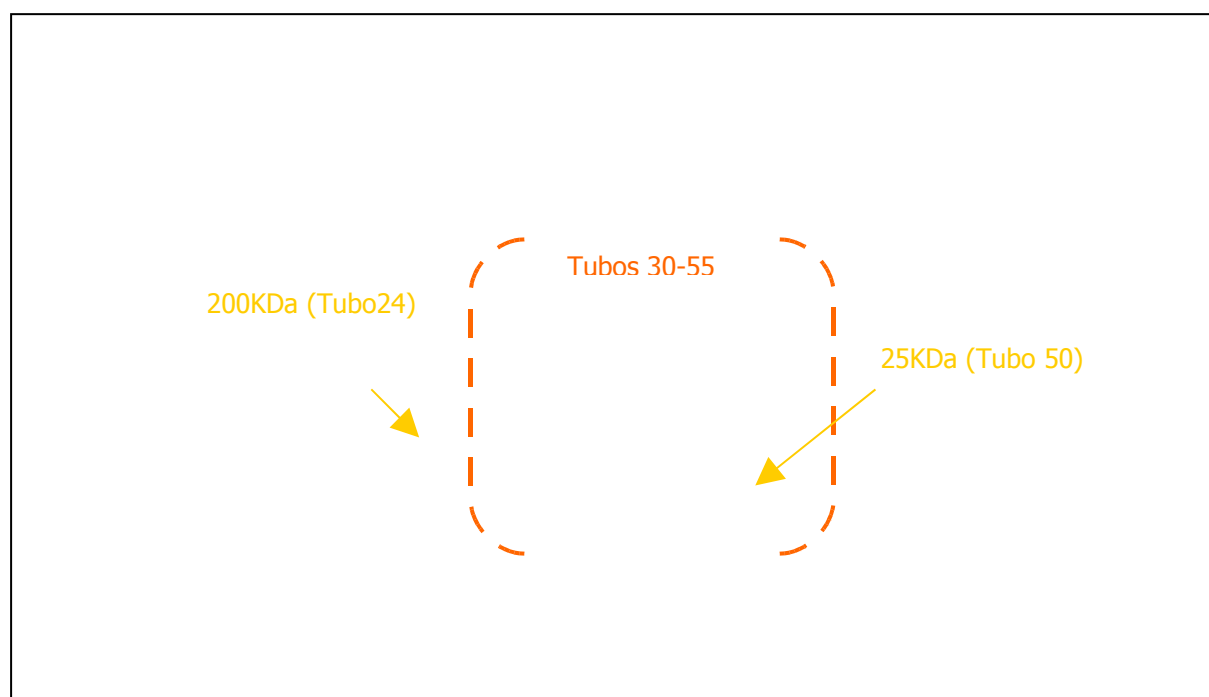
glucopyranoside), revelaron una zona de actividad difusa en un peso molecular aproximado a 25 kDa, sin embargo, la banda definida con mayor intensidad, permanece en la región correspondiente a 140 kDa.

8.4 Purificación por filtración en gel (Sephacryl S- 300®)

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de renaturalización (figura 12) se purificó la enzima por filtración en gel (técnica que permite la separación de moléculas de acuerdo a su peso molecular).

Después de inyectar la muestra en la columna se realizó un cromatograma con las fracciones obtenidas así como para los pesos moleculares de referencia como se muestra a continuación.

Figura 13. Cromatograma de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel. (Sephacryl S-300®)

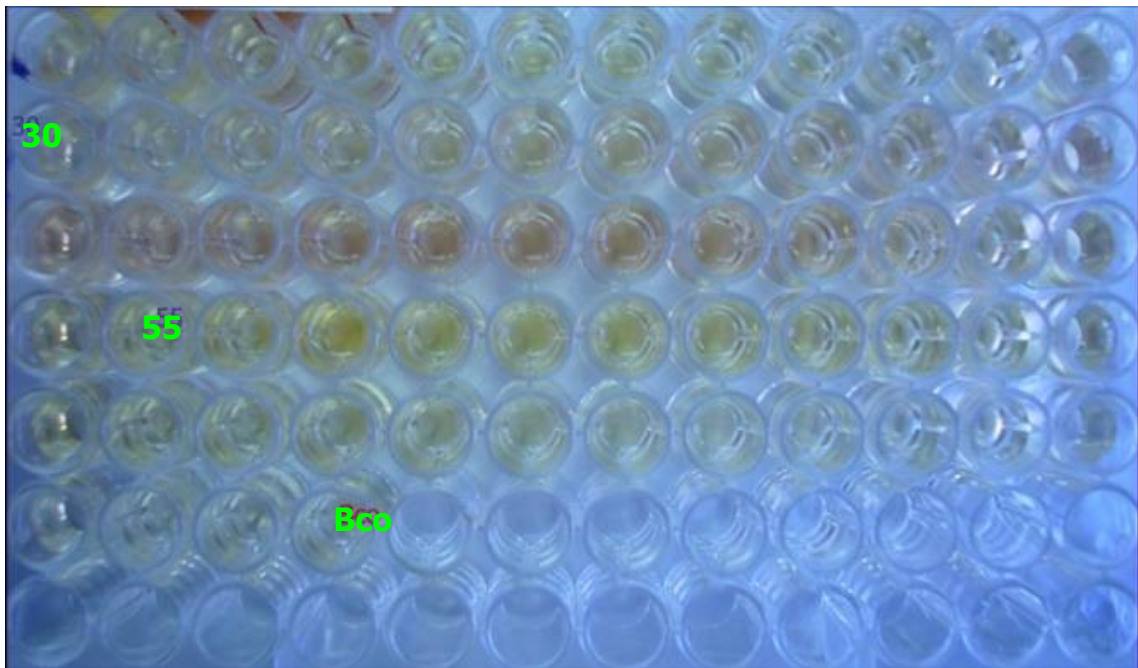


Se graficó el número de tubo de las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel en el eje X y su correspondiente absorbancia a 280 nm en el eje Y (color naranja). También se graficó la elución de los pesos moleculares de referencia (color amarillo). La línea punteada naranja corresponde a las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel que presentaron actividad enzimática.

Determinación de actividad enzimática cualitativa de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel

A cada fracción obtenida de la columna Sephacryl S-300® se le determinó actividad enzimática cualitativamente para conservar las fracciones de interés.

Figura 14. Determinación de actividad enzimática cualitativa de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel



- Método de determinación de actividad enzimática (Karpushova, 2005).

Se observa que la actividad enzimática se presenta en los tubos 30-55, donde hay una coloración marrón más intensa. Después de las 17 corridas se filtró una muestra con dos pesos moleculares de referencia; el peso de referencia para 25 kDa aparece en el tubo 50 y el peso de referencia para 200 kDa aparece en el tubo 25, así que se trabajó con una enzima con un peso molecular mayor a 25 kDa y menor a 200 kDa. Esto indica que la forma agregada (140-160 kDa) permanece activa.

Concentración de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel y determinación de actividad enzimática

Previo a la electroforesis de proteínas y para seguir con la purificación de la muestra se tomaron los volúmenes de los tubos 30-55 de las 17 corridas y se concentraron por liofilización, donde se obtuvieron 15 g de liofilizado, a los que se les determinó actividad cuantitativamente y se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 15. Actividad enzimática específica. Sephacryl S-300®

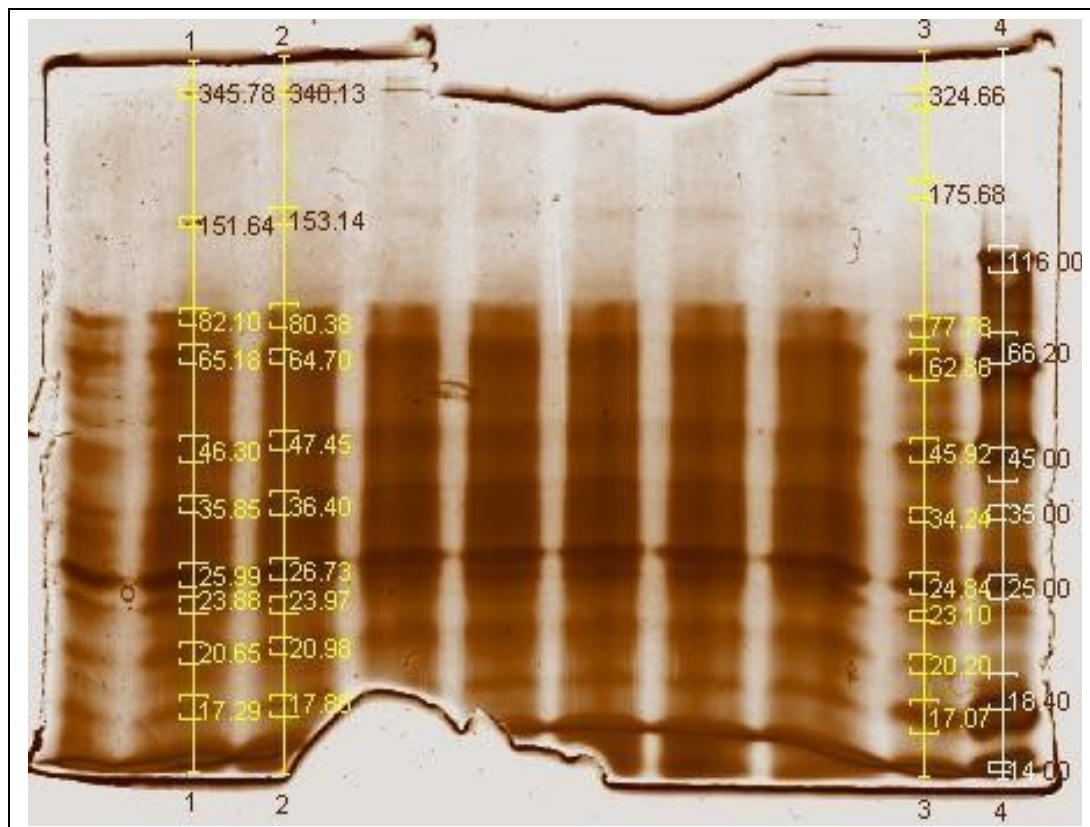
<i>Actividad Enzimática</i> <i>(U/mL)</i>	0.08
<i>Cantidad de</i> <i>Proteína</i> <i>(mgP/mL)</i>	1.85
<i>Actividad Específica</i> <i>(U/mgP)</i>	0.043

- Método de determinación enzimática (Nawani, 2000).

Electroforesis en gel SDS-PAGE de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel

Se pesó 1.5 g de liofilizado, se resuspendió en 3 mL de buffer de fosfatos de sodio 0.05 M y se concentró por ultrafiltración en Amicón® hasta un volumen de 0.5 mL para realizar una electroforesis en gel de SDS-PAGE.

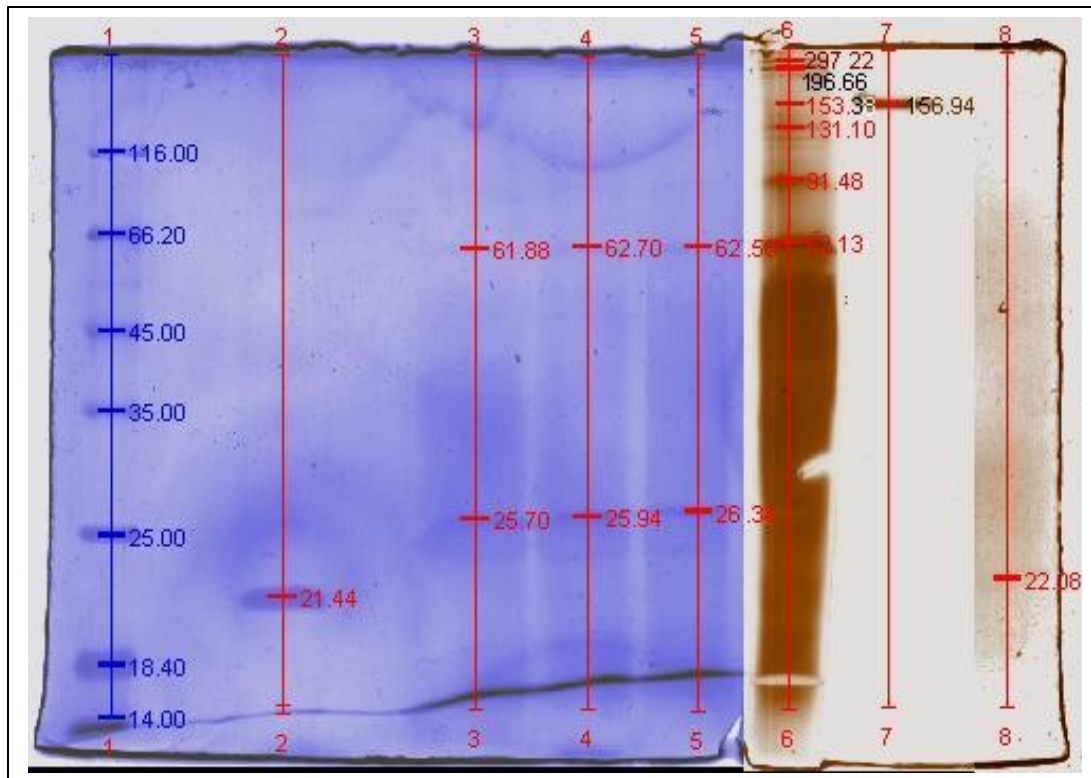
Figura 15. Perfil de proteínas del concentrado de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®. SDS-PAGE)



SDS-PAGE desnaturalizante (beta-mercaptoetanol, calor, tinción plata). Carriles (1, 2 y 3) Muestra semipura, carril (4) Marcador.

En la figura 15 se observa el perfil de proteínas del concentrado de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel Sephacryl S-300®, tratadas con beta-mercaptoetanol. Se observa un patrón de bandas aún muy complejo, teniendo bandas desde los 17 kDa, hasta los 350 kDa aproximadamente.

Figura 16. Perfil de proteínas del concentrado de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®. SDS-PAGE)



SDS- PAGE semidesnaturalizante [no beta-mercaptoetanol, no calor]. Tinción con azul de Coomassie carriles (1-5), tinción con plata carril (6) y actividad carriles (7 y 8). Carril (1) Marcador, carril (2) Control positivo (lipasa recombinante *B. pumilus*), carriles (5-7) Muestra semipura, carril (8) Control positivo.

En la parte teñida con azul de Coomassie (carril 2) y en la parte revelada para actividad enzimática (carril 8) hay bandas definidas en un peso molecular de 21.44 kDa, que corresponde al control positivo, que no aparece en los carriles 3, 4 ó 5; en éstos carriles se muestran bandas en 25, y 66 kDa aproximadamente; lo que indica que se trabajó con una enzima diferente a la reportada anteriormente (Bustos, 1995). En el carril 6, que contiene la muestra semipura teñida con plata, se observan bandas por arriba de los 66 kDa que en la tinción con azul de Coomassie no se aprecian debido a que la tinción de plata es mucho más sensible y detecta menor cantidad de proteína. Comparando la parte de plata y de actividad (carril 7) se localiza una banda con actividad carboxilesterasa en la región de 154 kDa aproximadamente.

Isoelectroenfoque de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel

Se realizó un gel de IEF 3-9 Phast Gel®, cargado a partir del concentrado por liofilización y ultrafiltración de la muestra semipura (Sephacryl S-300®) y el control positivo para comparar los puntos isoeléctricos.

Figura 17. IEF del concentrado proveniente de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®)



Carril (1) Marcador, carril (2) Muestra semipura, carriles (3, 4) Control positivo (lipasa recombinante *Bacillus pumilus*) y carril (5) Muestra semipura. Carriles 1, 2 y 3 teñidos con plata para Phast Gel®. Los carriles 4 y 5 se revelaron para actividad enzimática (Karpushova, 2005) con α -naftil acetato y Fast Red.

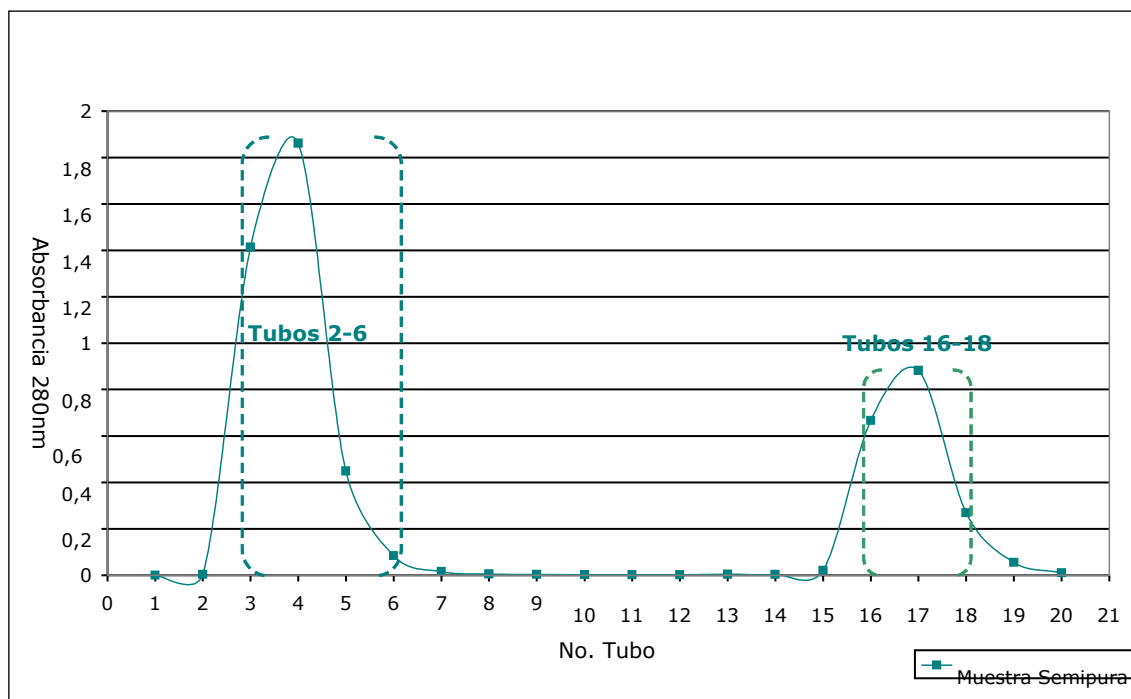
El control positivo (carriles 3 y 4) muestra una banda en un punto isoeléctrico de 9.06 (plata) y de 9.02 (actividad). En el carril 2, en la parte teñida con plata se observa la presencia de tres bandas en puntos isoeléctricos entre 4.55 y 6.55, que en la parte correspondiente a actividad enzimática corresponde a un punto isoeléctrico de 5.38; también se observa una banda en la región de 9.30, tanto en la parte de actividad enzimática, como en tinción de plata.

Este resultado indica que en la zona que se presenta actividad en los geles de SDS-PAGE semidesnaturalizantes realizados tanto con el extracto crudo como con la muestra semipura hay por lo menos dos enzimas diferentes.

8.5 Purificación por intercambio aniónico (Mono Q®)

Debido a la presencia de dos bandas con puntos isoeléctricos diferentes que revelaron actividad enzimática en el gel de IEF de la muestra proveniente de la columna de filtración en gel se procedió a la separación de éstas mediante una columna de intercambio aniónico. Después se realizó un cromatograma con las fracciones como muestra la figura 18.

Figura 18. Cromatograma de las fracciones salientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®).



Se graficó el número de tubo de las fracciones eluidas de la columna de intercambio aniónico en el eje X y el promedio de las absorbancias a 280 nm de las 6 corridas correspondientes en el eje Y. Las líneas punteadas azules corresponden a las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel que presentaron actividad enzimática.

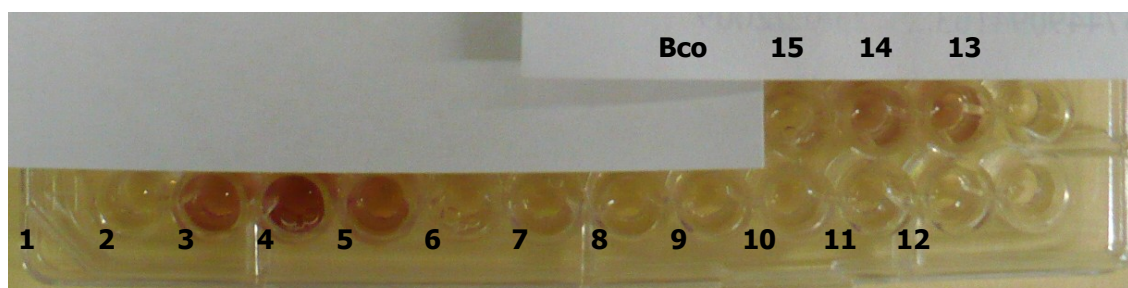
Debido a que se utilizó una columna de intercambio aniónico (cargada positivamente) las proteínas que debido a su punto isoeléctrico y a pH de 7.2 (buffer A: fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2) se encuentren cargadas negativamente se unirán a la columna, a diferencia de aquéllas que debido a su punto isoeléctrico y pH de 7.2 (buffer A: fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2) estén cargadas positivamente que no se unirán a la matriz. Para eluir las proteínas que se unieron a la columna debido a su carga, se utilizó un segundo buffer (buffer B: fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2 adicionado con una

concentración 1 M de cloruro de sodio). El segundo pico en el cromatograma resultó en una concentración del 25% del buffer A y 75% del buffer B (0.75 M de cloruro de sodio).

Determinación de actividad enzimática cualitativa de las fracciones recolectadas después de la columna de intercambio aniónico

Se le determinó actividad enzimática cualitativa a cada fracción saliente de la columna Mono Q®, así para cada corrida y conservar las fracciones de interés.

Figura 19. Determinación de actividad enzimática cualitativa para la primera corrida eluida de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®)



- Método de determinación de actividad enzimática (Karpushova, 2005).

Se observa actividad enzimática en los tubos 2, 3, 4, así como en los tubos 14 y 15; la mayor intensidad se aprecia en el tubo 3.

Se trabajaron los tubos 2-6 de las 6 corridas como fracción A, correspondiente a las proteínas cargadas positivamente a pH 7.2 y los tubos 16-18 de las 6 corridas como fracción B, correspondiente a las proteínas cargadas negativamente al mismo pH.

De la fracción A se obtuvieron 27 mL que se concentraron por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa hasta 2.7 mL; de la fracción B se obtuvieron 35 mL que se concentraron por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa hasta 3.3 mL.

Determinación de actividad enzimática cuantitativa de las fracciones recolectadas después de la columna de intercambio aniónico

Una vez concentradas las fracciones A y B por ultrafiltración, se les determinó actividad enzimática de manera cuantitativa, así como la cantidad de proteína para poder determinar la actividad específica para cada fracción.

Durante la purificación de la proteína de interés es importante el monitoreo de actividad específica en cada etapa del procedimiento.

En la imagen 35 se observa que la actividad específica (U/mg P) de la fracción A proveniente de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®) aumentó 10.25 veces con respecto a la actividad específica en el extracto crudo, con un factor de purificación de 9.78 y un rendimiento del 0.14%.

La fracción B proveniente de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®) aumentó 13.12 veces con respecto a la actividad específica en el extracto crudo, con un factor de purificación de 12.73 y un rendimiento de 0.11%.

Tabla 16. Monitoreo de actividad enzimática

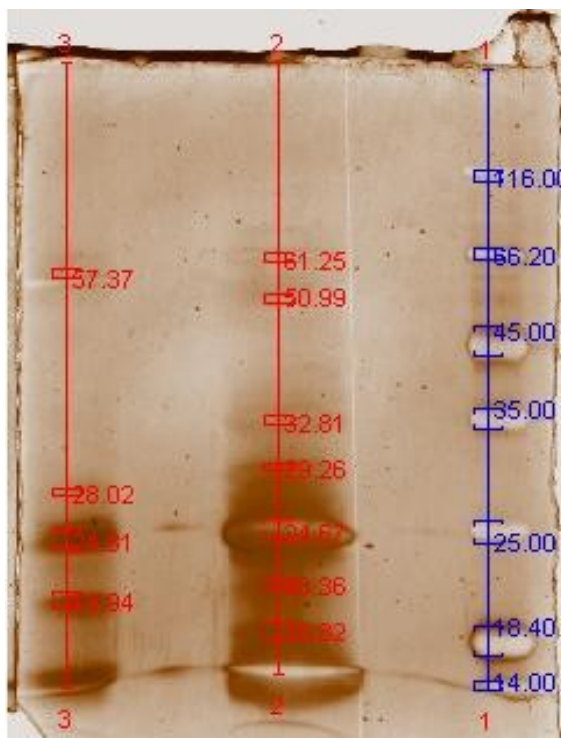
	Volumen de Fracción (mL)	Proteína (mgP/mL)	Actividad Volumétrica ($\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$) (U/mL)	Actividad Volumétrica Total (U)	Proteína Total (mgP)	Actividad Específica (U/mgP)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
Extracto Crudo	1685	51.03	0.844	1422.14	85935.0	0.016	100	1
Concentración (Liofilización)	376	78.26	2.037	765.90	29425.7	0.026	53.85	1.57
Concentración (Ultrafiltración-Amicon 10 kDa)	115	64.17	1.654	190.21	7379.5	0.025	13.37	1.51
Clarificación (Centrifugación)	115	52.78	1.657	190.55	6069.7	0.031	13.39	1.80
Acondicionamiento (Dilución y Filtración con membrana 0.22 μ)	170	9.60	1.240	210.80	1632.0	0.128	14.82	7.75
Sephacryl S-300 Concentrado (Liofilización)	1581.3	1.85	0.080	126.50	2925.4	0.043	8.89	2.60
Acondicionamiento (Ultrafiltración-Amicon 10 kDa)	6	7.90	0.696	4.17	47.4	0.087	0.29	5.27
Fraccion A (Ultrafiltración-Amicon 10 kDa) pI = 9.03	2.7	4.75	0.770	2.07	12.8	0.164	0.14	9.78
Fraccion B (Ultrafiltración-Amicon 10 kDa) pI = 5.32	3.3	2.28	0.479	1.58	7.5	0.210	0.11	12.73

La cantidad de proteína se evaluó con el método de BCA y la actividad enzimática se monitoreó mediante el método de hidrólisis de p-NFA (1 μM) con 1% de acetona en buffer de fosfatos de sodio 0.05 M pH 7.2 y 30 °C (Nawani, 2000).

Electroforesis en gel de SDS-PAGE de las fracciones recolectadas después de la columna de intercambio aniónico

Para evaluar el perfil proteico de las fracciones A y B se llevó a cabo una electroforesis en gel de SDS-PAGE desnaturalizante como muestra la figura 20.

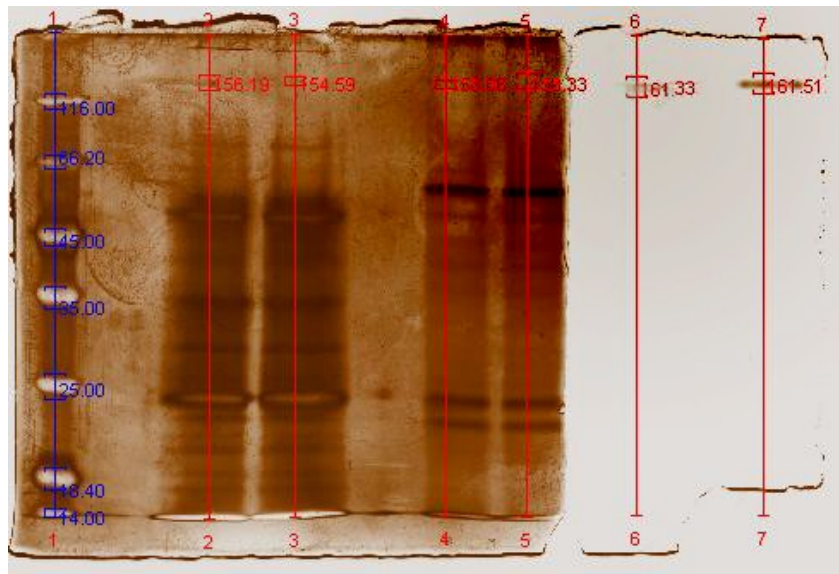
Figura 20. Perfil de proteínas de las fracciones A y B concentradas provenientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®. SDS-PAGE)



SDS-PAGE desnaturalizante (DTT, calor, tinción de plata). Carril (1) Marcador, carril (2) Fracción B, carril (3) Fracción A.

En la figura 20 se observa una menor cantidad de bandas lo cual indica que la purificación ha sido parcialmente exitosa puesto que se han perdido proteínas que no son de interés para el trabajo. El patrón de bandas en ambas fracciones es distinto por lo que podrían tratarse de enzimas diferentes. Se corrió una electroforesis en gel de SDS-PAGE, se tiñó con plata y se reveló para actividad.

Figura 21. Perfil de proteínas y actividad enzimática de las fracciones A y B concentradas provenientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®. SDS-PAGE)



SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor, tinción plata y actividad enzimática). Carril (1) Marcador, carriles (2, 3) Fracción A, carriles (4, 5) Fracción B, carril (6) Fracción B, carril (7) Fracción A.

La figura 21 muestra que tanto la fracción A, como la fracción B, presentan actividad enzimática en la misma región de peso molecular correspondientes a proteínas en peso molecular de 161.33 y 161.5 kDa, respectivamente.

Determinación de punto isoeléctrico (IEF) de las fracciones A y B recolectadas después de la columna de intercambio aniónico

Para determinar el punto isoeléctrico de cada fracción se realizó un gel de IEF 3-9 Phast Gel®, cargado a partir de los concentrados por ultrafiltración de las fracciones A y B provenientes de la columna de intercambio aniónico Mono Q®.

Figura 22. IEF de las fracciones A y B concentradas provenientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®).



Carril (1) Marcador, carril (2) Extracto crudo, carriles (3 y 6) Fracción A, carriles (4 y 5) Fracción B. Se tiñó con plata con el método de Phast Gel® para los carriles 1, 2, 3 y 4 y los carriles 5 y 6 se revelaron para actividad enzimática (Karpushova, 2005) con α -naftil acetato y Fast Red.

La fracción A (carril 3) muestra 7 bandas en la parte teñida con plata, dos de ellas revelaron actividad enzimática (carril 6) correspondiente a dos puntos isoeléctricos diferentes en 9.06 y 5.32. La fracción B (carril 4) en la parte teñida con plata muestra 6 bandas, que en la parte de actividad concuerda solo con una banda en un punto isoeléctrico de 5.32.

Como muestra la figura 22 se consiguió que en la fracción A se concentrara la enzima con punto isoeléctrico de 9.06 aunque todavía contiene también la

enzima con punto isoeléctrico de 5.32. Por el otro lado se logró que la fracción B solo contuviera la actividad dada por la enzima de punto isoeléctrico de 5.32. Esto indica que la actividad enzimática de la fracción A sea en su mayoría dada por una enzima con punto isoeléctrico de 9.06, mientras que la actividad enzimática de la fracción B esté dada solo por una enzima con punto isoeléctrico de 5.32.

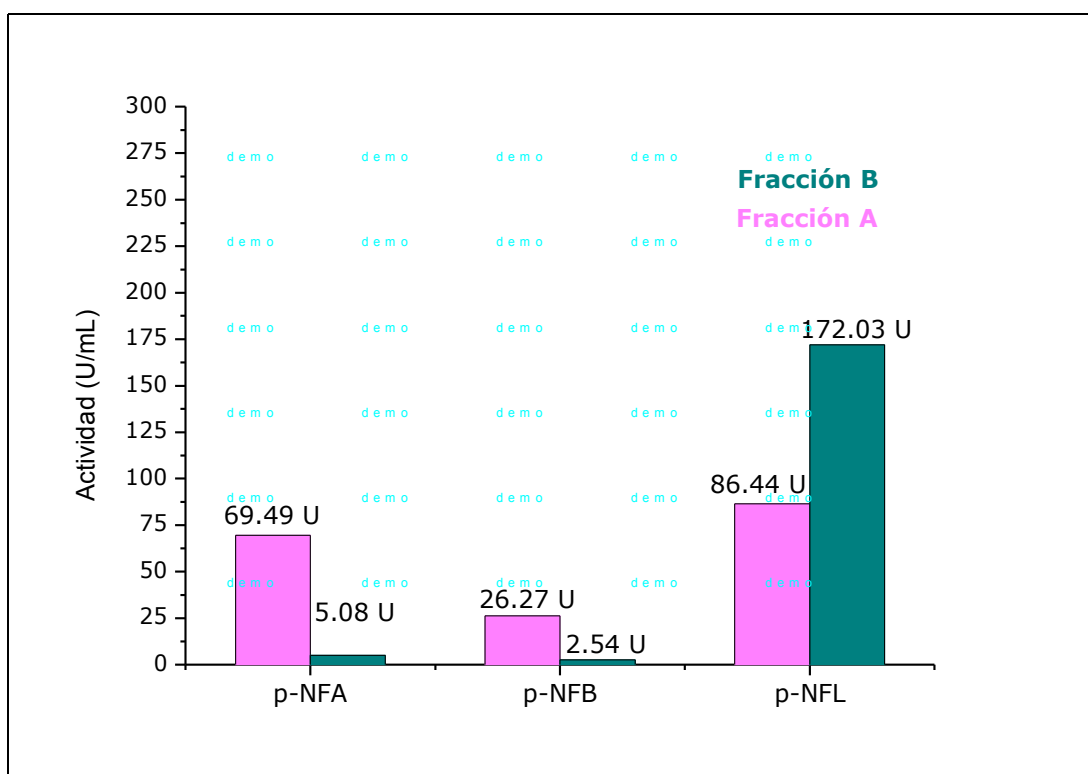
Se puede afirmar que la actividad enzimática en el extracto crudo bajo las condiciones de cultivo está dada por dos enzimas con puntos isoeléctricos diferentes por lo cual se decidió realizar una caracterización de éstas evaluando diferentes parámetros como longitud de largo de cadena en la hidrólisis, temperatura y pH.

8.6 Caracterización de las enzimas

Efecto de longitud de cadena en la actividad enzimática

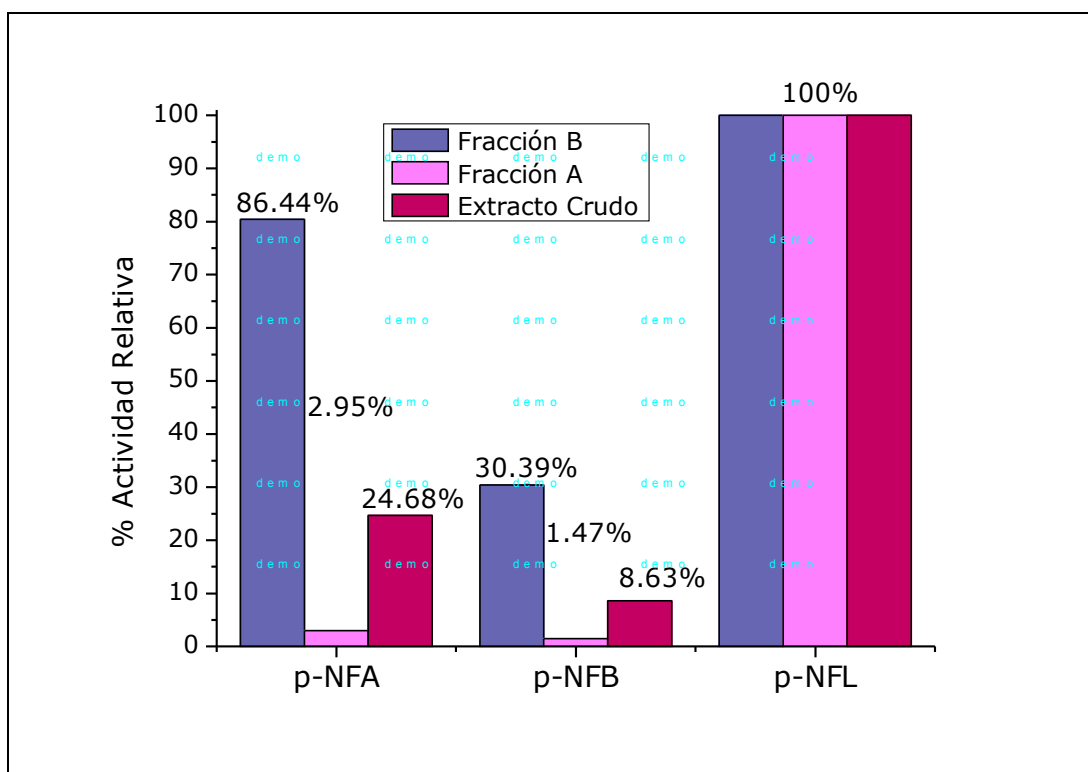
Se evaluó el efecto del largo de cadena en la hidrólisis para las dos fracciones salientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®).

Figura 23. Efecto del largo de cadena en la actividad enzimática



Se evaluó la actividad enzimática (Isobe, 1988) de ambas fracciones a pH de 7.2 y 30°C con sustratos diferente largo de cadena (acetato C:2, butirato C:4 y laurato C:12). La fracción A muestra buena actividad con *p*-nitrofenil laurato y con *p*-nitrofenil acetato, sin embargo la fracción B muestra mayor actividad con *p*-nitrofenil laurato.

Figura 24. % Actividad Relativa de acuerdo al efecto de la longitud de cadena en la hidrólisis



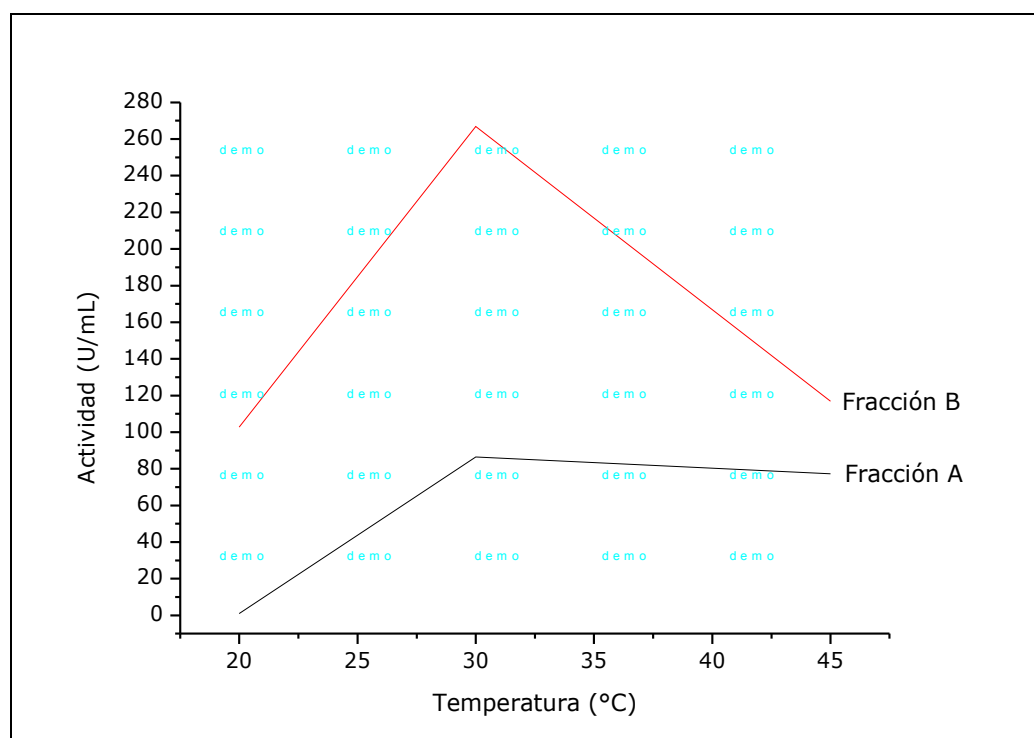
Se calculó el % de actividad relativa, tomando como el 100% el valor de actividad más alto, tanto para el extracto crudo, como para las dos fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico con los diferentes *p*-nitrofenil ésteres evaluados bajo las mismas condiciones. Para las tres muestras, el *p*-nitrofenil laurato mostró ser el éster sobre el que la enzima mostró mayor actividad.

Se presume que por el comportamiento que mostró el extracto crudo con respecto a la actividad con los diferentes *p*-nitrofenil ésteres, que en el extracto crudo hay una mayor proporción de la fracción B que de la fracción A, además de que en todos los parámetros evaluados, la fracción B mostró tener mayor actividad volumétrica.

Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Una vez que se determinó el efecto del largo de cadena en la actividad enzimática de las dos fracciones obtenidas de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®) se evaluó el efecto de la temperatura para cada una de las fracciones, considerando que la actividad para ambas con el *p*-nitrofenil laurato fueron máximas.

Figura 25. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática

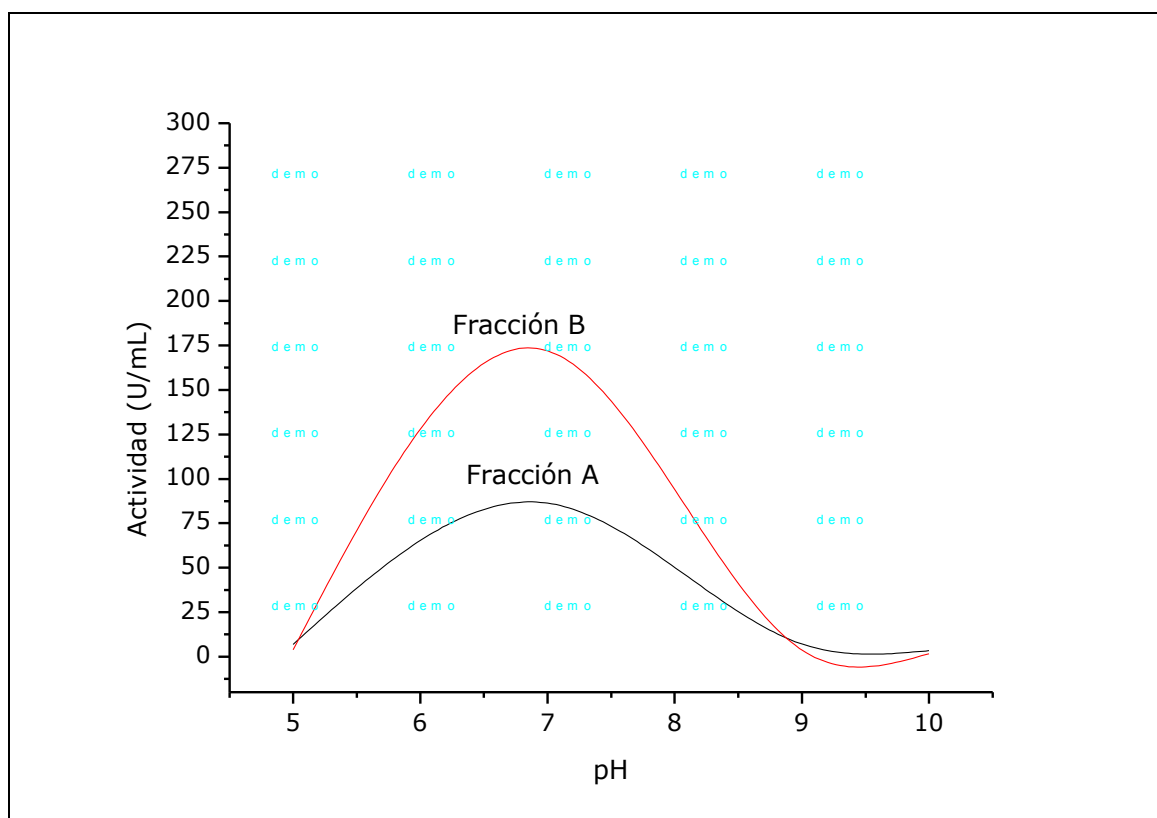


Se evaluó la actividad enzimática (Isobe, 1988) de ambas fracciones a diferentes temperaturas. La fracción A mostró ser más resistente a 45 °C, sin embargo muestra un máximo de actividad a 30 °C. La fracción B se muestra el máximo de actividad a 30 °C con un decaimiento de más de 150 U/mL a 45 °C.

Efecto del pH en la actividad enzimática

Una vez que se estudió el efecto de la longitud de cadena y de la temperatura, se evaluó el efecto del pH en la actividad enzimática.

Figura 26. Efecto del pH en la actividad enzimática



Se evaluó la actividad enzimática (Isobe, 1988) de ambas fracciones a diferente pH (5, 7.2, 9 y 10). Sin embargo no se observan diferencias entre las dos fracciones. Ambas fracciones presentan actividad máxima a pH de 7.2.

8.7 Reacciones con el biocatalizador elaborado con extracto crudo

Anteriormente en el grupo de trabajo se llevaron a cabo reacciones de síntesis e hidrólisis con la enzima soluble (Ruiz, 2007) sin embargo para su potencial aplicación a nivel industrial se desarrolló un biocatalizador inmovilizando el extracto crudo en una matriz de polipropileno microporoso (Accurel® MP1000) con un porcentaje de adsorción del 99%, manteniendo la actividad enzimática.

Productos de transesterificación

Se llevó a cabo una reacción de transesterificación de tricaprilina con ácido linoleico conjugado. Se separaron los productos de reacción mediante CCF y se compararon con los resultados obtenidos por Ruiz (2007) con la enzima soluble.

Figura 27. CCF. Transesterificación con biocatalizador

Producto de reacción

B2

B3

En la figura 27 el carril A muestra el estándar de tricaprilina con un R_f de 0.95. En el carril B se observa el producto de reacción con un R_f de 0.88, así como subproductos de la reacción. En el carril C se observa el estándar de CLA con un R_f de 1.0, así como subproductos de la reacción.

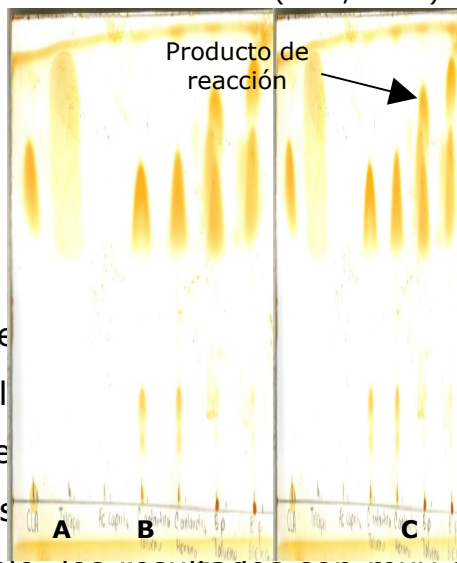
Se observa que el ensayo es reproducible, los resultados son muy similares, y las diferencias en R_f pueden explicarse por el tipo de cámara utilizada para la elución más que por el hecho de emplear enzima inmovilizada.

- (A) Estándar Tricaprilina, $R_f = 0.95$
- (B) Rxn con hexano $A_w = 0.7$, $R_f = 0.88$
- (B2) Subproducto de Reacción
- (B3) Subproducto de Reacción

Productos de desacetilación

También se llevó a cabo una reacción de desacetilación del ácido ferúlico. Se separaron los productos de reacción mediante CCF y se compararon con los resultados obtenidos por Ruiz (2007) con la enzima soluble.

Figura 28. CCF. Transesterificación con enzima libre (Ruiz, 2007)



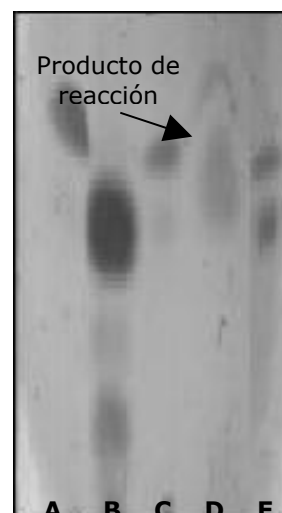
Producto de reacción

- (A) Estándar CLA, $R_f = 0.78$
- (B) Estándar de Tricaprilina, $R_f = 0.95$
- (C) Rxn con hexano $A_w = 0.7$, $R_f = 1.0$.
- Elución en cámara cerrada

Figura 29. CCF. Desacetilación con biocatalizador



Figura 30. CCF. Desacetilación con enzima libre



Revelador: Sulfato sérico.

- (A) Estándar compuesto puro Rf 1.8;
 (B) Blanco Rf 1.65;
 (C) Rxn con biocatalizador de *B. pumilus* GMA1 compuesto desacetilado Rf 1.45.

Revelador: Vainillina.

- (A) Estándar compuesto puro Rf 0.4;
 (B) Estándar compuesto desacetilado Rf 0.3;
 (C) Blanco Rf 0.38;
 (D) Control positivo Rf 0.38;
 (E) Rxn con enzima libre de *B. pumilus* GMA1

En la figura 29 se observa el estándar de ácido ferúlico puro acetilado con un Rf de 1.8, el blanco de reacción con Rf de 1.65 y el compuesto desacetilado como producto de reacción con el biocatalizador de *B. pumilus* GMA1 con un Rf de 1.45.

Las diferencias entre ambas cromatoplasmas se deben a la relación de los solventes utilizados en la fase móvil durante la elución, la distancia final recorrida por ésta y el revelador. Tanto el biocatalizador como la enzima libre presentan la capacidad de desacetilar el compuesto, lo que es importante puesto que no hay muchas enzimas reportadas que realicen esta reacción.

9. Conclusiones

- Bajo las condiciones de fermentación establecidas (Ibáñez, 2007) se obtuvieron dos enzimas con puntos isoeléctricos diferentes de 5.38 y 9.30 respectivamente. Tanto la fracción A como la fracción B en geles SDS-PAGE en condiciones semidesnaturalizantes (no DTT, no calor) migran a una región entre 140 – 160 kDa debido a la alta hidrofobicidad siendo mayor a medida que se incrementa el factor de purificación.
- No es posible la renaturalización de las enzimas en geles SDS-PAGE una vez que éstas han sido sometidas a un agente desnaturalizante como DTT o beta-mercaptoetanol y calor, sin embargo con los detergentes 3-(decyldimetyl ammonio) propano-1-sulfonato y heptyl- β -D-glucopyranosido se encontró actividad enzimática en la región correspondiente a 25 kDa.
- Mediante los pasos de purificación realizados, por filtración en gel e intercambio iónico, la actividad de la enzima con punto isoeléctrico de 5.38 se incrementó 10.25 veces con respecto a la actividad específica en el extracto crudo, con un factor de purificación de 9.78 y un rendimiento del 0.14% y la actividad de la enzima con punto isoeléctrico de 9.03 aumentó 13.12 veces con respecto a la actividad específica en el extracto crudo, con un factor de purificación de 12.73 y un rendimiento de 0.11%.
- Ambas enzimas presentaron preferencia de hidrólisis del p-nitrofenil laurato a pH de 7.2 y 30°C, sin embargo la enzima con punto isoeléctrico de 5.38 mantuvo la actividad a 45°C; sin embargo la enzima con punto isoeléctrico de 9.03 presentó una disminución de actividad a 45°C.

- Se desarrolló un biocatalizador con un 99% de adsorción de proteína el cual fue capaz de llevar a cabo las reacciones de transesterificación de tricaprilina con CLA y desacetilación de ácido ferúlico.

10. Perspectivas

- Optimizar el medio de cultivo para la sobreexpresión de ambas enzimas.
- Secuenciar las enzimas e identificarlas en el genoma de *B. pumilus*.
- Desarrollar biotacalizadores con ambas enzimas de manera independiente y comparar los biocatalizadores con uno comercial y optimizar condiciones de reacción.

11. REFERENCIAS

1. Abhinav, N., Atkins, M., (2008). A Quantitative Index of Substrate Promiscuity. *Biochemistry J.* 47, 157-166.
2. Arpigny, J., Jaeger J., (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemistry J.* 343: 177-183.
3. Arroyo, M., (2001). Tecnología Enzimática. Editorial Complutense de Madrid, Pp. 321-346.
4. Berkeley, N., et al. (1984). Identification of *Bacillus* species. *Meth. Microbiology.* 16:291-328.
5. Bustos, I., (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Química, UNAM.
6. Casimir, C., Akoh., (2002). Structured Lipids Ed. Marcel Dekker, 2ª edit., New York. 908-966.
7. Casimir, C., Akoh., et al. (2004). GDSE family of serine esterases/lipases. Review. *Progress in Lipid Research* 43: 534-552.
8. Casimir C. Akoh. (2006). Handbook of Functional Lipids. Taylor and Francis Group.
9. Cernia, E., et al. (2002). Investigation of lipase-catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use of NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction. *Bioorganic Chemistry* 30: 276-284.
10. Chaplin, M., (1992). Enzyme Technology. Edit. Cambridge. 40-46.

11. Dalla, C., et al., (2008). Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *The Journal of Supercritical Fluids* 47: 49-53.
12. Darbre, A., (1986). Practical Protein Chemistry. A Handbook. Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, EU.
13. Degrassi, G., Okeke, et. al, (1998). Purification and Characterization of an Acetyl Xylan Esterase from *Bacillus pumilus*, *American Society for Microbiology* Vol. 64, No. 2 p. 789–792.
14. Desnuelle, P., (1975). The lipases. Enzymes VII. Boyer. *Academic Press*. 575-617.
15. Derewenda, Z., Sharp, A., (1993). News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochemistry. Sci.* 18:20-25.
16. Dutta, K., et al. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry* 44: 127-134.
17. Ferrer, M., et al. (2007). Mining enzymes from extreme environments. Review. *Ecology and Industrial Microbiology*. 10:207-214.
18. Foresti, M., Ferreira, M., (2005). Frequent analytical /experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them. *Anal Bioanal Chem* 381: 1408–1425.
19. Foresti, M., Ferreira, M., (2007). Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications . [*Enzyme and Microbial Technology* 40: 769-777.](#)

20. Fragopoulou, E., et al (2007). Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:80-89.
21. Gerhardt, P., et al. (1994). Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology. Pp 362.
22. Harwood, C., (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular, biological and industrial workhorses. *TIBTECH* 10:247-256.
23. He J., et al. (2006). Effect of surface hydrophobicity/hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase. *Journal of Colloid and Interface Science* 298: 780-786.
24. Helmut, U., (1998). Industrial enzymes and their applications. *John Wiley and Sons, INC*. 56-58.
25. Hou, C., (1993). Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethylhexil butyrate. *Journal of Microbiology*. 11:73-81.
26. Ibáñez, A, (2007). Optimización de un medio de cultivo para la obtención de lipasa de *Bacillus pumillus* GMA1. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química. UNAM.
27. Isobe, K., et al. (1988). Crystallization and characterization of lipase of *Penicillium cyclopium*. *Eur J. Biochemistry* (1-2):233-7.
28. Jaeger, K. E., et al. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, threedimensional structures and biotechnological applications of lipases. *AR Microbiology*. 53(1):315-351.

29. Jaeger, K. E., Reetz, M. T., (1999). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnology*. 16:396-403.
30. Jeong, S., et al. (2002). Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 17041-17047.
31. Karpushova, A., et. al. (2005). Cloning recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus sp.* Associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Microbial. Biochemol* 67:59-69.
32. Keane, M., Mutus B. (2008). Editorial in Focus: Catalysis. *Journal of Chemical Technology* 83: 1445-1446.
33. Kim, H., et al. (2000). Transesterification of conjugated linoleic acid and tricaprylin by lipases in organic solvents. *Food Research International* 34: 301-306.
34. Kim, H., et al. (2002). Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochi, Biophys. Acta*. 1583:205-212.
35. Lambusta, D., et. al. (2003). Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. 22 (5):271-277.
36. Lee, G., et al. (2006). Enzymatic synthesis of cinnamic acid derivatives. *Biotechnology Letters* 28: 581-585.

37. Liese, A., et. al. (2000). Industrial biotransformations Weinheim: *Wiley-VCH*.
38. Manco, G., et. al. (1998). Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily. *Biochem.* 332, 203-212.
39. Mathewson, P., (1998). Enzymes. Practical guides for the food industry, *Eagan Press Handbook Series* p. 1-105.
40. Minemoto, et al., (2003). Oxidation kinetics for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers of CLA. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 80: 675-678
41. Moller, B., et. al. (1991). Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and bacilli wich produce these lipases. *Patente internacional* WO 91/16422.
42. Montes, Ma. Del C, Magaña, I., (2002). Enzimas con aplicación industrial XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, Avance y Perspectiva 21: 279 -82.
43. Montero, S., et al. (1993). Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 15
44. Mora, R., (2008). Propiedades catalíticas y termoestabiidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1. *Tesis de Maestría*. UNAM
45. Nawani. N., Kaur J., (2000). Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* J33, *Mol. Cell Biochem.* 206:91-96.

46. Nthangeni, M.,m et. al. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on Bacillus lipases *Enzyme and Microbial Technology* 28 705–712
47. Ogino, H., et. al. (2007). Cloning and expression of gene, and activation of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Exthemophiles*. 11(6):809-17.
48. Panda T, Gowrishankar B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 160–169.
49. Panda T, Gowrishankar B. S. (2008). Critical analysis of application of generalized distance function for optimization of important variables for esterase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*. 99(13):5545-55.
50. Ruiz, K., (2007). Uso de la Lipasa de *Bacillus pumillus* GMA1 en biocatálisis. *Tesis de Licenciatura*. UNAM
51. [Salameh, M.](#), [Wiegel, J.](#), (2007). Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. [Adv Appl Microbiol.](#);61:253-83.
52. Sheat, N., et al. (1998). Silver-ion high performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 33: 217-221.
53. Schmidt-Dannert C., (2000). Recombinant microbial lipases for biotechnological Applications. *Bioorganic and medicinal chemistry* 7:2123-2130.
54. Shi J, Mazza G, Le Maguer M. (2002). Functional Foods. Biochemical and processing Aspects. Vol. 2

55. Smith, P.K., et al., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
56. Soberón-Chávez, G., Palmeros, B., (1994). Pseudomonas lipases: Molecular genetics and potential applications. *Crit. Rev. Microbiol.* 20 (2), 95-105.
57. Sun, S., et al. (2007). Solvent-free synthesis of glyceryl ferulate using a commercial microbial lipase. *Biotechnolgy Letters* 29: 945-949.
58. Sunil, K., et. al. (2005). Biocatalytic routes toward pharmaceutically important precursors and novel polymeric systems. *Pure Appl. Chem* 77: (1): 209–226.
59. Virinder, S., et. al. (1998). Lipase-catalysed selective deacetylation of phenolic/enolic acetoxy groups in peracetylated benzyl phenyl ketones *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6:109-118.
60. Virupakashi, S., et al. (2005). Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, Volume 40, Pp. 431-435.
61. Vorderwulbecke, T., et. al. (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Microb. Technol.* 14:631-639.
62. Weete J. (2002). Microbial Lipases. Ed. Marcel Dekker. 2ª edición. New York. Pp. 813-838.
63. Wong, P. (2001). Lipasa termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción fermentative y algunas propiedades. *Tesis de Licenciatura*. UNAM

Purificación y caracterización de carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1 y su aplicación en biocatálisis.

64. Yoshida, Y., et al. (2006). Continuous synthesis of alkyl ferulate by immobilized *Candida antartica* lipase at high temperature. *Biotechnology Letters* 28: 1471-1474.

65. Zuñiga, V., (2004). Inmovilización de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1. *Tesis de Licenciatura*. UNAM

12. ANEXOS

Anexo I

Determinación de proteína soluble por el método de ácido bicinconínico (BCA)

La determinación de proteína es una de las operaciones más comunes realizadas en la investigación bioquímica. El principio del ensayo del ácido bicinconínico (BCA) se basa en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína en condiciones alcalinas, seguido por la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} . La reducción es proporcional a la cantidad de proteína presente. Se ha demostrado que la cisteína, cistina, triptófano, tirosina, son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^{1+} . El BCA forma un complejo de color azul-púrpura con Cu^{1+} en entornos alcalinos, proporcionando así una base para monitorear la reducción de Cu^{2+} por proteínas en una absorbancia máxima en 562 nm. El ensayo con BCA es más sensible que los procedimientos Biuret o Lowry. Además, tiene menos variabilidad que el ensayo de Bradford (Smith, 1985).

Determinación de actividad enzimática

Existen distintos sustratos que se emplean para determinar actividad lipolítica, según condiciones de reacción como pH, temperatura, posición de sustrato, etcétera. La actividad lipolítica de una enzima determinada por un solo método no es representativa de la actividad real, ya que los sustratos que se usan para el ensayo de actividad pueden reaccionar de manera distinta y dependen del proceso que se esté cuantificando, el cuál no es el mismo para la hidrólisis como para la síntesis de ésteres (Vorderwülbecke et al, 1992).

Los ensayos para determinar actividad lipolítica se agrupan en 5 categorías:

- Hidrólisis de sustrato en medio sólido (crecimiento en placa):

Emplea sustratos como tributirina y trioleína, que se emulsifican mecánicamente con medios de cultivo. La actividad se indica por la formación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias que se desarrollan en dichos medios.

- Espectrofotometría:

En sobrenadante de extractos microbianos, se determina mediante la hidrólisis de *p*-nitrofenilesteres de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y se mide espectrofotométricamente la formación de *p*-nitrofenol a 410nm. Los métodos espectrofotométricos se consideran como los métodos más rápidos, sensibles y sencillos para la determinación de actividad.

- Fluorescencia:

A los medios de cultivo sólidos emulsionados con sustrato, se les adiciona rodamina B y mediante irradiación con luz U.V. se revela la actividad lipolítica como una fluorescencia que va del color naranja al rojo.

- Titulación de ácidos grasos libres (A.G.L)

Indicado para determinar la actividad de una lipasa verdadera, se basa en titular los ácidos grasos liberados por la acción enzimática sobre una emulsión aceite-agua, con sustratos como aceite de olivo y tributirina.

- Presión superficial:

Una capa de lípido es esparcida en una interfase agua-aceite. La lipasa cataliza la hidrólisis de la monocapa lipídica provocando cambios en la presión superficial, la cual puede reajustarse automáticamente por un barostato controlado por la computadora.

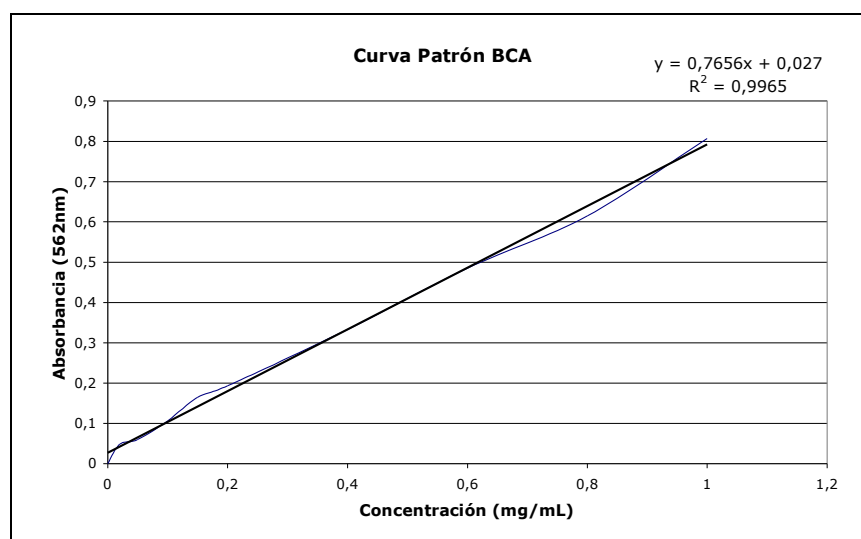
Anexo II

Cuantificación de proteína soluble mediante el método de BCA

Se realizó la determinación de proteína soluble para el extracto crudo proveniente de la fermentación, así como para las etapas siguientes por triplicado de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma-Aldrich).

Imagen x. Curva Patrón BCA

Concentración (mgP/mL)	Absorbancia 562 (nm)
0	0
0.02	0.048
0.05	0.06
0.1	0.106
0.15	0.165
0.2	0.193
0.4	0.333
0.6	0.485
0.8	0.615
1	0.807



Método de determinación cualitativa de actividad enzimática

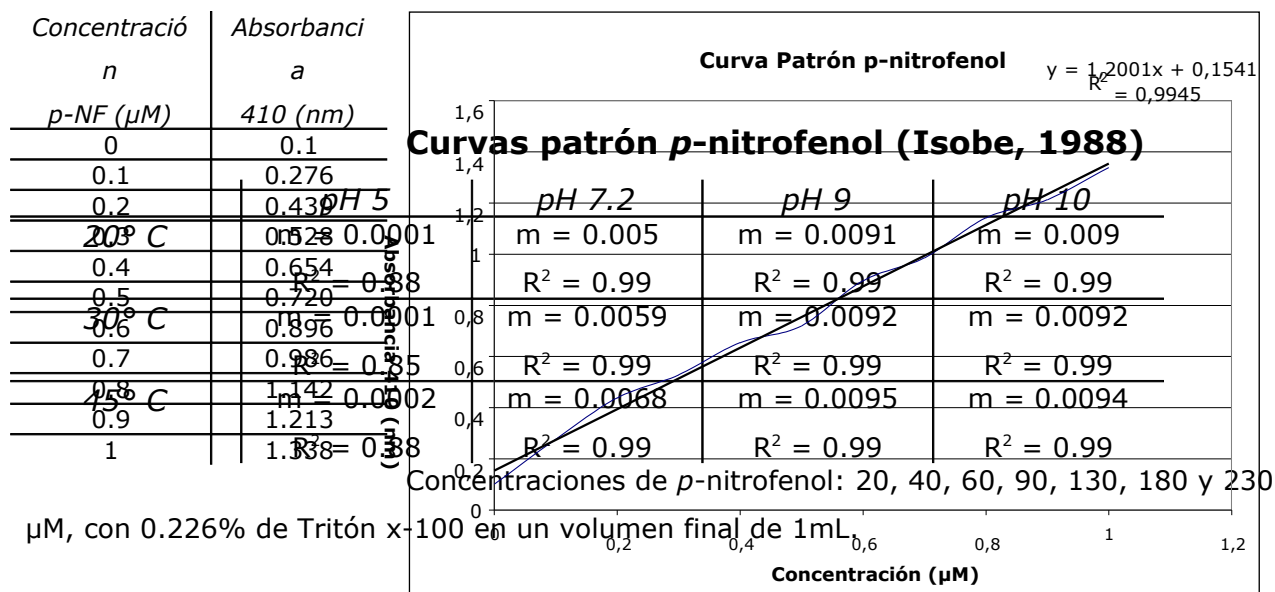
Se colocaron 75 μ L de cada extracto enzimático proveniente de la fermentación en pozos de microplaca y se agregaron 75 μ L una solución de α -naftilacetato, y se incubó a 37 $^{\circ}$ C por 20 minutos, transcurrido el tiempo se agregaron 75 μ L de una solución de Fast Red, la cuál reveló la hidrólisis enzimática del α -naftilacetato, mediante la aparición de un color marrón oscuro por la liberación de α -naftol. Es importante colocar un blanco de reacción en el cual se sustituye el extracto enzimático por el mismo volumen de agua (Karpushova, 2005).

Método de determinación cuantitativa de actividad enzimática

Se preparó un stock 2 μM de sustrato, para lo cual se pesaron 1.8 mg de *p*-nitrofenil acetato y se agregó 1 mL de acetona. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en una celda de 1 mL con 880 μL de buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, 100 μL de stock 20 μM (la concentración final de sustrato en reacción es de 2 μM) y 20 μL de enzima.

Se determinó el grado de hidrólisis del *p*-nitrofenil éster mediante la liberación del *p*-nitrofenol, compuesto colorido que absorbe a una longitud de onda de 410 nm, durante 7 minutos en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D. Las determinaciones se hicieron por triplicado y el tratamiento de datos se hizo con una curva patrón de *p*-nitrofenol (Nawani, 2000).

Imagen x. Curva patrón de *p*-nitrofenol (Nawani, 2000)



Anexo III

Técnicas de purificación

- Liofilización de proteínas

La liofilización es un método para preservar materiales lábiles en una forma deshidratada. Puede ser utilizada para biomoléculas de alto valor, como proteínas. El proceso involucra la remoción del agua de una solución congelada de proteínas por la sublimación en vacío con un ligero calentado (secado primario). Este proceso es seguido por el calentamiento controlado a temperaturas más elevadas para la remoción del agua "unida" de la solución de proteínas (secado secundario). Los niveles de humedad residuales son menores al 1%. Si la liofilización se lleva a cabo correctamente, la proteína mantendrá su actividad biológica inicial en el estado seco. Este estado seco ofrece más ventajas para almacenar a largo plazo de la proteína en cuestión.

- Concentración por ultrafiltración

La ultrafiltración en membrana (UF) es un proceso que utiliza membranas semipermeables para separar especies en soluciones acuosas por peso molecular, forma y/o carga. Separa solventes de solutos y el resultado de remover el solvente del soluto es el enriquecimiento o concentración del soluto. UF es un proceso de baja presión, generalmente más sutil para los solutos que los procesos que no utilizan membrana; es más eficiente que dichos procesos y pueden simultáneamente concentrar y desalar soluciones. No requiere de un cambio de fase, lo cual normalmente desnaturaliza especies lábiles y además puede ser realizado a temperaturas frías. UF puede ser una excelente herramienta para separaciones eficientes de sustancias biológicas en grupos de acuerdo a su peso molecular y tamaño.

- Columnas de Cromatografía

Las técnicas de FPLC proveen un amplio rango de modos de cromatografía, como intercambio aniónico, cromatografía de afinidad, filtración en gel, interacción hidrofóbica y fase reversa. Estas columnas pueden soportar cargas de

proteínas mucho más altas que las columnas convencionales de HPLC. Aunque han aparecido más de 1000 reportes del uso de FPLC en la literatura desde su introducción, dos de las más populares son las de intercambio iónico y filtración en gel.

Filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel separa moléculas principalmente de acuerdo a sus diferencias en peso molecular. El medio de separación o matriz contiene poros de dimensiones controladas. Conforme la elución procede, las moléculas que son demasiado grandes para entrar en los poros de la matriz pasan rápidamente a través del lecho en el espacio que rodea las partículas de gel y son eluidas en una zona al principio del perfil de elución. Las moléculas más pequeñas se mueven más lento a lo largo de la columna por que penetran las partículas de gel, por lo tanto las moléculas son eluidas de manera decreciente de acuerdo a su peso molecular. El peso molecular de la proteína de interés se determina comparando una elución con los valores obtenidos para varias proteínas de peso molecular conocido (Darbre, 1986).

Intercambio Iónico

Las subunidades pueden ser separadas de acuerdo a su carga neta por cromatografía de intercambio iónico, electroforesis o isoelectroenfoque y cromatoenfoque.

En la cromatografía de intercambio iónico, la muestra se aplica a una columna con un soporte inerte cargado ya sea de manera positiva (intercambio aniónico) o de manera negativa (intercambio catiónico). Si el soporte está cargado de manera positiva, aquellos componentes de la muestra que están cargados positivamente, es decir, que el pH de la solución está por debajo del punto isoeléctrico de la proteína de interés, pasará a través de la columna, mientras que los componentes cargados de manera negativa de la muestra serán atraídos a las cargas positivas ya fijas en la columna. Los componentes débilmente unidos pueden ser eluidos con un flujo continuo de un buffer, pero para componentes fuertemente unidos, será necesario aplicar un gradiente de

sal de una fuerza iónica que incremente, o cambiar el pH. Los componentes con la carga neta más baja serán liberados, seguidos por aquellos componentes con carga neta más alta.

Isoelectroenfoque

En un isoelectroenfoque, una solución que contiene una mezcla de anfólitos se somete a un campo eléctrico, las diferentes especies se mueven hasta que su carga neta es cero, los más ácidos (bajo punto isoeléctrico) migran hacia el ánodo. Como una consecuencia un gradiente de pH se forma entre los electrodos. Cuando una proteína es aplicada a un gradiente de pH formado por anfólitos, la proteína migra por electroforesis a la posición en el gradiente de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. El isoelectroenfoque es el método más sensible para detectar la carga heterogénea de una proteína y si se observan múltiples bandas es debido a diferentes componentes proteicos (Darbre, 1986).

Anexo IV

Proteínas secuenciadas en la región de 25 y 21 kDa:

>gi|157692997|ref|YP_001487459.1| manganese (Mn) superoxide dismutase SodA [*Bacillus pumilus* SAFR-032]:

MAFKLPELPYAYDALEPHIDKETMTIHHTKHHNTYVTNLNKAIEGVSALEDQSIEELVANL
NSVPENIRTAVRNNGGGHANHSLFWTLLSPNGGGAPTGELADAIEKELGGFEKFKSDF
AAAAGRFGSGWAWLVVNNKLEITSTPNQDSPLTEGKTPILGLDVWEHAYYLNQNR
PDYISAFWNVNWDEVARLYSEAK

>gi|157691608|ref|YP_001486070.1| peroxiredoxin YgaF [*Bacillus pumilus* SAFR-032]:

MTIEVGQQVPEIELTGDNGEKVKLSDFKKGKHIVLYFYPKDMTPGCTTEACDFRDRHQSF
AELDAVIIGVSPDSQDKHQKFKEKHDLPFLLLVDDEQKLSEAFGVWKLKKNFGKEYMGI
ERSTFLINKEGTLVKEWRKVKVKDHVEEAELELKAHA

13. ÍNDICE DE TABLAS

Número		Página
1.	Tipos de enzimas y su aplicación en la industria de alimentos.....	11
2.	Ventajas y desventajas del uso de enzimas inmovilizadas.....	15
3.	Comparación de los diferentes métodos de inmovilización.....	15
4.	Áreas de aplicación industrial de las carboxilesterasas.....	21
5.	Síntesis de SL's. Métodos químicos vs. enzimáticos...	21
6.	Importancia del CLA.....	23
7.	Compuestos con actividad antioxidante.....	24
8.	Lipasas y esterasas del género <i>Bacillus</i>	28
9.	Registro de carboxilesterasas en el genoma de <i>B. pumilus</i>	28
10.	Caracterización bioquímica de <i>B. pumilus</i> GMA1.....	33
11.	Propiedades bioquímicas de lipasas de <i>Bacillus</i> de la subfamilia I.4.....	34
12.	Medio Optimizado para la producción de la lipasa de <i>B. pumilus</i> GMA1.....	35
13.	Detergentes evaluados.....	47
14.	Actividad enzimática específica para el extracto crudo.....	56
15.	Actividad enzimática específica. Sephacryl S-300®...	62
16.	Monitoreo de actividad enzimática.....	69

14. ÍNDICE DE FIGURAS

Número		Página
1.	Estructura de las α/β hidrolasas.....	17
2.	Estructura del ácido ferúlico.....	25
3.	Diseño experimental.....	41
4.	Producción enzimática.....	43
5.	Crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en medio BHI a las 24 horas de fermentación.....	55
6.	Tinción de Gram de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (100x)...	55
7.	<i>B. pumilus</i> GMA1 en medio sólido.....	56
8.	Perfil de proteínas del extracto crudo (SDS-PAGE).....	57
9.	Perfil de proteínas del extracto crudo (SDS-PAGE)...	58
10-12.	Ensayo de renaturalización con detergentes (SDS- PAGE).....	59
13.	Cromatograma de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel. (Sephacryl S-300®)...	60
14.	Determinación de actividad enzimática cualitativa de las fracciones recolectadas después de la filtración en gel.....	61
15.	Perfil de proteínas del concentrado de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®. SDS-PAGE).....	63
16.	Perfil de proteínas del concentrado de las fracciones salientes de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®. SDS-PAGE).....	64
17.	IEF del concentrado proveniente de la columna de filtración en gel (Sephacryl S-300®).....	65
18.	Cromatograma de las fracciones salientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®).....	66
19.	Determinación de actividad enzimática cualitativa para la primera corrida eluida de la columna de intercambio aniónico.....	67
20.	Perfil de proteínas de las fracciones A y B concentradas provenientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®. SDS-PAGE).....	70
21.	Perfil de proteínas y actividad enzimática de las fracciones A y B concentradas provenientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®. SDS-	71

	PAGE).....	
22.	IEF. Fracciones A y B concentradas provenientes de la columna de intercambio aniónico (Mono Q®).....	72
23.	Efecto del largo de cadena en la actividad enzimática.....	74
24.	% Actividad Relativa de acuerdo al efecto de la longitud de cadena en la hidrólisis.....	75
25.	Efecto de la temperatura en la actividad enzimática...	76
26.	Efecto del pH en la actividad enzimática.....	77
27.	CCF. Transesterificación con el biocatalizador.....	78
28.	CCF. Transesterificación con enzima libre.....	78
29.	CCF. Desacetilación con el biocatalizador.....	79
30.	CCF. Desacetilación con enzima libre.....	79