



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN

CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TESIS

**AISLAMIENTO, OBTENCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA LIPASA DE
Ustilago maydis (HUITLACOCHÉ)**

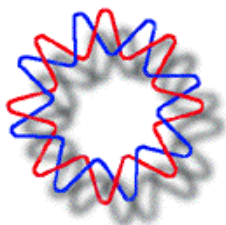
Que para obtener el título de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

IBQ Edith Ponce Recinos

Tutor: Dra. Clarita Olvera Carranza



Cuernavaca, Mor.

Abril 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

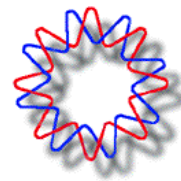
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de biocatálisis y tecnología enzimática del **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis** del **Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México**. Bajo la Dirección de la **Dra. Clarita Olvera Carranza** en el laboratorio del **Dr. Agustín López-Munguía Canales**.



El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca No. 207163, Y por la UNAM con el proyecto PAPIIT No. IN221608-3.

También agradecemos al apoyo del fomento a la graduación por el apoyo en la última etapa del desarrollo de este trabajo.

Con mucho cariño a mis padres, a mi hermano y en general a toda mi familia, a quienes dedico todos mis logros

AGRADEZCO

Al Dr. Agustín López-Munguía por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su valiosa asesoría, confianza y amistad.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por su constante asesoría, sin la cual este proyecto no se habría podido llevar a cabo, por su apoyo y por estar siempre presente en los momentos buenos y malos tanto académicamente como de manera personal.

A los miembros del comité tutorial por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar tanto al proyecto como a mi formación:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Dr. Alfredo Martínez Jiménez

A los miembros del jurado por su contribución crítica para afinar el proyecto en su última etapa:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo,
Dr. Gerardo Corzo Burguete,
Dr. Hermilo Leal Lara y
Dra. Marcela Ayala Aceves

A la M.C. María Elena Rodríguez por su excelente asesoría.

Al T.L Fernando González por su extraordinario apoyo técnico durante la realización de este proyecto y en particular por su maravillosa amistad.

A la T.L. Aurelia Ocampo por el apoyo técnico ofrecido en la realización de este proyecto.

Al personal de secuenciación y área de cómputo por el eficiente servicio brindado.

A mis padres, por todo su apoyo incondicional, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por siempre confiar en mis decisiones, los amo.



A mi hermano Andrés, por ser siempre el mejor ejemplo para mí.



A las compañeras y compañeros del laboratorio con quienes compartí muchas experiencias, gracias por su amistad y valiosos comentarios, en especial a Sara, Ana y Pau.



A mis amigos de toda la vida, sobretodo a Itzma, por ser mi compañera de riesgos, la de la victoria.

INDICE

RESUMEN

1.- INTRODUCCIÓN

2.- ANTECEDENTES

2.1 LIPASAS (CARACTERÍSTICAS GENERALES)

2.1.1 Estructura y mecanismo de acción

2.1.2 Aplicaciones industriales de las lipasas

2.2 LIPASA B DE *Candida antarctica* (CalB)

2.2.1 Aplicaciones específicas de CalB

2.3 *Ustilago maydis*

2.3.1 Lipasas en *Ustilago maydis*

3.- HIPÓTESIS

4.- OBJETIVO GENERAL

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR MEDIO DE PARANITRO FENILPALMITATO (pNPP)

5.2.1 Inducción y caracterización de la actividad lipasa en *Ustilago maydis* 521

5.3. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA PARA LA LIPASA LipE

5.3.1 Extracción de RNA de *Ustilago maydis*

5.3.2 Diseño de oligonucleótidos específicos

5.3.3 Reacción de la Reverso Transcriptasa (RT)

5.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del cDNA de *Ustilago maydis*

5.3.5 Extracción y PCR de DNA cromosomal

5.4.- CLONACIÓN DEL cDNA de LIPE

5.4.1 Vectores de expresión

5.4.2 Transformación en *E. coli*

5.4.2.1 Transformación de *E. coli* Origami DE3 con la chaperona GroEL

5.4.3 Extracción de plásmido por columna

5.4.4 Verificación de clonas positivas y análisis de orientación del gen insertado

5.4.4.1 Empleo de oligonucleótidos específicos

5.4.4.2 Empleo de enzimas de restricción

5.4.4.3 Secuenciación del inserto

5.5.- EXPRESION HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA EN *E. coli*

5.5.1 Perfil de expresión de la proteína LipE utilizando la construcción pBadLipE

5.5.2 Expresión de las proteínas LipE y CalB con las construcciones pColdI LipE y pColdIII CalB

5.5.2.1 Expresión de las proteínas LipE y CalB con la chaperona GroEL

5.5.3 Identificación y cuantificación de las proteínas recombinantes LipE

5.5.3.1 Electroforesis de proteínas

5.5.3.2 Técnica de Western Blot

5.5.3.3 Cuantificación de proteína

5.6.- PURIFICACIÓN, SOLUBILIZACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

5.6.1 Replegamiento de los cuerpos de inclusión por medio del kit Pro-Matrix™ Protein Refolding Guide

5.6.2 Replegamiento de los cuerpos de inclusión por medio de diluciones sucesivas con cloruro de guanidina

5.6.3 Replegamiento de los cuerpos de inclusión en presencia de ditiotetriol y a pH ácido (pH 4)

5.7.-CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES

5.7.1 Perfil de temperatura y Ph

5.7.2 Termoestabilidad

5.7.3 Determinación de la energía de activación y desactivación

5.7.4 Efecto de la concentración de sustrato

5.7.5 Hidrólisis de la capsaicina

6.- RESULTADOS

6.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN IN SILICO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA lipE

6.1.2 Análisis de estructura secundaria

6.1.3 Modelamientos por homología

- 6.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPASA EN *Ustilago maydis*
- 6.3.- AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA PARA LA LIPASA LipE
 - 6.3.1 Extracción de RNA de *Ustilago maydis*
 - 6.3.2 Reacciones de transcriptasa reversa (RT) y PCR
- 6.4.- CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LipE EN *E. COLI* CON EL VECTOR TOPO pBAD/Thio
- 6.5.- PURIFICACIÓN, SOLUBILIZACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN
- 6.6.- EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES LipE Y CaIB EN *E. COLI* CON EL PLÁSMIDO pCold
- 6.7.- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES LipE Y CaIB
 - 6.7.1 Perfil de temperatura
 - 6.7.2 Perfil de pH
 - 6.7.3 Termoestabilidad
 - 6.7.4 Determinación de la energía de activación y desactivación de las proteínas heterólogas
 - 6.7.5 Caracterización enzimática
 - 6.7.6 Hidrólisis de la Capsaicina

7.- CONCLUSIONES

8.- PERSPECTIVAS

9. – BIBLIOGRAFÍA

1.- INTRODUCCIÓN

Las lipasas (E.C.3.1.1.3), también conocidas como acil-glicerolasas o acil hidrolasas, son enzimas que comúnmente catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos a ácidos grasos libres, monoacil glicéridos, diacil glicéridos y glicerol (Patel *et al*; 1998). Estas enzimas son biocatalizadores valiosos por su versatilidad ya que son altamente estables en solventes orgánicos, muestran una amplia especificidad de sustratos, son capaces de catalizar reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación y usualmente muestran una alta regio, quimio y/o estereoselectividad (Snellman *et al*; 2002, Bertinotti *et al*; 1994).

Las lipasas son utilizadas en diferentes industrias: alimenticia, de detergentes, cosmética, farmacéutica, papelera entre otros (Hasan *et al*; 2006) siendo la lipasa B de *Candida antarctica* la enzima más utilizada a nivel industrial por su versatilidad. Se trata de una lipasa pequeña, de 317 aminoácidos con un peso aproximado de 33 kDa. Posee un plegamiento de barril α/β y cuenta con características únicas que le confieren su gran éxito como biocatalizador en la síntesis orgánica, tales como su alta regio y estereoselectividad hacia amidas y ésteres. A diferencia de otras lipasas, CalB no muestra activación interfacial (Ergan *et al*; 1991). Este fenómeno consiste en que la mayoría de las lipasas tienen una estructura terciaria denominada dominio de tapa que expone al sitio activo en presencia de una interfase agua-aceite. CalB cuenta con este dominio sin embargo, este se encuentra en forma abierta exponiendo al sitio activo en todo momento. Otra característica importante de CalB es su estabilidad a la mayoría de solventes orgánicos y a un intervalo amplio de temperatura y pH (Gotor-Fernández *et al*; 2006).

En el 2006 fue publicada la secuencia del genoma completo de *Ustilago maydis*, conocido comúnmente como "huitlacoche" o "cuitlacoche". Se trata de un hongo basidiomiceto causante de la enfermedad del carbón del maíz, la cual se manifiesta con la presencia de agallas o tumores que se forman en la mazorca de maíz, la cual ocasiona pérdidas económicas en muchos países. En México por el contrario, es de gran importancia como ingrediente en la gastronomía desde épocas prehispánicas (Banuett; 2002).

En la secuencia del genoma de este hongo, encontramos un marco de lectura abierto de aproximadamente 1000 pb que codifica para una lipasa hipotética "LipE" predicha como una aciltransferasa con una estructura de hidrolasa tipo α/β con un 70% de identidad (80% de similitud) con CalB. Realizando un análisis de hilvanamiento de esta proteína hipotética LipE sobre la estructura de CalB pudimos observar que tanto los residuos catalíticos como aquellos que le dan estabilidad a

los sustratos se encuentran presentes y aparentemente en la misma posición que los residuos involucrados en la catálisis de CalB. Estos análisis sugieren que LipE, tiene características similares a CalB y que podría ser una nueva lipasa con un espectro tan amplio como el de CalB.

Con anterioridad, el equipo de trabajo de tecnología enzimática del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) dirigida por el Doctor Agustín López-Munguía, ha centrado su atención en trabajar con lipasas encontrado que la lipasa CalB de *Candida antarctica*, además de catalizar la reacción tradicional de hidrólisis de lípidos, presenta características interesantes para la síntesis e hidrólisis de ésteres y amidas con una eficiencia mayor a otras lipasas analizadas (Reyes Duarte *et al*; 2002, Castillo *et al*; 2003 Torres-Gavilán *et al*; 2006, Castillo *et al*; 2007).

Es por lo anterior que surge el interés por aislar esta nueva lipasa LipE de *Ustilago maydis* para determinar sus propiedades y espectro de actividad, además de comparar su actividad con la lipasa B de *Candida antarctica* que es, por mucho, la lipasa más robusta y más utilizada a nivel industrial, pero cuya disponibilidad y aplicación se encuentra controlada por la empresa Novozymes. Para lograr este objetivo se requiere principalmente de aislar y expresar el gen LipE de *Ustilago maydis*.

CalB ha sido funcionalmente expresada en *Aspergillus oryzae* para propósitos industriales a gran escala y más recientemente se han probado otros sistemas de expresión como *E. coli* que ofrecen ventajas en cuanto a la facilidad de las condiciones, modificaciones y tiempos de expresión (Blank *et al*; 2006). Para este trabajo se propone aislar el gen que codifica para la lipasa hipotética LipE de *Ustilago maydis* y posteriormente expresarlo en el sistema de expresión de *E. coli* con el objetivo de caracterizarla y hacer un análisis comparativo entre LipE y CalB.

RESUMEN

Las lipasas son enzimas ampliamente utilizadas en procesos de síntesis orgánica por su estabilidad y versatilidad para llevar a cabo una amplia variedad de reacciones tanto en medios tradicionales como en solventes orgánicos. Estas reacciones van desde la esterificación, interesterificación y transesterificación entre otras. De estas enzimas, la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) es la más utilizada en procesos industriales. En nuestro grupo de trabajo previamente se ha reportado la habilidad de CalB de llevar a cabo reacciones de síntesis e hidrólisis de ésteres y amidas en particular la capsaicina y sus análogos, así como la resolución de mezclas racémicas.

En este trabajo se reporta por primera vez la identificación de una lipasa del hongo *Ustilago maydis* con características estructurales similares a las de CalB, siendo única debido a que presenta una similitud nunca antes reportada, su aislamiento y expresión heteróloga en el sistema de *E. coli*, así como su caracterización bioquímica en extracto enzimático.

Como primera parte del proyecto se realizaron análisis estructurales *in silico* por medio de estudios de la estructura primaria, secundaria y modelamiento por homología de la lipasa denominada "LipE" de *Ustilago maydis* utilizando como templatado a CalB, encontrando una identidad del 70% y una similitud del 80% con esta enzima, aunado a que los aminoácidos tanto de la tríada catalítica como los que le dan estabilidad a los intermediarios de reacción se encuentran conservados.

Como segunda etapa, se realizaron ensayos con mezclas de aceites en el medio de cultivo de *Ustilago maydis* para inducir la producción de estas enzimas, se obtuvo el mRNA el cual se utilizó de templatado para obtener el cDNA por medio de una reacción con la transcriptasa reversa y PCR con oligonucleótidos específicos. El cDNA fue clonado y expresado en el vector pColdI y en el sistema de expresión de *E. coli* origami DE3 a 15°C durante 24 h. En este sistema se obtuvo una enzima soluble y activa con 0.55 U/mL en el extracto enzimático, estos ensayos de actividad se hicieron utilizando paranitro fenil palmitato (pNPP) como sustrato de reacción.

Se caracterizó bioquímicamente a LipE encontrando que la enzima tiene un pH óptimo de 8, una temperatura óptima de 40°C y un tiempo de vida medio de aproximadamente 2 horas y media a 40°C, estos parámetros son similares a los observados para la enzima recombinante CalB.

Finalmente se analizó la capacidad de LipE para hidrolizar el enlace amida de la capsaicina, sin embargo, no se observó producto de reacción (vainillilamina) en cromatografía en capa fina (CCP). Análisis más detallados son necesarios para concluir si LipE tiene la capacidad de hidrolizar amidas.

En conclusión, se logró, aislar, expresar y caracterizar parcialmente la enzima LipE, cuyas características sugieren que puede ser potencial biocatalizador de interés para la síntesis orgánica.

2.- ANTECEDENTES

2.1 LIPASAS (CARACTERÍSTICAS GENERALES)

Las lipasas (triacil glicerol hidrolasas o carboxil esterases, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis o la síntesis de ésteres formados por glicerol y ácidos grasos de cadena larga (Figura 1). Las lipasas constituyen una clase especial de esterases que actúan específicamente sobre ésteres insolubles en agua en la interfase lípido-acuosa (Snellman *et al*; 2002).

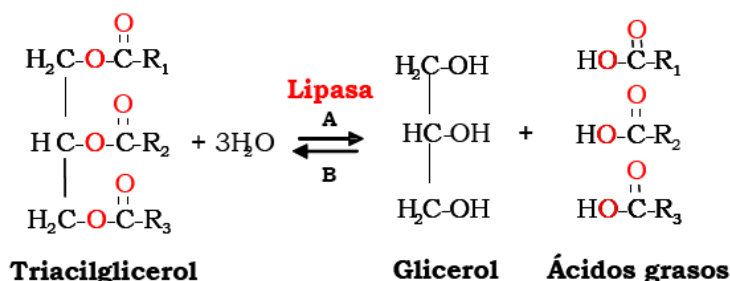


Figura 1. Hidrólisis y síntesis de triacilglicéridos mediada por lipasas

Estas reacciones normalmente se producen con elevada regio- y/o enantioselectividad, convirtiendo a las lipasas en un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica. Las razones para su enorme potencial biotecnológico residen en sus principales características:

- Son estables en presencia de disolventes orgánicos
- No requieren cofactores
- Poseen una amplia especificidad de sustratos: catalizan tanto la acilación como la deacilación de grasas y, además, actúan sobre otros sustratos naturales
- Son altamente enantio y regioselectivas.

Aunado a esto, las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas en microorganismos, plantas y animales, siendo las lipasas microbianas las más importantes desde el punto de vista de su aplicación industrial. Se les puede encontrar en bacterias, levaduras y hongos. A este respecto, existen una gran cantidad de secuencias de lipasas y serin hidrolasas descritas hasta el momento. La base de datos Lipase Engineering Database (<http://www.led.uni-stuttgart.de>) recoge un total de 1367 secuencias las cuales se agrupan en 16 superfamilias (Pleis *et al*; 2000), (Tabla 1).

Tabla 1. Superfamilias de lipasas más importantes.

Superfamilia	Proteínas	Secuencias	Estructuras
Lipasas de <i>Bacillus</i>	6	9	2
Lipasas de <i>Burkholderia</i>	41	68	15
Lipasas de <i>Candida antarctica</i>	2	8	2
Lipasas de hongos filamentosos	36	70	29
Lipasas gástricas	73	107	4
Lipasas lipoprotéicas	92	134	9
Lipasas de <i>Moraxella</i>	6	8	2
Lipasas de <i>Pseudomonas</i>	14	15	0
Lipasas de <i>Saccharomyces</i>	2	3	0
Carboxilesterasas	324	613	58
Esterasas de <i>Acinetobacter</i>	27	34	0
Lipasas de <i>Candida rugosa</i>	9	38	10
Lipasas sensibles a hormonas	68	80	5
Lipasas de <i>Yarrowia lipolytica</i>	2	2	0

Además de la hidrólisis, las lipasas catalizan un amplio rango de reacciones incluyendo: interesterificaciones, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis (Figura 2).

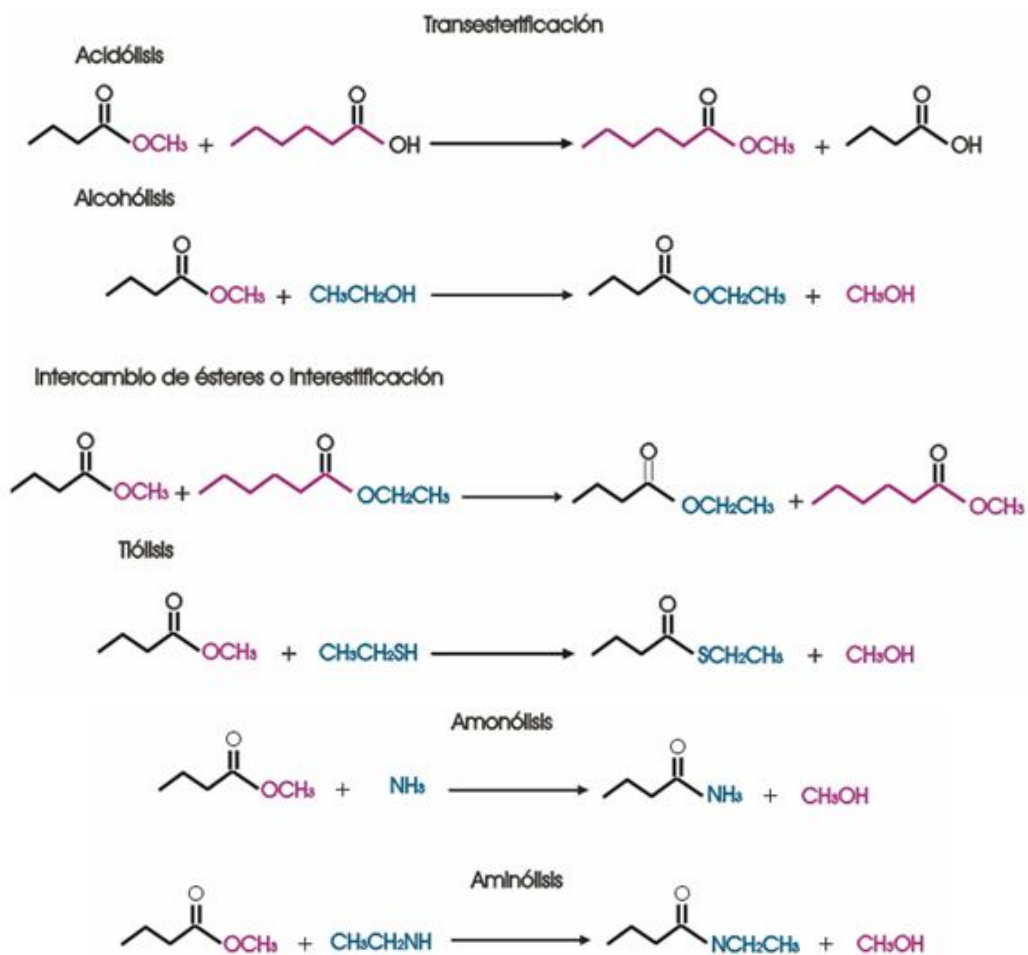


Figura 2. Ejemplos de reacciones catalizadas por lipasas.

2.1.1 Estructura y mecanismo de acción.

Las lipasas muestran un amplio rango de pesos moleculares, que van desde aproximadamente 19 kDa hasta 60 kDa (lipasa de *Candida rugosa*). La mayoría de ellas, a excepción de la lipasa pancreática, están formadas por un único dominio. La gran mayoría presenta un plegamiento de barril α/β que consiste en una lámina β central hidrofóbica constituida por diferentes cadenas β (β 1- β 8) conectadas por hasta 6 α hélices anfífilas (A-F) (Ollis *et al*; 1992).

La maquinaria catalítica está formada por una tríada aminoacídica, constituida por una serina, un ácido aspártico (o glutámico) y una histidina. El residuo nucleofílico serina está localizado en el extremo C- terminal de la cadena β -5 en un pentapéptido altamente conservado, formando una estructura característica llamada *codo nucleofílico*. La hidrólisis del sustrato comienza con un ataque nucleofílico por parte del oxígeno de la serina sobre el átomo de carbono carbonilo del enlace éster (Figura 3). Esto origina la formación de un intermediario tetraédrico estabilizado por el hidrógeno vinculado a los átomos de nitrógeno de los residuos de la cadena principal que pertenecen al llamado agujero oxianión. De esta forma se libera un alcohol, dejando detrás un complejo acil-lipasa, el cual es finalmente hidrolizado con la liberación del ácido graso y la regeneración de la enzima (Schmid y Verguer; 1998, Pleiss *et al*; 2000)

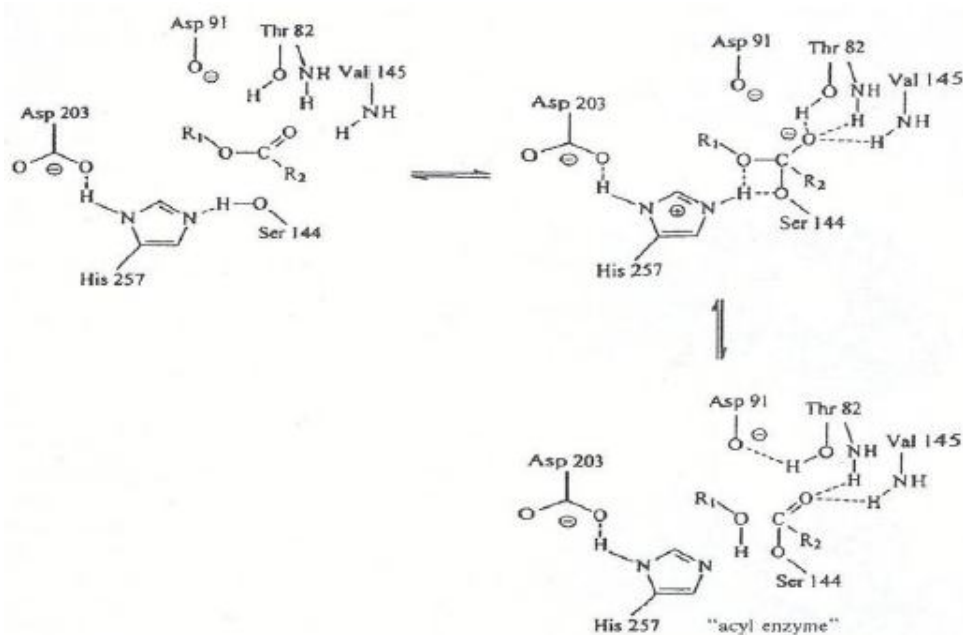


Figura 3. Mecanismo catalítico de las lipasas (la numeración de los aminoácidos en este ejemplo se refiere a la lipasa de *Rhizopus oryzae*).

Las reacciones lipolíticas tienen lugar en la interfase lípido-acuosa. Sarda y Desnuelle (1958) demostraron cuantitativamente que la lipasa pancreática exhibía una actividad casi nula cuando el sustrato, la triacetina (triglicérido constituido por ácidos grasos de cadena corta), estaba perfectamente solubilizado. Sin embargo, cuando se utilizaban concentraciones de triacetina por encima de su límite de solubilidad, se formaban partículas emulsionadas que, sorprendentemente, eran hidrolizadas por la lipasa de una forma más rápida.

Este fenómeno de catálisis de una reacción heterogénea es único de las lipasas e involucra una activación interfacial, es decir, un incremento en la actividad de la enzima cuando la solubilidad del sustrato se excede y aparece una interfase lípido-acuosa en la que se ubica la enzima para actuar.

A principios de los 90's se elucidaron las primeras estructuras tridimensionales de estas enzimas (Tabla 2). En estas estructuras se pudo apreciar un bucle o loop superficial que se denominó tapadera peptídica. Esta tapadera se describió como una estructura terciaria que se activa y sufre un cambio conformacional en presencia de una interfase agua-aceite dejando expuesto al sitio activo para la catálisis lo cual explicaría el fenómeno de la activación interfacial. Aunque la estructura terciaria de tapa es una característica de las lipasas, no necesariamente se presenta en todas las lipasas que se conocen y tampoco se correlaciona con dicha activación, ya que existen lipasas que no muestran la activación interfacial aunque presenten en su estructura la tapa peptídica (Gotor-Fernández *et al*; 2006).

Tabla 2. Ejemplos de estructuras cristalinas de Lipasas reportadas

Organismo del cual se extrajo	Peso (kDa)	Archivo en PDB
<i>Rhizomucor miehei</i>	29.5	3TGL
<i>Pancriatica humana</i>	~37	-
<i>Pseudomonas glumae</i>	33.1	1THA
<i>Humicola lanuginosa</i>	~30	-
<i>Rhizopus delmar</i>	~29	-
<i>Penicillium camemberti</i>	30	-
<i>Candida antarctica (B)</i>	~33	1TCA
<i>Geotrichum candidum</i>	60	1THG
<i>Candida rugosa (abierta)</i>	60	1CRL
<i>Candida rugosa (cerrada)</i>	60	1TRH

Fuente: Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York (EUA).

A pesar de su similitud estructural, y por ende también de mecanismo catalítico, las lipasas, como todas las enzimas, presentan una especificidad de sustrato diferente entre ellas. Este comportamiento se debe a las variaciones estructurales en la región próxima al sitio catalítico.

2.1.2 Aplicaciones industriales de las lipasas

Además de su importancia biológica, dada su capacidad para la digestión de lípidos, las lipasas tienen un gran mercado actual y potencial en diferentes industrias tales como la de detergentes, cosmética, textil, papelera, farmacéutica y han pasado a ser una parte integral de la actual industria alimentaria. En la tabla 3 se muestran algunas de las lipasas comerciales más utilizadas, en donde se evidencia la regioespecificidad estricta de algunas lipasas sobre las posiciones 1 y 3 de los lípidos.

Tabla 3. Ejemplos de algunas lipasas disponibles comercialmente.

Organismo	Regio-especificidad	Aplicación	Casa comercial
<i>Candida rugosa</i>	Inespecífica	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalyst, Boehringer mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma.
<i>Candida antarctica</i>	Sn-1-3	Síntesis orgánica	Boehringer mannheim, Novozymes.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Inespecífica	Aditivo de detergentes	Boehringer mannheim, Novozymes.
<i>Rhizomucor miehei</i>	Sn-1-3	Procesamiento de alimentos	Novozymes, Biocatalyst, Amano.
<i>Burkholderia cepacia</i>	inespecífica	Síntesis orgánica	Amano, fluka, Boehringer mannheim.
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Sn-1-3	Aditivo de detergentes	Genencor
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Sn-1-3	Síntesis orgánica	Genencor
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Sn-1-3	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalyst

En los últimos años, las lipasas, han cobrado importancia en la industria alimentaria, como consecuencia, se ha potenciado el uso de estas enzimas para mejorar procesos químicos tradicionales. Se utilizan en la producción de una gran variedad de productos como quesos y alimentos preparados, entre otros (Ashok, *et al*; 1999), siendo las lipasas de origen microbiano las más utilizadas, por ejemplo, para la producción de determinados sabores de quesos y otros alimentos debido a la producción de ácidos grasos volátiles. Dependiendo de la especificidad de las lipasas empleadas pueden liberarse ácidos grasos de cadena corta (C4-C6) que aportan un sabor fuerte y penetrante o bien pueden liberarse ácidos grasos de cadena larga (>C12), de aspecto más jabonoso, que son metabolizados por lo microorganismos presentes en el queso para producir otros compuestos aromáticos como β -cetoácidos (Schmid y Verger; 1998).

Aunado a esto, estas enzimas, son utilizadas para la interesterificación de grasas y aceites produciendo acilglicerolos modificados que no pueden obtenerse mediante química tradicional o para la obtención de lípidos estructurados. Así, por ejemplo, pueden alterar el punto de fusión de un aceite modificando la composición y/o estructura de sus triglicéridos mediante trans-esterificación, utilizando como co-sustratos determinados ácidos grasos u otros triglicéridos de diferente composición (Schmid y Verger; 1998).

Asimismo, la acción catalítica de las lipasas ha permitido el desarrollo de nuevos productos como los ésteres de carbohidrato y ácidos grasos (sucroésteres), con un mercado potencial interesante como surfactantes en alimentos, fármacos y cosméticos (Ashok *et al*; 1999), aunado a que existen varias lipasas que han logrado el estatus GRAS (Generally Recognised As Safe) de la FDA.

Las lipasas también tienen aplicación en la industria farmacéutica debido a su excelente capacidad para catalizar reacciones con elevada regioespecificidad, en una gran variedad de solventes orgánicos y con un amplio abanico de sustratos. Además presentan una elevada enantioselectividad lo que permite diferenciar entre isómeros *S* y *R* (Hasan *et al*; 2006).

Otras aplicaciones industriales de las lipasas incluyen el tratamiento de la pulpa en la industria papelera para exponenciar la blancura del papel; en la industria cosmética también tienen gran importancia ya que transforman aceites para su posterior utilización en productos del cuidado personal como cremas para la piel. Una de las aplicaciones industriales más importante en términos de valor del mercado, es su inclusión en la formulación de detergentes. En 1994 Novo Nordisk, ahora Nomozymes introdujo Lipolase, la primera lipasa recombinante comercial para su uso en detergentes (Ito *et al*; 1998).

Las lipasas también han tenido gran participación en la síntesis orgánica sobretodo en reacción de aminólisis enzimática, resolución de ésteres, síntesis de amidas y de aminoalcoholes ópticamente activos (Bajpai; 1999).

2.2 LIPASA B DE *Candida antarctica* (CaIB).

Candida antarctica es una levadura la cual presenta dos isoformas isoenzimáticas de lipasas: la lipasa A con un peso molecular aproximado de 45 kDa y un punto isoelectrico de 7.5 y la lipasa B, comúnmente conocida como CaIB, la cual es una lipasa pequeña, de 317 aminoácidos, con un peso aproximado de 33 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 6.0 (Patkar; 1993).

Su estructura posee un plegamiento típico de hidrolasa, la cual consta de un barril α/β , que contiene siete láminas β rodeadas por diez α -hélices, con una

dimensión de 30 X 40 X 50 Å (Figura 4) y cuenta con características únicas que le confieren su gran éxito como biocatalizador en la síntesis orgánica, tales como su alta regio y estereoselectividad hacia amidas y ésteres. A diferencia de otras lipasas, CalB no muestra activación interfacial. Otra característica importante es que CalB es estable en la mayoría de los solventes orgánicos y en un amplio intervalo de temperatura y pH (Gotor-Fernández *et al*; 2006).

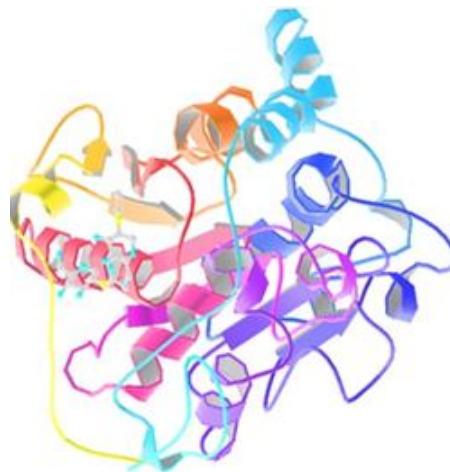


Figura 4. Estructura tridimensional de la lipasa B de *Candida antarctica*

La tríada catalítica está compuesta por serina 105, aspártico 187 e histidina 224, la serina se encuentra rodeada por la treonina 40, la glutamina 157 y el ácido aspártico 134. Estos residuos están expuestos al disolvente y pueden tener una función importante en la especificidad del sustrato.

El entorno del centro activo está formado por una cavidad de 12 Å desde la serina hasta la superficie de la proteína y un ancho de 10 X 4 Å. Esta cavidad está delimitada por tres regiones: la espiral comprendida entre los aminoácidos 242 y 268, la hélice α 10 (cerca del extremo C-terminal) y la hélice α 5. La entrada a la cavidad del centro activo se sitúa en el centro de una gran superficie plana de 450 Å, con forma triangular ligeramente cóncava. En esta superficie hay muchas cadenas alifáticas de aminoácidos que pueden reaccionar con la interfase durante la hidrólisis de lípidos, así como 3 residuos cargados (aspártico 223, glutámico 188 y lisina 290) cercanos a la entrada de la cavidad (Uppenberg *et al*; 1995).

Existen muchas lipasas comerciales disponibles en el mercado, sin embargo, CalB ha demostrado ser una enzima robusta; hasta la fecha, no se ha caracterizado otra enzima capaz de igualar su versatilidad, debido a esto diversos esfuerzos se han centrado en caracterizar enzimas tanto bacterianas como fúngicas para estudiar sus propiedades, sin embargo, sigue siendo la lipasa B de *Candida antarctica* la más utilizada en la síntesis orgánica. Algunas de sus características se resumen en la Tabla 4, en la cual también queda de manifiesto su versatilidad en

comparación con otras enzimas lipolíticas comerciales ampliamente utilizadas en diversas industrias.

Tabla 4. Características catalíticas de enzimas lipolíticas comerciales.

Lipasa	Casa comercial	origen	Rango T	Rango pH	Hidrólisis de capsaicina*
CalB_{Inmovilizada}	Novozymes	<i>C. antartica</i>	40-70°	6-10	Si
CalB_{Soluble}	Novozymes	<i>C. antartica</i>	40-70°	6-10	Si
Amano lipaza	Amano	<i>Rhizopus orizae</i>	38-50°	7-8	No
Lipozyme	Novozymes	<i>M. miehei</i>	40-50°	---	No
Lipasa AY	Amano	<i>C. rugosa</i>	35-50°	5.6-8	No
Novozym 677	Novozymes	<i>Thermoyces lanuginosa</i>	40-55°	---	No
Lipomax	Genecor	<i>Psuedomonas alcaligenes</i>	35-47	6-8.7	---

FUENTE. Novozymes, amano Enzymes, Genecor

*Torrez Gabilan, Síntesis e hidrólisis de amidas por medio de lipasas. Tesis de Maestría 2004.

2.2.1 Aplicaciones específicas de CalB.

La lipasa B de *Candida antartica* es la enzima más interesante dentro del campo de la síntesis orgánica. Esta enzima es comercializada por la compañía Novozymes tanto en su forma soluble (Novozym 525) como inmovilizada (Novozym 435). La enzima en su forma inmovilizada ha sido la más empleada sobre todo en la síntesis de triglicéridos y de ésteres de alcoholes terpenos, así como en esterificaciones regioselectivas de azúcares, nucleósidos y esteroides (Morris y Gotor; 1993, Turner; 2004).

Por todas estas características, el equipo de trabajo de tecnología enzimática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) dirigida por el Doctor Agustín López-Munguía, ha centrado su atención en estudiar más a fondo las diversas aplicaciones y características de CalB. Específicamente Castillo *et al* (2003), propusieron la síntesis de ésteres de xilitol y ácido oleico mediante reacciones de hidrólisis inversa catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en medio de reacción no convencional (Figura 5). Aprovechando la estabilidad de CalB, estos autores reportaron que mediante estrategias de ingeniería de solventes se puede lograr la manipulación del perfil de

productos de las moléculas sintetizadas de tal forma que la utilización de disolventes polares, como el 2 metil-2-propanol/DMSO 80/20 (v/v) como medio de reacción, favorece la síntesis dirigida de monoésteres con un 73% de selectividad y que la utilización de disolventes hidrofóbicos como hexano permite realizar la síntesis altamente selectiva (94%) de diésteres y triésteres de xilitol y ácido oleico. Estas moléculas son utilizadas como agentes emulsificantes en la industria alimentaria y farmacéutica debido a su carácter anifilílico principalmente.

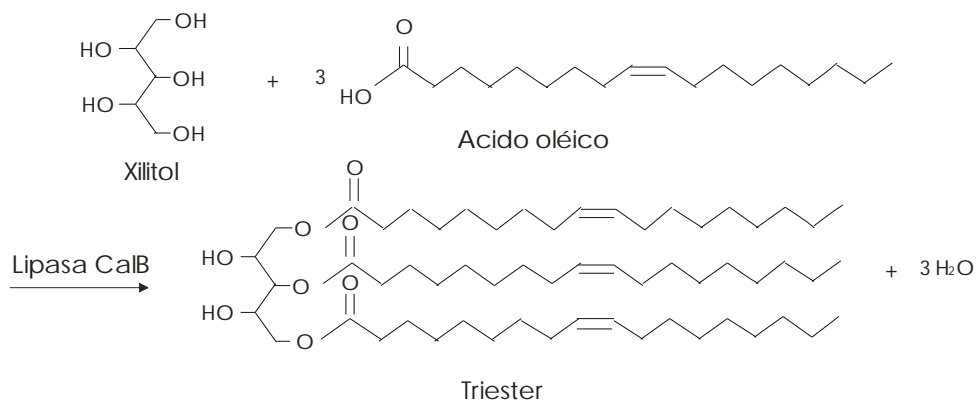


Figura 5. Síntesis del triéster de xilitol y ácido oléico mediante la lipasa B de *Candida antarctica*

En el mismo grupo, Reyes Duarte *et al* (2002), reportaron la aplicación de las lipasas en síntesis e hidrólisis de amidas. En ese trabajo se utilizó como modelo la capsaicina y se estudiaron las reacciones de síntesis enzimática de estas moléculas en solventes orgánicos empleando la lipasa B de *Candida antarctica* como catalizador. Los resultados fueron alentadores y demuestran que la síntesis de amidas se favorece en solventes polares como el 2-metil-2-butanol (2M2B), mientras que la de ésteres se favorece en solventes no polares como n-hexano. También se encontró que la lipasa B de *Candida antarctica* presentó un 70% de conversión para la hidrólisis enzimática del enlace amida en la capsaicina (Figura 6a).

Un aporte original, fue el haber demostrado la viabilidad de sintetizar un éster a partir de una amida en un mismo sistema, utilizando a la lipasa CalB como catalizador en la reacción de trans-esterificación en solventes orgánicos (Figura 6b). Esta reacción fue novedosa en la síntesis orgánica. Por otro lado, el producto de reacción, el capsiato, es un compuesto no pungente derivado de la capsaicina que presenta un potencial de aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica (Reyes-Duarte; 2002).

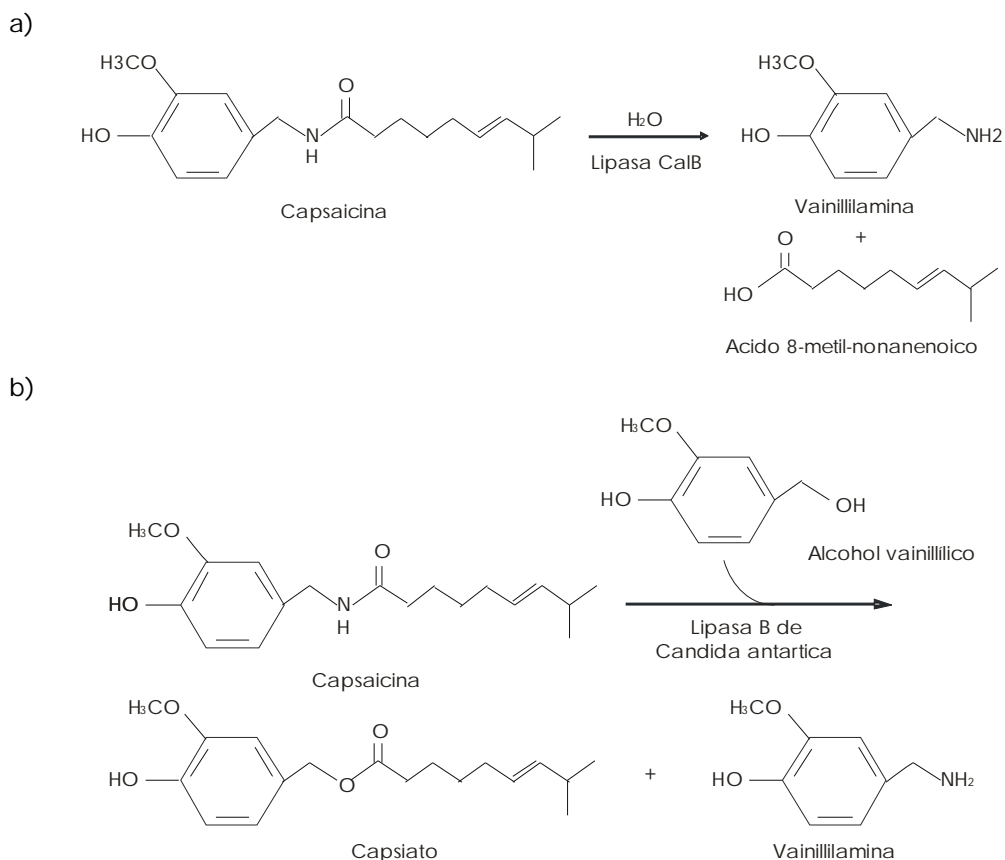


Figura 6. a) Hidrólisis de la capsaicina catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*. b) Síntesis de vainillil-oleoamida a partir de una amina

En trabajos posteriores se reportaron las condiciones del medio de reacción que favorecen la hidrólisis de amidas tomando en consideración las características moleculares de amidas análogas a la capsaicina (Torres-Gavilán *et al*; 2006, Castillo *et al*, 2007). Con este fin, se tomó a la capsaicina como molécula modelo y se efectuó la síntesis enzimática y purificación de una variedad de capsaicinoides artificiales en los que se modificó el tamaño de la cadena hidrofóbica y los sustituyentes del anillo. La síntesis se llevó a cabo en 2M2B a una temperatura de 45°C, encontrándose en todos los casos que las conversiones al equilibrio fueron mayores del 95% después de 72 h de reacción catalizada por la lipasa CalB de *Candida antarctica*.

Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis de las amidas sintetizadas en la primera etapa; se analizó también la susceptibilidad para la hidrólisis de amidas en las que se modificaron los sustituyentes del anillo.

En un trabajo posterior se llevó a cabo un escrutinio de lipasas capaces de hidrolizar la capsaicina. De dicho ensayo la lipasa que mostró mejor desempeño fue la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435).

Recientemente se demostró que por medio de CalB es posible resolver mezclas racémicas de aminas mediante la acilación e hidrólisis enantioselectiva en un proceso definido como "one pot" (en un sólo tubo) (Figura 7), utilizando para esta reacción la amina racémica α -metabencilamina. La acilación permitió obtener como productos la amida correspondiente y al isómero que no reconoció la lipasa. Posteriormente y previa a la separación, la α -metabencilamida sintetizada se sometió a hidrólisis obteniéndose una conversión por arriba del 70% después de un lapso de 72 h, con una velocidad de hidrólisis mayor que la observada en otras amidas no quirales (vainillilamidas, 3 metoxi bencilamidas y bencilamidas).

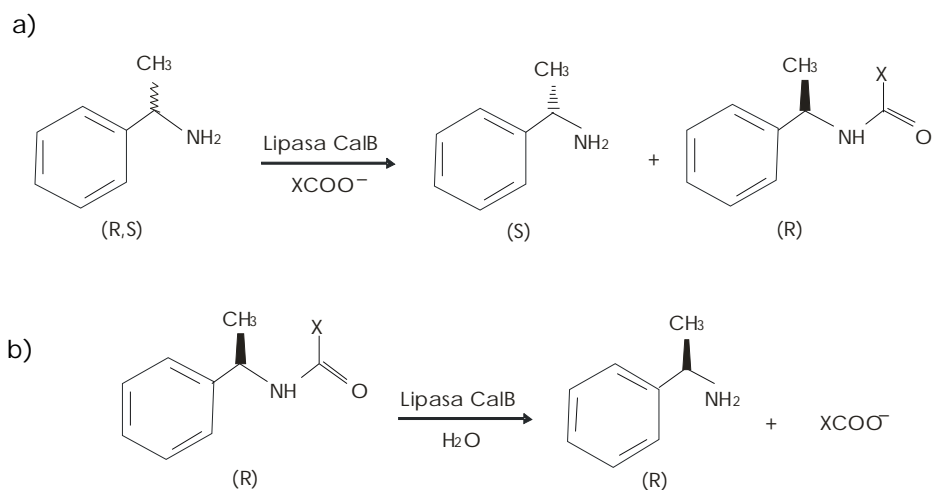


Figura 7. Tecnología "Easy on, easy off", a) Acilación enantioselectiva de una amina (R) en la mezcla racémica (R,S) mediante la lipasa CalB de *Candida antarctica*. b) hidrólisis de la amida acilada (R) en el primer paso, transformación de la que se obtiene la segunda amina (R) de la mezcla racémica.

2.3 *Ustilago maydis*

Ustilago maydis es un hongo perteneciente a la división *Amastigomycota*, que incluye a los hongos verdaderos; a la subdivisión Basidiomycotina, cuyos miembros se caracterizan por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidias y a la clase *Teliomicetes*, que está formada por parásitos de plantas que cuentan con esporas de pared gruesa las cuales pueden resistir largos períodos sin germinar. A los hongos que pertenecen a esta clase se les llama comúnmente *Basidiomycetes levaduriformes* porque crecen como levaduras en medios de cultivo

en el laboratorio (Griffin; 1981). Atacan principalmente las estructuras reproductoras de las plantas, pero se les puede encontrar en cualquier parte aérea de éstas y afectan un gran número de angiospermas. En general cada especie tiene un limitado rango de hospederos (Fisher y Holton; 1957, Durán; 1973).

Existen alrededor de 1100 especies que se han descrito en el género *Ustilago* (Alexopoulos y Mims; 1979). *U. maydis* ataca al maíz (*Zea mays*) y se caracteriza por formar esporas lisas, con espinas o reticuladas (Christensen; 1963).

U. maydis produce el carbón común del maíz (Figura 8), el cual se consume en México como alimento desde la época prehispánica. El tumor o agalla que se forma en la mazorca del maíz fue llamado por los Aztecas «Popoyotl» (maíz quemado), «Huitlacoche» o «Cuitlacoche» (Christensen; 1963, Kealey y Kosikowski; 1981, De la Isla; 1984). El huitlacoche se considera originario del hemisferio occidental, pero en la actualidad tiene una distribución mundial pues se encuentra en cualquier parte donde se cultiva maíz (Davis; 1936, Christensen; 1963).

En México la demanda por este alimento tradicional ha aumentado considerablemente en los últimos años y se ha extendido a otros países como Estados Unidos donde se le han asignado diversos nombres como Hongo del maíz, Trufa Mexicana, Caviar Azteca o Maizteca. El huitlacoche se considera una exquisitez culinaria y se prepara en gran diversidad de formas (Pataky; 1991).

U. maydis presenta dos tipos de esporas: las teliosporas y las basidiosporas. Las teliosporas son diploides, de forma esférica a elipsoidal, estas esporas pueden hibernar largos periodos de tiempo (Shurtleff; 1980). Las basidiosporas o esporidias se producen por la germinación de las teliosporas; son típicamente haploides, hialinas, fusiformes y elongadas en la base. Además se multiplican por gemación y son saprofiticas (Christensen; 1963). Durante el ciclo de vida de *U. maydis*, las teliosporas germinan produciendo esporidias que infectan la planta de maíz, inmediatamente después, se forma el micelio dicariótico que crece y ataca las zonas meristemáticas de la planta. La infección es típicamente local apareciendo agallas en cualquier parte aérea de la planta (Christensen; 1963).



Figura 8. Enfermedad del carbón del maíz producida por *Ustilago maydis*

2.3.1 Lipasas en *Ustilago maydis*

Algunos autores se han interesado en estudiar en particular las enzimas que degradan lípidos y su función en *Ustilago maydis*. Se ha postulando que estas enzimas posiblemente degradan los lípidos de la pared celular de la planta hospedera en una etapa temprana de la infección (Katsivela *et al*; 1995). Por otro lado, también se propone que los lípidos representan una señal para la aparición de filamentos en *Ustilago maydis* (Klose *et al*; 2004). Así mismo, la producción de lipasas durante el desarrollo de la patogenicidad y en medio de cultivo líquido de *U. maydis* también ha sido estudiada.

Recientemente se liberó el genoma completo de *Ustilago maydis*, surgiendo con esto la identificación de varias lipasas putativas en el genoma (Tabla 5).

Tabla 5. Genes de Lipasas hipotéticas identificadas en el genoma de *Ustilago maydis*

Genes
um00182
um00637
um01422
um01854
um06274
(LipE)
um02111
um11540
um11026
um11266
um00271
um11070

De estas lipasas identificadas en el genoma de *Ustilago maydis* se encontró una enzima hipotética interesante por sus características estructurales similares a la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) con la que posee una similitud del 70% y una identidad del 80%. Esta lipasa pertenecería a la clase GX de las lipasas y a la superfamilia ABH37 de *Candida antarctica* pudiendo ser el único homólogo que comparta características catalíticas con la lipasa CalB. De ahí que el objetivo de este proyecto se centre en aislarla y caracterizarla como primera etapa, con la finalidad de conocer sus propiedades y espectro de especificidad y sucesivamente hacer un análisis comparativo con la lipasa B de *Candida antarctica*.

3.- HIPÓTESIS:

La lipasa hipotética LipE de *Ustilago maydis* es una enzima funcional, capaz de sintetizar e hidrolizar ésteres con una alta eficiencia y un amplio rango de especificidad, y con propiedades catalíticas similares a CalB.

4.- OBJETIVO GENERAL:

- Aislar, expresar y caracterizar la lipasa hipotética LipE del hongo *Ustilago maydis* (Huitlacoche) con el fin de analizar sus propiedades y compararla con la lipasa B de *C. antartica* (CalB), en particular su eficiencia y espectro de especificidad.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar y clonar el cDNA que codifica para la lipasa hipotética LipE.
- Producir la lipasa recombinante en el modelo de *E. coli*.
- Purificar la enzima LipE expresada heterológamente.
- Caracterizar la enzima LipE según su actividad lipasa.
- Caracterizar la enzima LipE según su actividad de hidrólisis de aminas.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

La cepa de *Ustilago maydis* 521 (a₁b₁) fue facilitada por la Dra. Regine Kahmann del Instituto Max Planck en Marburgo, Alemania. Dicha cepa se propagó en los medios PDB y PDA (Tablas 6 y 7) y también en medio PDB suplementado con aceite de oliva y coco al 0.1 y 2% respectivamente como medio de inducción.

Como hospederos se utilizaron las cepas DH5 α , TOP 10 y Origami DE3 de *Escherichia coli*, las cuales se cultivaron en medio YT2X, Luria Bertani (LB) y SOC (Tablas 8, 9 y 10).

Las cepas de *Ustilago maydis* fueron liofilizadas y las de *E. coli* fué preservada en una solución de glicerol al 30% (v/v) a -20°C.

Tabla 6. Composición del medio PDA (Agar Dextrosa y Papa)

Compuesto	Concentración (g/L)
Infusión de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15
pH final 5.6-5.8	

Tabla 7. Composición del medio PDB (Caldo Dextrosa y Papa)

Compuesto	Concentración (g/L)
Infusión de papa	4
Dextrosa	20
pH final 5.1-5.3	

Tabla 8. Composición del medio YT2X para la producción de enzimas recombinantes en *E. coli* TOP 10 y Origami DE3.

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotripton	16
Extracto de levadura	10
NaCl	5
Arabinosa (inductor)	0.02%

Tabla 9. Medio sólido Luria Bertani (LB) para aislar células de *E. coli* transformadas

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Ampicilina *	200 μ g/mL
Agar	15

*Antibiótico de acuerdo al gen de resistencia del plásmido insertado para una presión selectiva

Tabla 10. Medio SOC para la recuperación de células *E. coli* después del tratamiento para transformarlas.

Reactivo	Concentración (g/L)
Triptona	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0.5
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR MEDIO DE PARANITRO FENILPALMITATO (pNPP).

El ensayo de actividad lipasa se llevó a cabo midiendo la velocidad de hidrólisis del paranitro fenilpalmitato (pNPP), definiendo una unidad como la cantidad de enzima que transforma 1 μmol de sustrato en un minuto.

La técnica consiste en preparar una solución stock con los siguientes componentes: 30 mg del sustrato en 10 mL de isopropanol. A esta mezcla se agregó 90 mL de buffer fosfatos 50 mM a pH 8, obteniendo un volumen final de 100 mL, la cual es una solución turbia en el caso del pNPP. Para su clarificación con la finalidad de medirla en el espectrofotómetro, se utilizó la metodología propuesta por Gupta *et al* (2002). Esta propuesta sugiere agregar Tritón X-100 a la solución stock, en este caso a una concentración de 4%. Una vez clarificada, se agrega la enzima a las concentraciones deseadas en un volumen de reacción de 0.5 mL y se incuba a 37, 40 o 50°C según la enzima analizada.

La absorbancia se monitoreó a 410 nm a lo largo del tiempo utilizando como blanco la solución stock clarificada e incubada sin la presencia de la enzima y, como control, el buffer de replegamiento utilizado en el caso de la medición de actividad para cuerpos de inclusión (apartado 5.6).

Para obtener las unidades de la actividad lipasa se correlacionó el coeficiente de extinción del pNPP con la pendiente obtenida de los datos de absorbancia detectada a lo largo del tiempo.

5.2.1 Inducción y caracterización de la actividad lipasa en *Ustilago maydis* 521

Debido a que la lipasa de interés LipE es extracelular, se procedió a monitorear la actividad en el medio de cultivo del hongo a lo largo del tiempo, mediante la técnica de hidrólisis del pNPP antes descrita.

El cultivo de *Ustilago maydis* se realizó de la siguiente manera: se creció a *U. maydis* en medio PDB agregándole una mezcla de aceite de oliva y coco al 0.1 y 2% respectivamente. *U. maydis* 521 se cultivó en matraces de 250 mL con un volumen de 70 mL de medio de cultivo en condiciones de 30°C y a 250 rpm. En cada uno de estos matraces se inocularon 100 µl de un preinóculo el cual consiste en un cultivo de *U. maydis* con 12 h de incubación. Durante el cultivo se monitoreó también la densidad óptica.

5.3. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA PARA LA LIPASA LipE.

5.3.1 Extracción de RNA de *Ustilago maydis*

La extracción de RNA se llevó a cabo utilizando células de *Ustilago maydis* 521 crecidas en medio PDB e inducidas con una mezcla de aceite de oliva y coco de 6 días de fermentación a 30°C y 200 rpm.

Para este proceso se utilizó el protocolo del Kit Aurum Total RNA mini Kit, el cual propone el empleo de liticasas para romper la pared celular. Este protocolo fue modificado optimizando la ruptura celular por medio de maceración del tejido congelado en nitrógeno líquido seguido de un tratamiento de agitación con perlas de vidrio previamente esterilizadas con ácido nítrico y agua con Dietil pirocarbonato (DEPC) al 1%. El RNA obtenido fue separado en un gel de agarosa al 1% en buffer Ácido mofolino propano sulfónico (MOPS) con formaldehído; el gel se corrió durante 30 min a 40 volts.

5.3.2 Diseño de oligonucleótidos específicos

Para diseñar los oligonucleótidos que permitan la amplificación del gen LipE, se partió de la secuencia del gen LipE en el genoma de *Ustilago maydis* de la cual se eliminó el péptido señal predicho por medio del programa signalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP>) debido a que los vectores seleccionados para clonar y expresar en *E. coli* ya cuentan con un péptido señal para este microorganismo. Con esta información, se construyó un mapa de sitios de restricción de cada vector y se seleccionaron las enzimas de restricción a utilizar de acuerdo con lo que se resume en la tabla 11.

Los sitios de restricción fueron incluidos en el diseño de los oligonucleótidos, los cuales fueron sintetizados y purificados en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen LipE.

Lugar de alineación	Nombre del oligo	Secuencia	Sitio de restricción	TM *
5' (directo)	EcLipENcoIFw	CCG CCA TGG GCA CCG CTC GCC AGT TCC	NcoI	94
3' (reverso)	EcLipEEcoRIRv	CGG GAA TTC ATT GAT CGT TCC AGA GCA CG	EcoRI	88

*TM calculada

5.3.3 Reacción de la Reverso Transcriptasa (RT)

Para la reacción con la RT se utilizaron las siguientes condiciones de acuerdo al manual ROCHE con 2 oligonucleótidos diferentes (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Mezclas utilizadas para la reacción de la reverso transcriptasa.

Mezcla 1	
Oligo	1 µl (a una concentración de 50 µg/mL)
RNA	5 µl
H ₂ O	6 µl
Vf	12 µl
Mezcla 2	
Buffer	4 µl
Dtts	2 µl
dNtps	1 µl
Vf	7 µl

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT para obtener el cDNA del hongo *Ustilago maydis*

Nombre	secuencia
Oligonucleotido de TA	GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGT TTT TTT TTT TTT TTT VN
Oligonucleotido de TC	TTT TTT TTT TTT TT VN

La mezcla 1 se puso a calentar a 70°C por 10 minutos. Pasado ese tiempo se enfrió a 4°C por otros 5 minutos, posteriormente se agregaron los 7 µl de la mezcla 2 y se incubó a 42°C durante 2 minutos después de lo cual se agregó 1 µl de enzima (reverso transcriptasa). La mezcla final se incubó a 37°C durante 1 h, después de lo cual se obtuvo el cDNA y se almacenó a 10°C.

Este procedimiento se resume en el esquema siguiente:

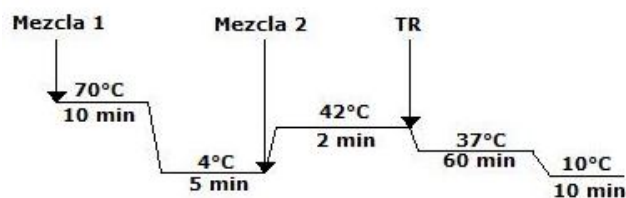


Figura 9. Esquema general para la obtención de cDNA mediante la reacción con la transcriptasa reversa

5.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del cDNA de *Ustilago maydis*

Para la amplificación del cDNA de la lipasa LipE se utilizó la enzima Taq polimerasa (Invitrogen) que deja un residuo adenina (A) en los extremos del fragmento amplificado que servirá para la posterior clonación. De manera general las reacciones se llevaron a cabo en 25 μ L con 100 μ M de dNTP's, 20pM de cada uno de los oligonucleótidos, 0.75mM de Mg²⁺, 1X del buffer indicado por el proveedor de la enzima y completando el volumen con agua tetradestilada. Para evaluar las mejores condiciones de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos para con el templado, se realizó una PCR bajo gradientes de temperatura de 54.2, 55.9, 58.2, 60.2, 62 y 62.2°C. Las reacciones se realizaron en un termociclador Touchgene Gradient (TECHNE). En la tabla 14 se resumen los programas utilizados para amplificar los diferentes fragmentos de LipE.

Tabla 14. Esquemas de los programas utilizados para la amplificación del gen que codifica para la enzima LipE.

Características	Programa
Amplificación de LipE	<p>35 ciclos</p>
Amplificación de LipE con gradiente de temperatura	<p>35 ciclos</p>

Terminada la reacción, el DNA amplificado fue separado por electroforesis (Bff TAE 10X, EDTA 18.61%, Tris 48.4% y ácido acético 11.42% pH 8.11 filtrado y diluido a 0.5X) en gel de agarosa al 0.8% y revelado con bromuro de etidio diluido

1:1000. Las concentraciones de los reactivos y las condiciones generales mostradas en la tabla 14 fueron utilizadas para las posteriores amplificaciones.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE) siguiendo las instrucciones del proveedor.

5.3.5 Extracción y PCR de DNA cromosomal

Para extraer el DNA cromosomal, se utilizó el Kit Microbial DNA Isolation Kit de Qiagen cuyo protocolo no fue modificado.

Una vez obtenido el DNA se utilizó como templado para la reacción de PCR la cual se realizó con la enzima Taq polimerasa y con el gradiente de temperaturas antes mencionadas. El programa utilizado para ésta amplificación fue el mismo que el utilizado para previas PCRs.

5.4.- CLONACIÓN DEL cDNA de LIPE

5.4.1 Vectores de expresión

Para la construcción de los plásmidos recombinantes se utilizaron los vectores pBAD /TOPO^R Thio Fusion Expresión (Invitrogen) y Cold Shock Expression System pColdI DNA (Takara).

El vector pBAD se encuentra linealizado y tiene en ambos extremos residuos Timinas (T) y una topoisomerasa que une a las T con los residuos de Adenina (A) que deja la polimerasa Taq en la amplificación de los genes a insertar. Además contiene un gen de resistencia a ampicilina útil para la selección de colonias positivas, un origen de replicación, un promotor que se induce por arabinosa el cual promueve la transcripción del gen clonado y un dominio tiorredoxina el cual ayuda al plegamiento correcto del gen clonado.

El fragmento LipE fue también clonado en el vector pColdI, el cual es un sistema de expresión favorecido por un choque térmico y contiene un promotor LacI inducible por IPTG, un gen de resistencia a ampicilina y una etiqueta de histidinas. Este fragmento fue clonado por medio de ligación con enzimas de restricción, las ligasas utilizadas fueron Quick ligasa (Invitrogen) y la ligasa T4 (Fermentas).

Como control positivo de la expresión se utilizó a CalB clonada en el vector Cold Shock Expression System pColdIII DNA (Takara) el cual fue proporcionado por la Dra. Magali Remaud-Simeon del Laboratorio de Biotecnología y Bioprocesos de la Universidad de Toluse, Francia. Las características de los vectores utilizados se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Vectores de expresión utilizados en el desarrollo del proyecto

Vector	Promotor	Gen de resistencia	Inductor
TOPO pBAD	Ara	Ampicilina	Arabinosa
pColdI	LacI	Ampicilina	IPTG
pColdIII	LacI	Ampicilina	IPTG
pGro7	Ara	Cloranfenicol	Arabinosa

Los plásmidos fueron conservados a -20°C.

5.4.2 Transformación en *E. coli*

Las cepas de *E. coli* DH5 α , TOP 10, Origami DE3 sensibilizadas eléctricamente (electro-competentes) fueron transformadas por un choque eléctrico bajo las siguientes condiciones: Una suspensión celular electro-competente (50 μ L) se puso en contacto con 1 μ L de la ligación tanto del vector TOPO pBAD como del pColdI con el gen de interés LipE (la ligación contiene una relación 1:4 vector-inserto) ó 1 μ L también del plásmido pColdIII que expresa la proteína CalB. Las mezclas anteriores se incubaron en hielo durante 15 minutos antes de ser sometidas a un choque eléctrico. Inmediatamente después del choque, las células transformadas de *E. coli* se regresaron al hielo. Finalmente, las células se recuperaron cultivándolas en 1mL de medio SOC a 37°C y 250rpm durante 1 hora.

Una vez pasado el tiempo de recuperación, el contenido celular fue distribuido en placas de agar LB/ampicilina 100 μ g/mL o LB ampicilina/cloranfenicol (100, 30 μ g/ml respectivamente), según el caso, plaqueando 5, 20, 50, 100, 200 y 400 μ L. Dichas placas se incubaron a 37°C por 12 horas para lograr el aislamiento de colonias.

5.4.2.1 Transformación de *E. coli* Origami DE3 con la chaperona GroEL

Se sensibilizaron eléctricamente células de *E. coli* Origami DE3 que contienen el plásmido pGro7 el cual codifica para la chaperona GroEL proveniente del kit Chaperone plasmid set (Takara) y se cotransformaron con el plásmido TOPO pBAD ó pColdI con el gen que codifica para las lipasas LipE y pColdIII con el gen de CalB respectivamente. Estas transformaciones se realizaron de acuerdo con la metodología antes mencionada. Las colonias positivas se aislaron en placas de agar LB conteniendo ampicilina 100 μ g/mL y cloranfenicol 30 μ g/mL.

5.4.3 Extracción de plásmido por columna de células de *E. coli*

La extracción de plásmido se hizo a partir de cultivos de 12 horas y se utilizó el Kit High Pure Plasmid Isolation de ROCHE Diagnostics GmbH siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos aislados se utilizaron para

transformaciones posteriores de células y se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

5.4.4 Verificación de clonas positivas y análisis de orientación del gen insertado

5.4.4.1 Empleo de oligonucleótidos específicos

La amplificación por PCR de los genes insertados en los vectores se llevaron a cabo utilizando el juego de oligonucleótidos específicos para cada gen de manera que se verificara la presencia del gen completo. Para este ensayo se extrajeron los plásmidos de las colonias de *E. coli*. Un oligonucleótido del vector y uno del gen de interés se utilizaron para saber la dirección del inserto dentro de los vectores seleccionados.

5.4.4.2 Empleo de enzimas de restricción

Otra forma de comprobar la presencia del gen en el vector es por medio de la digestión de sitios específicos con enzimas de restricción. Dichos sitios fueron insertados en el inicio y final de los genes con ayuda de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 11). La digestión se llevó a cabo 12 h a 37°C en un volumen de 20 µL.

5.4.4.3 Secuenciación del inserto

Las secuencias obtenidas se realizaron en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la Unidad de Secuenciación Automática de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Las secuencias fueron analizadas con el programa BLAST de la página National Center For Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>)

5.5.- EXPRESION HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA EN *E. COLI*

5.5.1 Perfil de expresión de la proteína LipE utilizando la construcción pBadLipE

Para lograr identificar la concentración de arabinosa óptima de inducción para la expresión de la proteína con el plásmido Topo pBad, se propagaron las células de *E. coli* origami DE3 en 5 mL de caldo YT2X ampicilina 100 µg/mL, 12 h a 37°C y 200 rpm como preinóculo. Este cultivo se utilizó para inocular al 5% una serie de 4 tubos con un volumen final de 5mL de caldo YT2X ampicilina 100 µg/mL y

diferentes concentraciones de arabinosa (0, 0.2, 0.02 y 0.002%), posteriormente se incubaron a 20°C y 250 rpm por 4 horas.

Las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 6300 rpm durante 10 minutos a 4°C. Éstas se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos 50mM pH 8 y por último se centrifugaron a las mismas condiciones mencionadas para recuperar la pastilla celular. Esta pastilla se resuspendió en 700 µL del buffer fosfatos antes mencionado. Las células resuspendidas en 700 µL de buffer de fosfatos 50 mM pH 8 se rompieron mediante liticasas. La solución se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C para separar las proteínas insolubles y el detritus celular de las proteínas solubles. Finalmente ambas partes se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

Una vez hecho el perfil de expresión, se seleccionó la concentración de 0.02% de inductor para posteriores expresiones con mayor volumen de fermentación. Los cambios realizados fueron los siguientes: a partir de células almacenadas en glicerol al 30% se propagó un preinóculo en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio YT2X con antibiótico 100 µg/mL. Los 50mL del cultivo anterior sirvieron como inóculo para un matraz tipo Fernbach (2.8L) con 950 mL de medio YT2X suplementado con 100 µg/mL del antibiótico necesario para cada vector utilizado.

Este medio se dejó creciendo a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5, momento en que se procedió a la inducción. La ruptura celular se realizó aplicando una presión de 1200 psi para lo cual se utilizó la prensa de French con una celda de una capacidad de 10 mL o en su defecto, las células se rompieron por sonicación durante 3 periodos de 10 segundos. De igual forma los restos celulares fueron separados de su parte soluble por centrifugación a 6300 rpm por 15 min a 4°C.

5.5.2 Expresión de las proteínas LipE y CalB con las construcciones pColdI LipE y pColdIII CaIB

Para expresión de las proteínas LipE y CalB con los plásmidos pColdI y pColdIII respectivamente se utilizó la cepa de *E. coli* origami DE3. La primera etapa consistió en un crecimiento celular hasta alcanzar 0.5 de densidad óptica (como se describe anteriormente). Posteriormente, se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM como inductor en medio LB. Las células se cultivaron a 15°C y 180 rpm por 24 horas.

Una vez pasado ese tiempo, las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 6300 rpm durante 10 min y lavadas 3 veces con buffer de fosfatos 50 mM pH 8.

Finalmente, para lograr la liberación de las enzimas de la cavidad citoplasmática de las células de *E. coli*, se resuspendió la pastilla celular en 10 mL del mismo buffer de lavado y se sonicó en frío utilizando un sonicador Branson Sonifier 250 con 3 pulsos de 10 segundos con descansos de 30 segundos.

5.5.2.1 Expresión de las proteínas LipE y CalB con la chaperona GroEL

Para la expresión de las proteínas de interés LipE y CalB con la chaperona GroEL se siguió el procedimiento mencionado anteriormente con la diferencia de que el medio LB fue suplementado en todo momento de la inducción con la mezcla de 2 antibióticos ampicilina y cloranfenicol respectivamente a las concentraciones antes descritas.

5.5.3 Identificación y cuantificación de las proteínas recombinantes

5.5.3.1 Electroforesis de proteínas

Las proteínas tanto del extracto soluble como de los sólidos celulares fueron separadas por electroforesis en gel de 1 mm de espesor de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970).

Se empleó una cámara Mighty small II. Para preparar el gel concentrador se utilizaron: agua 1.4 mL, bisacrilamida 30% 0.33 mL, Tris pH 6.8 1M 0.25 mL, SDS 10% 0.02mL, persulfato de amonio al 10% 0.02mL y N,N,N,N'-Tetrametilendiamina 0.002mL y como gel separador se utilizó un gel a 12% de concentración el cual contenía para su preparación agua 3.3 mL, bisacrilamida 30% 4.0 mL, Tris pH 8.8 1.5 M 2.5 mL, SDS 10% 0.1 mL, persulfato de amonio al 10% 0.1 mL y N,N,N,N'-Tetrametilendiamina 0.004mL. La preparación de las muestras consistió en la adición de una solución desnaturalizante por 5 minutos (Tris-HCl 0.125M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, y azul de bromofenol 0.05%). Para la separación se utilizaron 15mA en la migración.

Finalmente el gel fue teñido con azul de coomassie y desteñido para visualizar la proteína. La metodología para la tinción y visualización de la proteína se resume en la tabla 16.

Tabla 16. Soluciones y condiciones para visualizar proteínas en geles de acrilamida

Solución	Composición	Tiempo
Solución teñidora	Ácido acético 10%, metanol 30% y azul de Coomassie al 0.2%	20 minutos
Solución desteñidora I	Metanol al 50%, ácido acético al 10%)	20 minutos
Solución desteñidora II	Metanol al 5%, ácido acético al 1%	indefinido

5.5.3.2 Técnica de Western Blot

Después de la separación por electroforesis, se procedió a transferir las proteínas del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Este procedimiento se realizó mediante western blot, cuyo protocolo se resume de la siguiente manera:

El gel se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa entre papeles filtro de celulosa previamente humedecidos con un buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% y metanol 20%). Posteriormente se les sometió a un campo eléctrico de 150 mA durante 1 h y 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a bloquear la membrana con buffer fosfatos 50 mM pH 6 y 0.05% de leche descremada durante toda la noche a 4°C. Seguidamente, la membrana se lavó en repetidas ocasiones con buffer fosfatos y tween 80.

Cuando la membrana estuvo bien lavada, se le agregó el anticuerpo anti-histidinas y se dejó en contacto. Finalmente la membrana fue teñida con TMB el cual es cromógeno revelador del anticuerpo.

5.5.3.3 Cuantificación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford (1976) utilizando el kit Bio-Rad protein assay CA 94547 en el sobrenadante recuperado después del prensado en la extracción (extracto enzimático). Se utilizó como patrón albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA).

5.6.- PURIFICACIÓN, SOLUBILIZACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

5.6.1 Replegamiento de los cuerpos de inclusión por medio del kit Pro-Matrix™ Protein Refolding Guide.

Para la purificación de los cuerpos de inclusión (CI) provenientes de la expresión de la construcción pBadLipE, se utilizó el reactivo BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) siguiendo con la metodología sugerida por el proveedor. Los CI después del proceso de purificación se analizaron en un gel de acrilamida para verificar su calidad. Seguidamente, esta pastilla se solubilizó por medio del método descrito en el Current Protocols of Protein Science (2007), el cual sugiere solubilizar los CI en una solución de cloruro de guanidina (GnHCl) 8 M seguido de una ultracentrifugación a 100 000 rpm para separar todas las partículas que no pudieron ser disueltas en el paso anterior.

Una vez puros y solubles, los CI se replegaron mediante el kit Pro-Matrix™ Protein Refolding Guide (PIERCE) el cual sugiere utilizar una matriz con las condiciones de replegamiento que se resumen en la tabla 17 y 18.

Las 18 reacciones fueron dejadas en agitación 18 h a 4°C después de lo cual se verificó su actividad por medio de la técnica de para-nitro fenilpalmitato (pNPP), el cual se describe en el apartado 5.2, para corroborar el replegamiento correcto de la proteína LipE.

Tabla 17. Matriz de condiciones probadas en el replegamiento de la proteína a partir de los CI obtenidos de la fermentación con *E. coli* origami DE3.

Tubo#	Base refolding buffer (900µl)	100 mM EDTA (µl)	200 mM GSH (µl)	100 mM GSSG (µl)	H ₂ O (µl)	Proteína 1mg/mL stock (µl)
1	1	10	10	2	28	50
2	2	10	10	4	26	50
3	3	10	5	10	25	50
4	4	10	10	4	26	50
5	5	10	5	10	25	50
6	6	10	10	2	20	50
7	7	10	5	10	25	50
8	8	10	10	2	28	50
9	9	10	10	4	26	50
Tubo#	Base refolding buffer (900µl)	100 mM EDTA (µl)	200 mM GSH (µl)	100 mM GSSG (µl)	H ₂ O (µl)	Proteína 20mg/mL stock (µl)
10	1	10	10	2	28	50
11	2	10	10	4	26	50
12	3	10	5	10	25	50
13	4	10	10	4	26	50
14	5	10	5	10	25	50
15	6	10	10	2	20	50
16	7	10	5	10	25	50
17	8	10	10	2	28	50
18	9	10	10	4	26	50

Tabla 18. Composición de Buffers utilizados para el replegamiento de LipE.

Buffer#	Composición
1	55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
2	440 mM L-Arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
3	880 mM L-Arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
4	550 mM guanidina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
5	550 mM guanidina, 440 mM L-Arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
6	550 mM guanidina, 880 mM L-Arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
7	1.1 M guanidina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
8	1.1 M guanidina, 440 mM L-Arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2
9	1.1 M guanidina, 880 mM L-Arginina, 55 mM Tris, 21 mM NaCl, 0.88 mM KCl; pH 8.2

5.6.2 Replegamiento de los cuerpos de inclusión por medio de diluciones sucesivas con cloruro de guanidina (GnHCl).

Después de la etapa de purificación y de la solubilización de los cuerpos de inclusión con 8 M de GnHCl, se procedió a replegar a 4°C dializando esta solución protéica contra soluciones de molaridad decreciente en forma sucesiva como se muestra en la figura 10. Cada etapa del experimento se llevó a cabo en agitación continua durante 3 h.

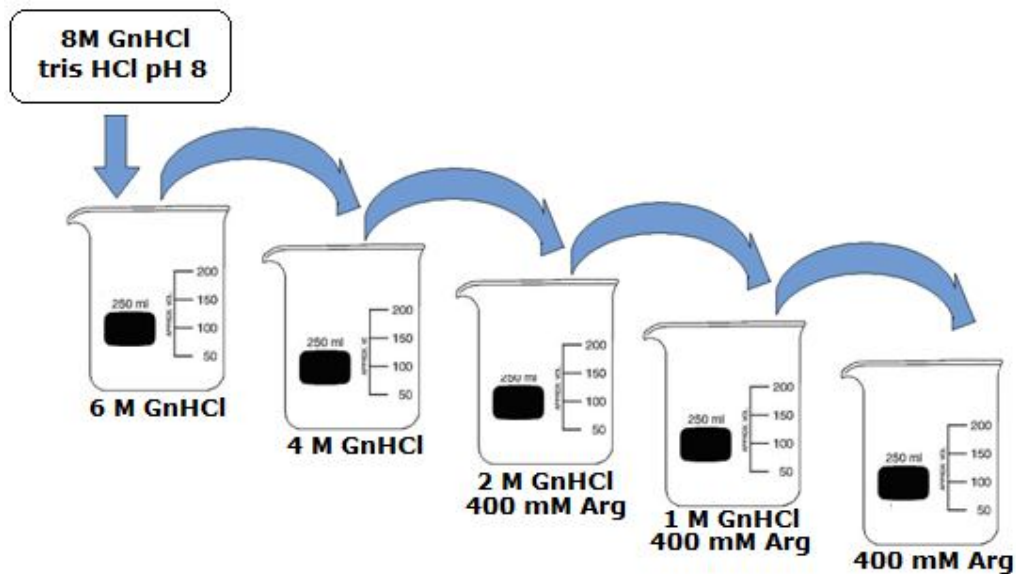


Figura 10. Esquema de la diálisis sucesiva para el replegamiento de los cuerpos de inclusión

5.6.3 Replegamiento de los cuerpos de inclusión en presencia de ditiotetriol y a pH ácido (pH 4).

El replegamiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Estrada *et al* (2007) en el cual se solubilizan los cuerpos de inclusión con cloruro de guanidina 6M en buffer fosfatos 50 mM pH 4 suplementado con ditiotetriol (DTT) en una relación 1:20.

Después de solubilizar la proteína, se procedió a replegarla diluyendo a 2M de cloruro de guanidina. La mezcla se ultrafiltró para quitar el DTT de la solución. Posteriormente se realizó una segunda etapa de ultrafiltración con una solución de guanidina 2M adicionada con 0.1 mM de glutatión oxidado y 1mM de glutatión reducido pH 8, la proteína se dejó en este buffer para su replegamiento por 12 h al término de las cuales se midió actividad enzimática.

5.7.-CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES

La caracterización enzimática y bioquímica de las enzimas LipE y CalB, se llevó a cabo con los extractos celulares de *E. coli* origami DE3 en las condiciones descritas en el apartado 5.5.2.

La medición de la actividad se realizó siguiendo la hidrólisis del pNPP tal como se describe en la sección 5.2.

5.7.1 Perfil de temperatura y pH

Para obtener los perfiles de temperatura y pH tanto de la enzima LipE como del control CalB, se tomaron los extractos enzimáticos celulares y se procedió a medir la actividad de los mismos a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 y 70°C) manteniendo el pH constante en 8. Una vez determinada la temperatura óptima para cada caso, se procedió a medir actividad a diferentes pHs (5, 6, 7, 8, 9 y 10) manteniendo en este caso la temperatura constante a 40 y 50 °C para LipE y CalB respectivamente .

5.7.2 Termoestabilidad

En este experimento se ensayaron 5 temperaturas diferentes (40, 45, 50, 55 y 60°C). El extracto proveniente de *E. coli* con la enzima de interés en buffer fosfatos pH 8, 50 mM se colocó en un baño con agitación orbital (200 rpm) a las temperaturas antes mencionadas, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación y se procedió a medir actividad enzimática con el pNPP.

5.7.3 Determinación de la energía de activación y desactivación.

El ensayo de determinación de la energía de activación se llevó a cabo midiendo la actividad enzimática del extracto tanto de LipE como de CalB a diferentes temperaturas (30, 35, 40, 45, 50) mientras que la energía de desactivación se obtuvo a partir de los valores obtenidos en el ensayo de termoestabilidad. Los datos se procesaron aplicando la ecuación de Arrhenius que especifica que $\ln k = \ln A_0 - EA/RT$.

5.7.4 Efecto de la concentración de sustrato

Para estudiar el efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad de la enzima de interés LipE y de CalB expresadas en este sistema, se midieron las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de pNPP (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 y 1.4 mM). Para ambos casos se utilizaron 200 μ L de extracto enzimático con una concentración proteica de alrededor de 8 mg/mL, a un pH de 8 y una temperatura de 40 y 50°C para LipE y CalB respectivamente.

5.7.5 Hidrólisis de la capsaicina

Este ensayo se realizó en viales con 5 mL de mezcla de reacción a 45°C, con agitación magnética en un sistema acuoso, utilizando el extracto enzimático soluble de LipE y CalB con una actividad de 1 U/mL. La concentración total de capsaicina utilizada fue de 1.5 mM formando una mezcla bifásica. La reacción se dejó transcurrir durante 164 h al término de las cuales se tomó una muestra y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min.

Las muestras se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) para la cual se utilizó la técnica de elución ascendente unidimensional. Como fase estacionaria se emplearon las placas ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ con sílica gel 60 de 8X10 cm y espesor de 0.25 mm (Macherey-Nagel).

Como eluyente se utilizó una mezcla de acetonitrilo/ácido acético acuoso al 1% (40:60) v/v y como revelador del producto de reacción vainillilamina, se utilizó ninhidrina la cual presenta un color amarillo intenso tal como ocurre con el aminoácido prolina (Hames *et al*; 1997) con un R_f 0.81. Como controles positivos de esta reacción se utilizaron las formas comerciales de CalB soluble (Novozym 525) e inmovilizada (Novozym 435).

6.1.2 Análisis de estructura secundaria

Se realizó un análisis *in silico* de la estructura secundaria de ambas enzimas encontrándose que también a este nivel ambas enzimas son similares.

El punto más importante a resaltar en este análisis es que las estructuras de α hélice y las láminas β se encuentran conservadas. Estos resultados se pueden apreciar en la figura 12.

```
CalB: 1 LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPPSSVSKPIL 35
LipE:  PLASSDPAFSTPKATLDAGLECQTGSPSSQTKPIL

CalB: 36 LVPGTGTTGPQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPPFMLNDTQVNTEYMVNAITALYAGSG 95
LipE:  LVPGTGANGTQTFDSSWIPLSAKLGFSPCWISPPPFMLNDSQVNVEYIVNAVQTLYAGSG

CalB: 96 NNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVW 155
LipE:  SKKVPVLTWSQGGLATQWALTFFPSIRNQVDRLMAFAPDYKGTIEAGLLSTFGLASQSVW

CalB: 156 QQTGSALTTALRNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLFNGKNVQAQAV 215
LipE:  QQQAGSAFVTALKNAGGLTSFVPTTNLYSFFDEIVQPQVFNSDADSSYLGNSKNIQAQTV

CalB: 216 CGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAA 275
LipE:  CGGFVVIDHAGSLTSQFSYVVGKSALTSSSSGVANSADYSSKDCKASPADDLSAKQKADAS

CalB: 276 ALLAPAAAIVAGPKQNCEPDLMPYARPFAVGKRTCSGIVTP 318
LipE:  ALLFVAAGNLLAGPKQNCEPDLPKYARQFAVGKKTCSGTIN-
```

Figura. 12. Análisis de estructura secundaria entre CalB y LipE. Violeta: α hélice, Verde: láminas β , Naranja: motivo GX implicado en el agujero oxianión, Rojo: Triada catalítica, Azul: cisteínas implicadas en los puentes disulfuro, Negritas: aminoácidos del sitio activo, Subrayado: el dominio de tapa, G39: sitio de fijación de grupos medianos de un alcohol secundario, N74: sitio putativo de glicosilación D134, T138, Q157, I189, V190: sitio de unión a ácido graso.

En la figura 12 también se puede observar que tanto los aminoácidos del sitio activo como los del agujero oxianión están conservados en la enzima de interés LipE, lo cual es de gran importancia ya que esto nos da un indicio de que el mecanismo de reacción para ambas enzimas es similar.

También se puede identificar los aminoácidos del denominado dominio de tapa, el cual es un elemento móvil que se encuentra conservado en las lipasas. Este dominio es el encargado de exponer al sitio activo para la catálisis cuando la lipasa se encuentra en una interfase agua-aceite (activación interfacial). Como se ha señalado en el caso particular de CalB, esta tapa se encuentra siempre abierta. En este análisis se puede observar que este dominio se encuentra en ambas enzimas, sin embargo, en LipE existe una mutación de Prolina por Leucina que podría tener repercusiones en la movilidad. Cabe hacer mención que las 6 cisteínas involucradas en los tres puentes disulfuro de CalB, también están presentes en LipE. Esta

característica es importante debido a que las lipasas de organismos eucariontes generalmente contienen numerosos puentes disulfuro. La organización estructural correcta de estos puentes es crucial para mantener la estructura y la funcionalidad de la enzima.

Otro aspecto encontrado en este análisis es el posible sitio de glicosilación que se muestra en la figura, sin embargo, este no pareciera ser un aspecto importante para la actividad debido a que ya se ha reportado la expresión heteróloga de CalB en organismos que son incapaces de generar modificaciones postraduccionales como es el caso de las glicosilaciones, sin afectar la actividad de CalB.

Debido a la similitud en estructura secundaria, se realizó un modelamiento por homología con el objetivo de comparar ambas enzimas en cuanto a su estructura terciaria.

6.1.3 Modelamiento por homología

Se realizaron modelamientos por homología de LipE con la estructura ya reportada de CalB. Se observó que, como consecuencia de las pocas diferencias en estructura primaria, los residuos catalíticos y los que le proveen estabilidad a los intermediarios de reacción (agujero oxianión), así como el dominio de tapa abierto característico de esta enzima, se encuentran presentes y aparentemente en la misma orientación espacial que CalB (Figuras 13 a y b).

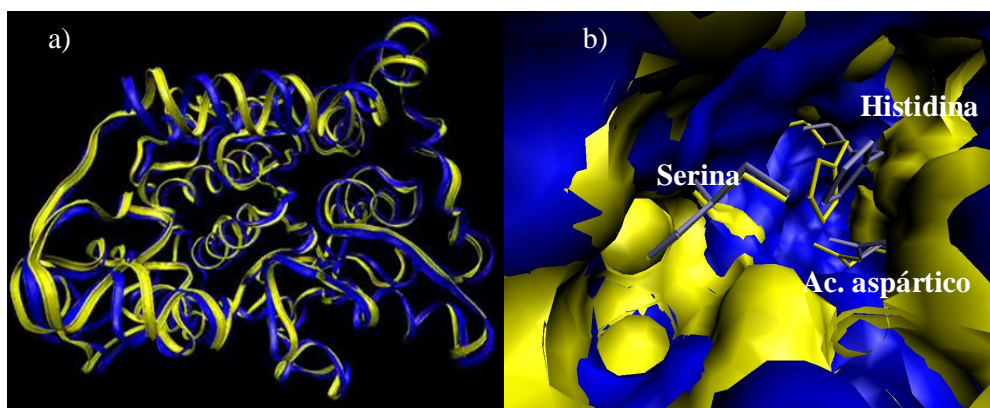


Figura 13. Modelo por homología de LipE (amarillo) sobre CalB (azul) a) estructura terciaria de ambas enzimas utilizando como templado CalB, b) Aminoácidos del sitio catalítico

Como conclusión del análisis estructural comparativo se consideró que, dadas las características de LipE, esta podría tener propiedades fisicoquímicas y bioquímicas similares a CalB.

6.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPASA EN *Ustilago maydis*

Se analizó la actividad lipasa en el sobrenadante del cultivo de la cepa 521 de *Ustilago maydis* en presencia de diferentes mezclas de aceites, ya que se ha reportado con anterioridad que la actividad es extracelular en este microorganismo (Katsivela *et al*; 1995, Klose *et al*; 2004). Esta medición se hizo con la finalidad de encontrar las condiciones favorables de la expresión de la enzima de interés para el posterior aislamiento del cDNA.

La actividad y la densidad óptica del cultivo se monitorearon durante 10 días en el medio PDB con una mezcla de aceite de oliva y coco al 0.1 y 2% respectivamente con el objetivo de inducir la producción de lipasas (Figuras 14 y 15).

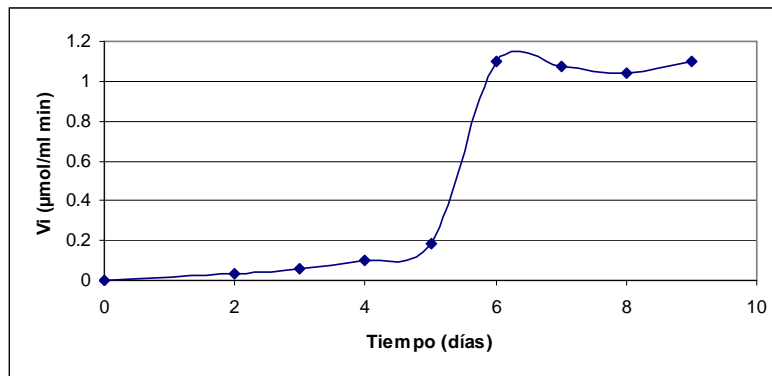


Figura 14. Análisis de producción de lipasas en el sobrenadante del cultivo de *Ustilago maydis* (cepa 521) en medio PDB con mezcla de aceites.

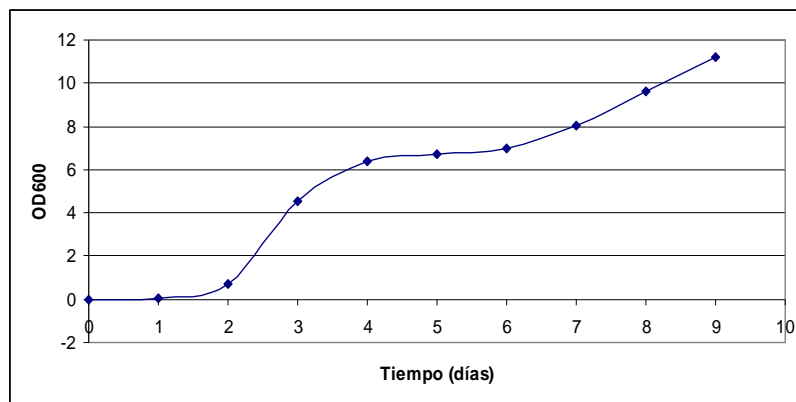


Figura 15. Curva de crecimiento de *Ustilago maydis* (cepa 521) en medio PDB con la mezcla de aceites

Como se observa, la actividad lipasa empieza siendo relativamente baja en los primeros días de cultivo, sin embargo, al sexto día de la fermentación, se observa un aumento significativo en la actividad llegando a un máximo de 1.1 U/mL.

Es interesante también observar en cuanto a la densidad óptica con respecto a los días de la fermentación en el mismo cultivo, un comportamiento diáuxico probablemente debido al cambio de fuente de carbono una vez agotada la glucosa del medio PDB.

Debido a estos resultados, se decidió aislar RNA total de *Ustilago maydis* 521 en el sexto día de la fermentación.

6.3.- AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA PARA LA LIPASA LipE.

6.3.1 Extracción de RNA de *Ustilago maydis*

Se emplearon diferentes metodologías con la finalidad de romper las células para obtener el RNA de *U. maydis* 521, como el uso de liticasas, perlas de vidrio y maceración con nitrógeno líquido. El protocolo de ruptura celular por medio de maceración del tejido congelado con nitrógeno líquido combinado con el tratamiento de ruptura mecánica con perlas de vidrio en agitación fue la forma más eficiente para obtener el mRNA, dado que en acción conjunta se logró romper la pared celular.

Este método se aplicó a células de *U. maydis* crecidas en medio PDB al sexto día de la fermentación. Los resultados se presentan en la figura 16.

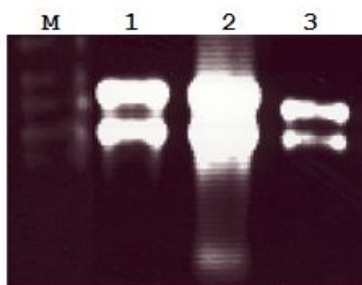


Figura 16. RNA total de *U. maydis* 521 extraído de células cultivadas en medio PDB durante el día 6 de la fermentación, M) marcador de peso molecular, 1) 2 μ L de RNA total, 2) 5 μ L de RNA total, 3) RNA control (+).

6.3.2 Reacciones de transcriptasa reversa (RT) y PCR

Con el objetivo de aislar y clonar el gen LipE, se procedió a hacer la reacción con la reverso transcriptasa sobre el mRNA extraído de *Ustilago maydis* 521. Para este paso se utilizaron dos oligonucleótidos denominados de T los cuales en su estructura tienen un fragmento de timinas sucesivas cuya función es emparentar

con los fragmentos de adeninas característico de los mRNAs de los sistemas eucariontes (TA: GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGT TTT TTT TTT TTT TTT VN, TC: TTT TTT TTT TTT TT VN). Posteriormente, el cDNA obtenido de esta etapa se utilizó como templado para realizar la reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar el gen completo. Cabe hacer mención que el experimento se realizó con un gradiente de temperaturas de alineamiento encontrando que a 58°C se obtienen los mejores resultados como se muestra en la figura 17.

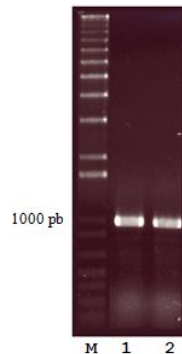


Figura 17. Amplificación del gen LipE utilizando como templado el cDNA extraído de la cepa 521 de *U. maydis*. 1) Marcador de peso molecular, 2) Con RT de oligo TA, 3) Con RT de oligo TC.

De la reacción de PCR se obtuvo un fragmento único que, como se esperaba, presentó un peso molecular de aproximadamente 1000pb.

6.4.- CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LipE EN *E. COLI* CON EL VECTOR TOPO pBAD/Thio

El fragmento obtenido fue clonado en el vector TOPO pBAD/Thio (Invitrogen) y fue transformado en células de *E. coli* top 10. De esta transformación se obtuvieron colonias positivas en placas de agar con ampicilina. Las construcciones resultantes se analizaron por medio de un patrón de restricción con las enzimas NcoI y EcoRI y por PCR con oligonucleótidos específicos para saber si el fragmento esperado estaba presente en la construcción y si la orientación de dicho fragmento clonado era el correcto.

Finalmente los fragmentos fueron secuenciados para corroborar que el gen clonado fuera el de LipE, que estuviera completo y en la orientación correcta, el diagrama de la construcción se muestra en la figura 18.

Una vez confirmado esto, la enzima LipE se expresó utilizando la concentración más alta de inductor sugerida por el proveedor (0.02% de arabinosa a 20°C por 4 h) y posteriormente se realizó un perfil de expresión modificando la

cantidad de arabinosa (0.2 a 0.002%) con el objetivo de determinar la concentración óptima de dicho inductor. Las células se rompieron utilizando sonicación.

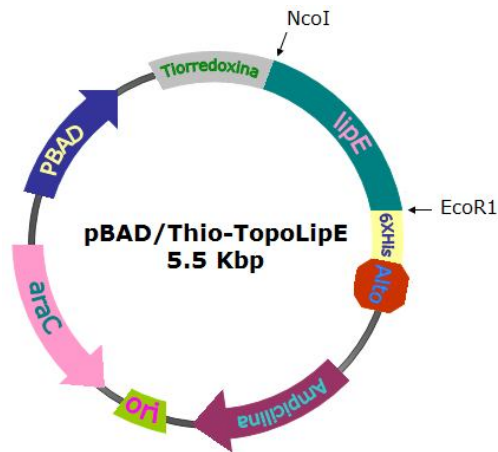


Figura 18. Diagrama de la construcción con el plásmido pBad/Thio-Topo con la enzima LipE.

Se elaboraron geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie de la parte soluble e insoluble de los extractos provenientes de la ruptura celular, para identificar las proteínas. Posteriormente se realizó un Western blot que reconoce la tarjeta de histidinas expresadas en el carboxilo terminal de la proteína con el objetivo de confirmar la presencia de la proteína LipE (Figura 19).

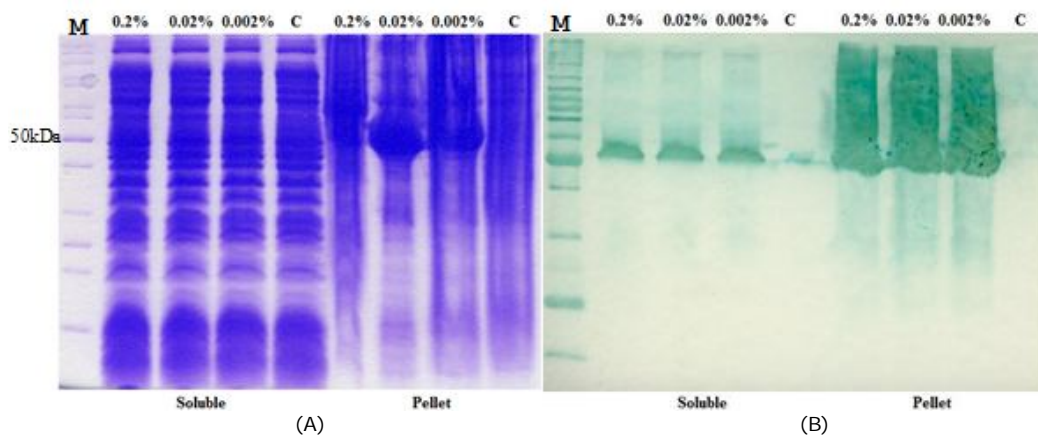


Figura 19. Gele SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie donde se muestra el perfil de expresión de LipE a diferentes concentraciones de inductor (arabinosa) **(A)** y Western blot del gel de acrilamida **(B)**. M) marcador de peso, C) control negativo.

Como se puede observar en la figura 19, existe una proteína de aproximadamente 50 kDa (aproximadamente 30 de la proteína y 20 de la

tiorredoxina del vector pBad) en la fracción insoluble celular, la cual también está presente en el Western blot, esto nos permite confirmar que se trata de la proteína de interés. Se aprecia también que, en todas las concentraciones probadas, se alcanza prácticamente la misma expresión de proteína tanto en la parte soluble como en la parte insoluble del extracto celular. Cabe hacer mención que también se probaron dos diferentes temperaturas de fermentación (25 y 20°C) encontrando que a 20°C se obtiene la mayor cantidad de proteína en la fase soluble. A pesar de que LipE se encuentra en ambas fracciones, la medición de actividad resultó negativa, lo que indica que estamos obteniendo una enzima inactiva.

Debido a que la enzima de interés LipE presenta 6 cisteínas y 3 puentes disulfuro se planteó la hipótesis de que se necesitaba una cepa hospedera con un ambiente reductor óptimo para contribuir con el plegamiento correcto de la proteína. Debido a esto se decidió utilizar como hospedero la cepa de *E. coli* Origami DE3, ya que se ha reportado la expresión de varias proteínas recombinantes de forma soluble y activa que presentan puentes disulfuro, entre ellas la lipasa CalB (Larsen *et al*; 2008). Sin embargo, tampoco se encontró actividad en las fracciones celulares utilizando esta cepa.

Finalmente se coexpresó la chaperona GroEl en este sistema con el objetivo de ayudar al plegamiento correcto de la enzima LipE en el periplasma de la célula, esto debido a que ya se ha reportado la expresión correcta de CalB en *E. coli* Origami DE3 integrando la chaperona GroEL a la expresión (Liu *et al*; 2006).

Mediante este procedimiento se logró expresar una alta concentración de la chaperona en forma soluble, sin embargo, esta estrategia tampoco fue exitosa para producir una enzima soluble y activa. Esto puede ser debido a que, como ya se había mencionado, ambos plásmidos son inducibles por arabinosa y en estos casos se recomienda que la chaperona tenga un promotor diferente para que se induzca primero, y así, una vez expresada esta chaperona, promover el plegamiento correcto de la proteína de interés.

6.5.- PURIFICACIÓN, SOLUBILIZACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN (CI)

Debido a la falta de actividad en la fracción soluble, se propuso recuperar la proteína de los cuerpos de inclusión (CI) y replegarla, para lo cual se realizó una fermentación de 1L a 37°C garantizando así que la mayor parte de proteína estuviera presente en la parte insoluble (Figura 20-A). La purificación de los CI se logró mediante el reactivo Bugbuster el cual consiste en una mezcla de detergentes, liticasas, endonucleasas y otras sustancias que ayudan a romper las células y purificar los CI de membranas y otros componentes celulares ajenos a los

cuerpos proteicos. En la figura 20-B se observa un gel de acrilamida en donde se puede apreciar la cantidad de proteína LipE en los CI después del tratamiento con el agente Bugbuster. Inmediatamente después, se procedió a solubilizar estos cuerpos con cloruro de guanidina 8M.

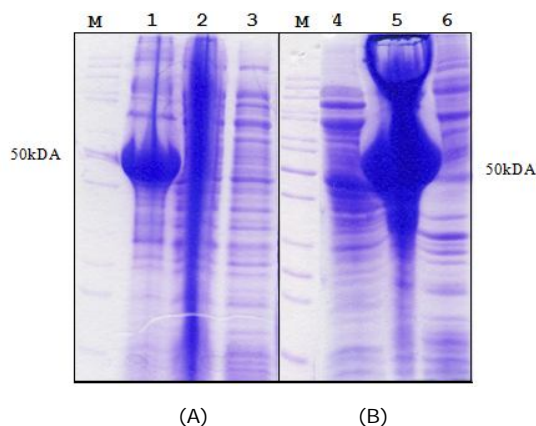


Figura 20. Gel de acrilamida SDS-PAGE **(A)** fermentación a 37°C, M) marcador de peso, 1) Cuerpos de inclusión, 2) control negativo de la expresión con el plásmido sin la proteína de interés, 3) Extracto celular soluble. **(B)** Cuerpos de inclusión después del proceso de purificación M) marcador de peso, 4) CI con impurezas, 5) CI después del proceso de purificación, 6) Control negativo.

En el gel se aprecia que a 37°C tenemos la mayor parte de proteína en la fracción insoluble de la célula. También se observa que en el paso de la purificación de los CI, si bien no se logran purificar totalmente, tenemos aproximadamente un 90% de pureza, este factor es importante para el subsecuente paso de replegamiento (Tsumoto *et al*; 2003).

Después del paso de solubilización, se realizaron ensayos de replegamiento utilizando el kit de replegamiento Pro-Matrix™ Protein Refolding Guide (PIERCE). Siguiendo con el procedimiento sugerido por el proveedor, se probaron 9 condiciones de replegamiento cada una de estas con 2 concentraciones de proteína diferentes: 1mg/mL y 20 mg/mL.

No obstante, en ninguna de las 18 condiciones de replegamiento se obtuvo una enzima activa, por lo que se decidió utilizar un método alternativo para replegar correctamente los CI.

Se utilizó el protocolo reportado por Estrada *et al* (2007) especialmente diseñado para proteínas con puentes disulfuro, cuya diferencia relevante recae en el uso de agentes como el ditiotreitól (DTT) y un pH bajo, lo cual ayuda, junto con la guanidina, a que la proteína se despliegue por completo asegurando también que los puentes disulfuro se rompan completamente para que en el momento del replegamiento, se asocien de manera eficiente.

A pesar de estos cambios, tampoco se logró obtener actividad en los cuerpos de inclusión mediante estos protocolos alternativos.

6.6.- EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES LipE Y CalB EN *E. COLI* CON EL PLÁSMIDO pCold

Con base en los resultados obtenidos hasta esta etapa del proyecto, se decidió probar otro vector de expresión. El vector seleccionado fue el plásmido pColdI de la casa comercial TAKARA, debido a que Liu *et al* (2006) lograron expresar de forma activa la enzima CalB utilizando como sistema de expresión *E. coli*. La construcción obtenida con la enzima LipE se muestra en la figura 21-A.

Con el objetivo de tener un control positivo de la expresión y del ensayo de actividad, nos fue proporcionado el gen CalB clonado en el vector pColdIII figura 21-B. La expresión de ambas proteínas, CalB y LipE, se llevó a cabo en el sistema de expresión en *E. coli* origami DE3, coexpresando la chaperona GroEL figura 21-C.

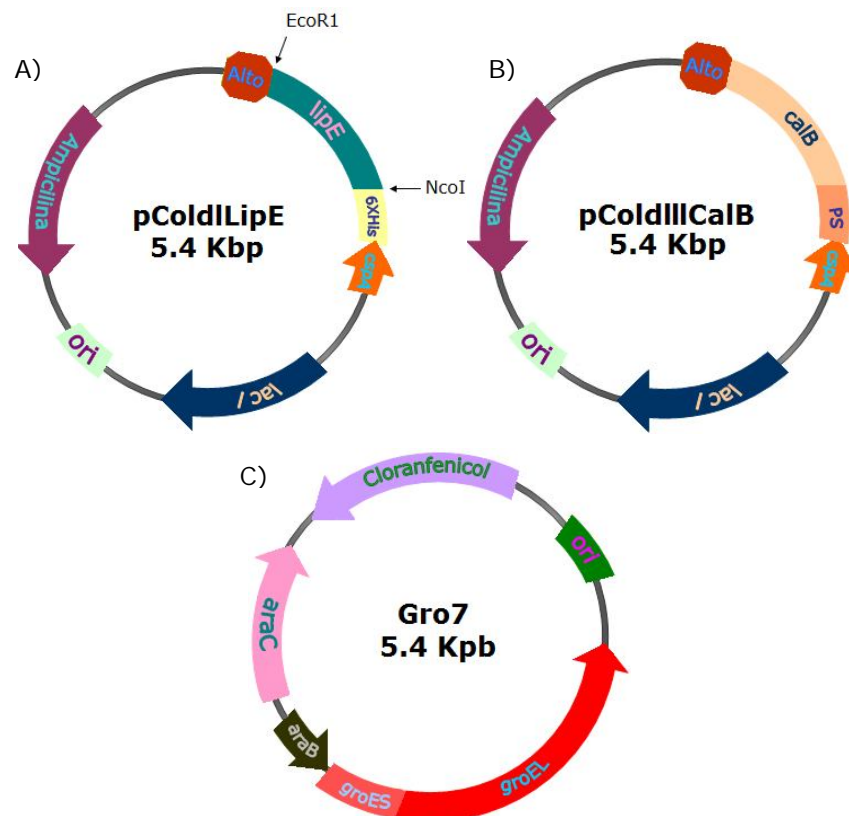


Figura 21. Diagrama de las construcciones **A)** plásmido pColdI con la enzima LipE, **B)** plásmido pColdIII con la enzima CalB, **C)** Diagrama del plásmido Gro7 que contiene a la enzima chaperona GroEL.

La expresión se realizó siguiendo el protocolo descrito por Liu *et al* (2006) detallado en el apartado de materiales y métodos. Después de la expresión se procedió a elaborar geles de acrilamida y mediciones de actividad (Figura 22).

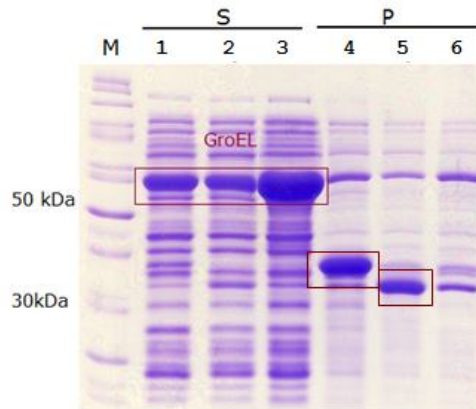


Figura 22. Gel SDS-PAGE con las fracciones del extracto de CalB en *E. coli* teñido con azul de Coomassie, **(S)** Extracto celular soluble, M) marcador de peso, 1) CalB y GroEL, 2) LipE y GroEL, 3) Control negativo de la expresión con la plásmido pCold sin la proteína de interés coexpresando la chaperona GroEL. **(P)** Cuerpos de inclusión, 4) CalB y GroEL, 5) LipE y GroEL, 6) Control negativo con GroEL.

Como se observa en el gel de acrilamida, la chaperona con un peso de 60 kDa se sobrexprende de una manera importante, sin embargo, las proteínas de interés LipE y CalB solo se observan en la fracción insoluble con un peso aproximado de 30 kDa. Debido a estos resultados, se realizó un análisis de Western blot de las fracciones de la proteína LipE aprovechando que, a diferencia de CalB, el vector en el que está clonada cuenta con una sección que codifica para varias histidinas consecutivas que nos ayudan a visualizarla con la ayuda de un anticuerpo anti histidinas (Figura 23)

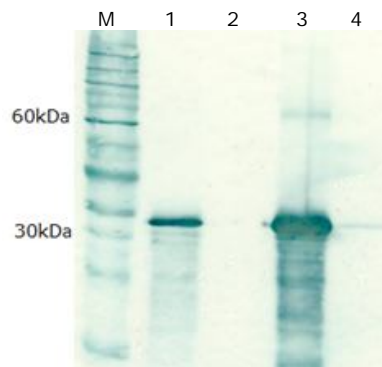


Figura 23. Western-Blot anti His de las fracciones celulares de lipE. M) Marcador de peso, 1) Extracto celular soluble, 2) control negativo: fracción soluble con el plásmido pCold sin el gen de interés, 3) Cuerpos de inclusión, 4) Control insoluble.

Con este experimento pudimos corroborar que LipE se expresa tanto en la fracción soluble como en la insoluble de *E. coli*. Las mediciones de actividad en la fracción soluble tanto de LipE como de CalB se realizaron utilizando pNPP como sustrato, demostrando que estas proteínas son activas, presentando una actividad de 0.55 y 17.3 U/mL respectivamente. Estos valores fueron calculados midiendo la absorbancia a 410 nm con respecto al tiempo (figura 24).

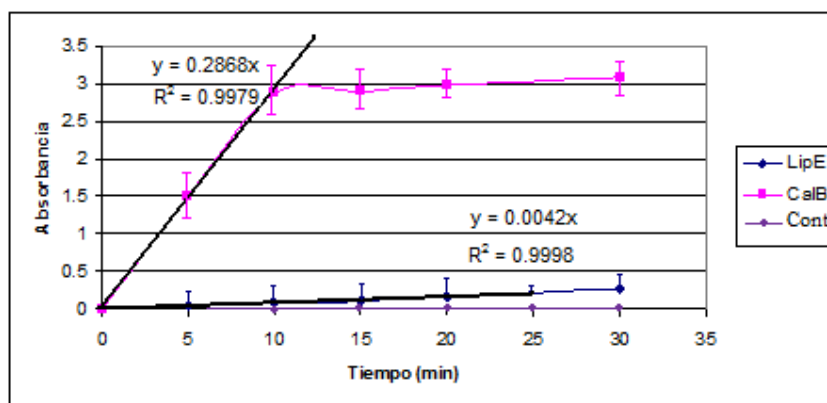


Figura 24. Aparición de la absorbancia a 410 nm con respecto al tiempo en reacciones catalizadas por LipE y CalB medida a 40 y 50 °C respectivamente a pH 8.

6.7.- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES LipE Y CalB

Una vez obtenido el extracto enzimático soluble, se llevó a cabo una caracterización bioquímica de ambas proteínas heterólogas con la finalidad de estudiar sus propiedades bioquímicas. Los parámetros evaluados fueron: pH y temperatura óptima, estabilidad, así como el efecto de la concentración de sustrato.

A pesar de que seguimos diversos protocolos de purificación ya reportados para CalB, ninguno de ellos fue exitoso para ambas proteínas en este sistema, debido a esto, la caracterización bioquímica de LipE se llevó a cabo en el extracto enzimático.

6.7.1 Perfil de temperatura

Se determinó el perfil de temperatura de la proteína recombinante LipE y CalB. Para este ensayo se midió la actividad a diferentes temperaturas, probando un intervalo de temperaturas de 20 a 70°C. Dicho perfil se muestra en la figura 25.

Como es de esperar, para ambas enzimas se observa que la actividad catalítica se incrementa conforme aumenta la temperatura de reacción, hasta llegar al óptimo, que en el caso de LipE es de 40°C y en el caso de CalB es de 50°C. Estos ensayos se realizaron a pH 8 debido a reportes anteriores que señalan ese valor como el óptimo de CalB.

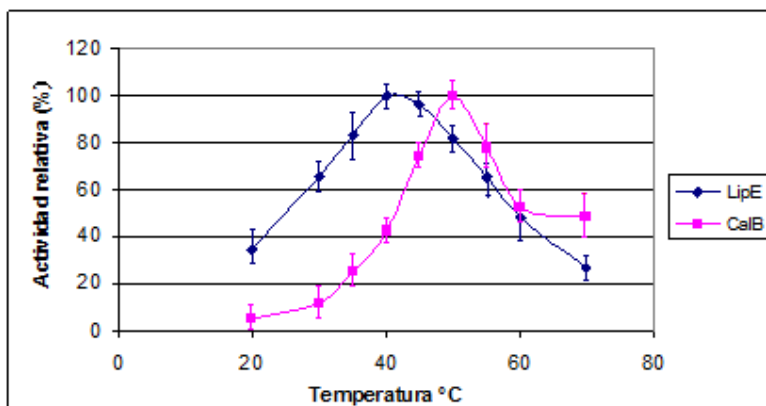


Figura 25. Efecto de la temperatura sobre la actividad de LipE y CalB en el sistema de *E. coli* origami DE3 utilizando el plásmido pCold medidas a pH 8.

Una observación importante radica en que los perfiles son distintos, sugiriendo que LipE es más activa a temperaturas bajas que CalB y tiene en general un espectro más amplio de actividad con respecto a la temperatura.

Un aspecto a comentar es que, en el caso de CalB, existe una aparente estabilización del efecto de la temperatura en la actividad entre 60 y 70°C, sin embargo, a esas temperaturas se dificulta la medición de la actividad, aunado a esto, este fenómeno también podría deberse a que la proteína no se encuentra pura y los otros componentes presentes en la preparación podrían estar estabilizando a CalB. Lo anterior sugiere que CalB podría tener un espectro un poco diferente que el que se muestra en la figura 23, lo cual concuerda con los datos reportados para CalB en estado puro.

6.7.2 Perfil de pH

Con el objetivo de comparar ambas enzimas en cuanto a su pH óptimo y su perfil en general, se midió actividad a diferentes pHs (figura 26). Esta actividad fue medida a la temperatura óptima encontrada para cada enzima, la cual fue 40 y 50°C para LipE y CalB respectivamente.

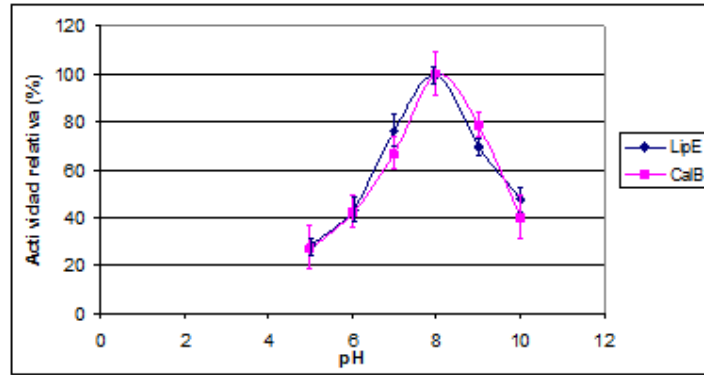


Figura 26. Perfil de pH de las proteínas recombinantes LipE y CalB en el sistema de expresión de *E. coli* Origami DE3 utilizando el plásmido pColdI y pCoprIII medida a 40 y 50°C respectivamente.

En la figura 26 se puede apreciar que el pH óptimo para ambas enzimas es de 8, lo que concuerda con los datos reportados por Novozymes para CalB y para las lipasas en general (Novozymes, Suen *et al*; 2004). También se observa la similitud en todo el perfil para ambas enzimas.

La similitud en los resultados de los ensayos tanto de temperatura como de pH óptimos para las enzimas recombinantes nos permiten sugerir que LipE podría ser utilizada en la mayoría de los procesos industriales que se llevan a cabo con CalB. Para explorar esta posibilidad más a detalle, se continuó con la caracterización de LipE evaluando su termoestabilidad.

6.7.3 Termoestabilidad

Los resultados de la termoestabilidad de las enzimas CalB y LipE se muestran en las figuras 27 y 28. Estos ensayos se hicieron con la finalidad de caracterizar y comparar ambas enzimas heterólogas en cuanto a su estabilidad a la temperatura y conocer su tiempo de vida media.

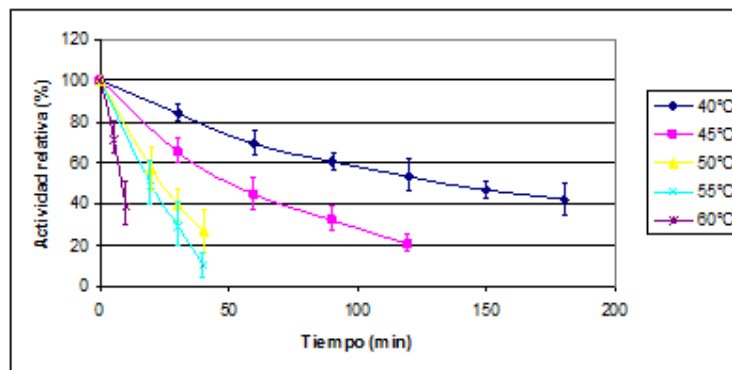


Figura 27. Termoestabilidad de LipE a diferentes temperaturas medida a pH 8

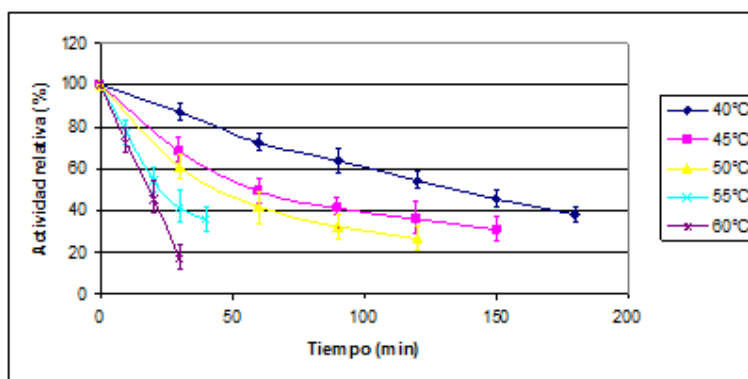


Figura 28. Termoestabilidad de CalB a diferentes temperaturas medida a pH 8

En las figuras 27 y 28 se muestra la cinética de inactivación a un pH de 8, con el fin de hacer una comparación más precisa sobre la estabilidad de ambas enzimas. Estos resultados se resumen en la tabla 19.

Tabla 19. Tiempo de vida media de las enzimas LipE y CalB a diferentes temperaturas.

Temperatura	LipE $t_{1/2}$ (min)	CalB $t_{1/2}$ (min)
40	144.37	128.33
45	54.14	91.18
50	21.72	63
55	12.93	25.86
60	7.38	11.91

En la tabla 19 se puede observar, que en general, CalB es más termoestable que LipE en términos del tiempo de vida media a diferentes temperaturas, Estos resultados coinciden con los reportados por Suen *et al* (2004), quienes reportan un tiempo de vida media de CalB de 2 horas a 40°C. Sin embargo, también queda manifiesto que a su temperatura óptima, LipE es un poco más estable que CalB lo cual podría tener una repercusión positiva en cuanto a los procesos aplicados de LipE. Como ejemplo de lo anterior podemos decir que la temperatura a la cual CalB se utiliza para la síntesis de ésteres es entre 40 y 45°C, caso en el cual LipE tendría una ventaja en cuanto a su estabilidad con respecto a CalB.

6.7.4 Determinación de la energía de activación y desactivación de las proteínas heterólogas

A partir de los datos de actividad en función de la temperatura se determinó la energía de activación y desactivación de las proteínas LipE y CalB. Esas determinaciones se hicieron aplicando la ecuación de Arrhenius.

La energía de activación de una reacción es la energía que necesitan los reactivos para formar el compuesto activado, es decir, la barrera de energía que han de salvar las moléculas para que se produzca la reacción, la cual disminuye cuando en la reacción se encuentra un catalizador. Este dato puede calcularse mediante la pendiente de la línea que se obtiene al graficar la ecuación de Arrhenius en su forma logarítmica, es decir, $\ln k = \ln A_0 - E_a/RT$ (Laidler y Bunting; 1973). Como dato adicional, también se calculó la energía de desactivación. Los resultados se pueden apreciar en las figuras 29 y 30.

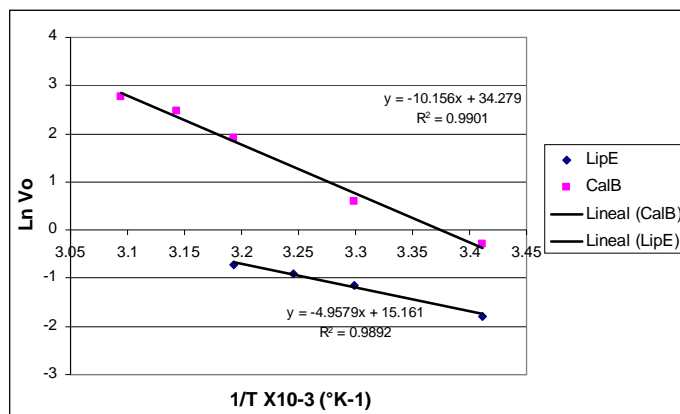


Figura 29. Energía de activación de las enzimas heterólogas LipE y CalB

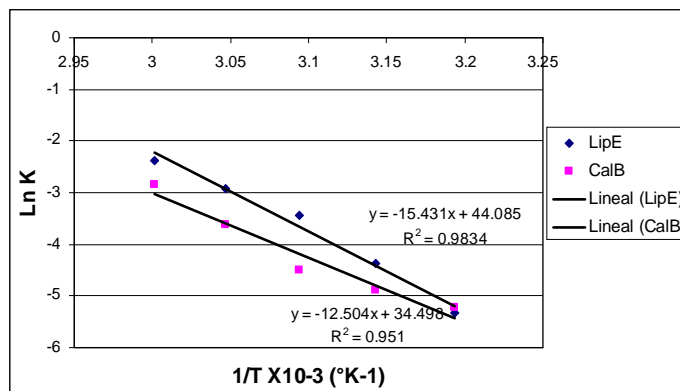


Figura 30. Energía de desactivación de las enzimas heterólogas LipE y CalB

Con base en las actividades obtenidas de las enzimas LipE y CalB en el intervalo de temperaturas de 20 a 50 °C, se obtuvo una energía de activación (E_a) de 14.6 y 29.9 cal/mol respectivamente para la reacción catalizada sobre pNPP, lo que sugiere una mayor influencia de la temperatura en la velocidad de reacción para el caso de CalB.

En la tabla 20 se indican varios valores de energías de activación de diversas lipasas; como se puede apreciar, estos datos varían considerablemente. Sin

embargo, los valores obtenidos tanto para LipE como para CalB se encuentran dentro del intervalo típico para este tipo de enzimas.

Como dato adicional y tomando en cuenta la pérdida de actividad con respecto al tiempo de incubación a diferentes temperaturas (40 a 60°C), se obtuvo una energía de desactivación de 45.4 y 36.8 cal/mol de LipE y CalB respectivamente. Tanto estos datos como el perfil que se observa en la figura 27 son muy similares en ambas enzimas. Ambas determinaciones, tanto energía de activación como de desactivación, deben verificarse con la proteína pura. Sin embargo, hay una mayor susceptibilidad de LipE a la temperatura dada la mayor energía de desactivación tal como se observa en los resultados experimentales (tiempo de vida media).

Tabla 20. Energía de activación reportada para diversas lipasas activas

Organismo	Temp. (°C)	pH	Ea (cal/mol)	referencia
<i>Euphausia superba</i>	40	9	24.7	-
<i>Pseudomonas sp</i>	45	8	11.2	Choo <i>et al</i> 1998
<i>Pseudomonas putida</i>	40	7.5	17.4	Hasona <i>et al</i> 2002
<i>Acinetobacter sp.</i>	45	8	9	Suzuki <i>et al</i> 2002
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	28	8.5	8.6	Oh <i>et al</i> 1999
<i>Propionibacterium shermanii</i>	47	7.2	8.1	Oterholm <i>et al</i> 1970
<i>Candida antarctica</i> CalB (pura)	50	8	17.42*	Este trabajo
<i>Ustilago maydis</i>	40	8	14.6**	Este trabajo
<i>Candida antarctica</i> CalB	50	8	29.9**	Este trabajo

*Enzima comercial en estado soluble

**este valor corresponde a la energía de activación en el extracto celular

6.7.5 Caracterización enzimática

Con el objetivo de conocer el comportamiento cinético de la enzima LipE y CalB utilizando pNPP como sustrato modelo de la hidrólisis de ácidos grasos, se realizaron ensayos de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato. Estos resultados se muestran en las figuras 31 y 32.

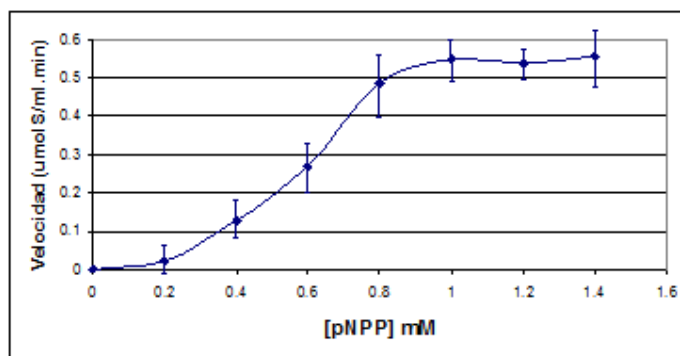


Figura 31. Efecto de la concentración del sustrato en la enzima heteróloga LipE medida a 40°C y pH 8 con una concentración proteica total de 1.6 mg/mL

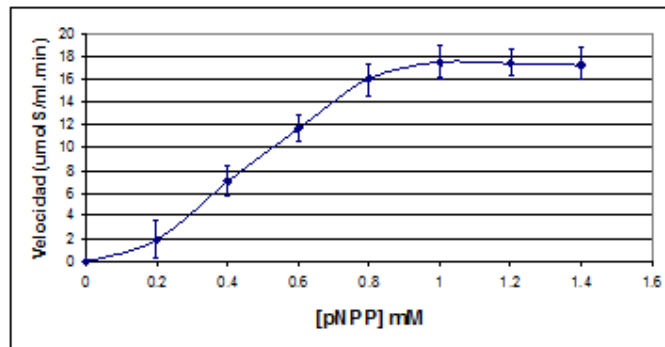


Figura 32. Efecto de la concentración del sustrato en la enzima heteróloga CalB medida a 40°C y pH 8 con una concentración proteica total de 1.6 mg/mL

Se encontró un comportamiento lineal antes de llegar a un valor de saturación como se aprecia en las figuras 31 y 32, alcanzándose una velocidad máxima de 0.55 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ y 17.3 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ a partir de una concentración de 1 mM de pNPP para LipE y CalB respectivamente.

Con estos resultados, no fue posible determinar las constantes cinéticas K_m y K_{cat} ya que no obedecen el modelo de Michaelis Menten. Este comportamiento cinético atípico de las enzimas se puede deber a múltiples factores que incluyen problemas difusionales en la reacción, el efecto de las altas concentraciones de Tritón X-100 en la reacción (4%), el cual se utiliza para solubilizar el sustrato en el medio acuoso de la reacción para así obtener una solución translúcida, y el hecho de que el pNPP por su naturaleza no sea un sustrato adecuado de la enzima. Se requiere probar con sustratos que generen una interfase en aceite-agua con el fin de estudiar el comportamiento de la enzima con un sustrato natural insoluble como por ejemplo el tributirín el cual es ampliamente utilizado en la identificación de caracterización de lipasas (Jaeger *et al*; 1999, Forjan *et al*; 2000).

6.7.6 Hidrólisis de la Capsaicina

Debido a reportes prebios de Torres-Gavilán y colaboradores en el 2006, en donde se demuestra que CalB, a diferencia de otras lipasas estudiadas (tabla 4), es capaz de hidrolizar a la capsaicina, la cual es una amida con características pungentes y de gran importancia en la industria alimentaria y farmacéutica, con conversiones superiores al 90% generando vainillilamina y ácido 2 metil nonanoneico (figura 6A), se decidió poner a prueba la capacidad de LipE de para hidrolizar el enlace amida utilizando este sistema. Las reacciones se llevaron a cabo en un medio acuoso, utilizando el extracto enzimático soluble de LipE y CalB. Las

muestras se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como controles positivos las versiones comerciales tanto soluble como inmovilizada de CalB (Novozime 525 y Novozym 435 respectivamente). Cabe hacer mención que todas las reacciones se hicieron a 1 U/mL de cada enzima, excepto las enzimas comerciales con 1000 U/mL como control positivo ya que se retomaron las experiencias previas en nuestro grupo de trabajo en las que a esta actividad enzimática se observa producto de reacción.

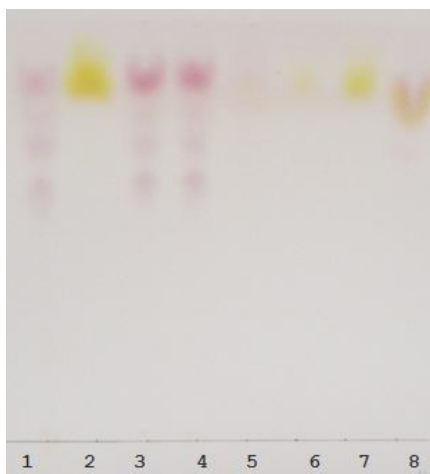


Figura 33. Cromatografía en capa fina de las reacciones de hidrólisis de la capsaicina a 45°C y 168 h de reacción. 1) Tiempo 0, 2) Estándar: Vainillilamina, 3) LipE, 4) CalB, 5) Novozime 525, 6) Novozime 435, 7) Novozym 435 (1000 U/mL) 8) Novozym 525 (1000 U/mL).

Las reacciones se llevaron a cabo en viales de 10 mL con 5 mL de mezcla de reacción a 45°C con agitación magnética en un sistema bifásico.

Los resultados se muestran en la CCF de la figura 33. No fue posible observar con 1 U/mL y mediante esta técnica, la formación de producto de reacción (vainillilamina) con LipE y CalB expresadas en nuestro sistema (carriles 3, 4); es sólo con Novozym 435 (CalB inmovilizada) donde la reacción muestra una clara banda amarilla al tiempo de retención de la vainillilamina. Además se aprecia que en el carril 5 con Novozym 525 (CalB soluble) tampoco se obtiene hidrólisis de la capsaicina a pesar de que sí se observa la formación de producto con 1000 unidades más de esta enzima (carril 8), lo que nos hace suponer que necesitamos agregar más enzima a la mezcla de reacción. En este ensayo nos limitamos a 1 U/mL debido a que los niveles de expresión de LipE son bajos.

En estas condiciones no fue posible evaluar si LipE tiene la capacidad de hidrolizar amidas por lo que se necesita hacer más eficiente la expresión enzimática de LipE para poner a prueba su capacidad para hidrolizar amidas en estas condiciones.

7.- CONCLUSIONES

- Mediante análisis comparativo de homología, estructura secundaria y modelamiento, se logró caracterizar *in silico* una proteína de *Ustilago maydis* (LipE) con características estructurales similares a la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) encontrando que las láminas β y las α hélices se encuentran conservadas al igual que los aminoácidos de la triada catalítica y los que son importantes para estabilizar la estructura, tanto de los sustratos como de la misma enzima, lo cual sugiere que el mecanismo de reacción en ambas enzimas es similar.
- El gen de LipE fue aislado a partir del RNA del microorganismo *Ustilago maydis* crecido en medio PDB con una mezcla de aceite de oliva y coco, empleando oligonucleóticos conservados.
- El gen LipE fue clonado y expresado heterológamente en forma soluble en *E. coli* en el vector pColdI. Se obtuvo una enzima activa con una actividad tipo lipasa de 0.55 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$ en el extracto enzimático.
- LipE y CalB presentan temperaturas óptimas diferentes (40 y 50°C respectivamente), lo que indica que las pocas diferencias estructurales entre ambas enzimas son suficientes para cambiar esta característica bioquímica estrechamente relacionada con su estabilidad.
- El pH óptimo, así como el perfil de pH de las enzimas LipE y CalB expresadas en este sistema fue similar con una actividad máxima a pH 8 medida a la temperatura óptima obtenida para LipE y CalB.
- El perfil de temperatura y los datos de termoestabilidad indica que CalB en general tiene un tiempo de vida medio mayor que LipE en las temperaturas probadas.
- Las energías de activación calculadas para ambas enzimas recombinantes sugieren una mayor influencia de la temperatura en la velocidad de reacción para el caso de CalB.
- Se encontró una relación lineal entre la concentración del sustrato y la velocidad de reacción para ambas enzimas recombinantes hasta alcanzar un valor de saturación a partir del cual la velocidad se mantuvo independiente de la concentración.
- No fue posible observar hidrólisis del enlace amida de la capsaicina por LipE y CalB recombinantes, sin embargo, no se descarta esta posibilidad ya que esto puede deberse a la baja actividad obtenida en el medio de reacción como consecuencia de las limitantes del sistema de expresión.

8.- PERSPECTIVAS

- Optimizar el método de expresión de la enzima LipE en forma soluble y activa en *E. coli*.
- Probar y optimizar otros sistemas de expresión para la enzima LipE de forma soluble y extracelular, por ejemplo *Pichia pastoris* ó *Yarrowia lipolítica*.
- Determinar si la proteína posee la capacidad de llevar a cabo reacciones características de CalB como la síntesis e hidrólisis de amidas, resolución de mezclas racémicas y adiciones de Michael.
- Como se ha hecho con CalB, Implementar estrategias de ingeniería de proteínas en LipE con el fin de modificar la actividad y las propiedades bioquímicas y cinéticas así como la especificidad de LipE.

ABREVIATURAS

2M2B 2-metil-2-butanol

C. antartica *Candida antarctica*

CaIB Lipasa B de *Candida antarctica*

CCF cromatografía en capa fina

cDNA Ácido desoxiribonucleico complementario

CI cuerpos de inclusión

DEPC Dietil pirocarbonato

DMSO dimetil sulfóxido

DNA Ácido desoxiribonucleico

DTT ditionitrosol

E_a energía de activación

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

GnHCl Cloruro de guanidina

IPTG Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosido

LipE Lipasa de *Ustilago maidis*

MOPS Ácido mofolino propano sulfónico

mRNA Ácido ribonucleico mensajero

PCR reacción en cadena de la polimerasa

pNPP Para nitro fenil palmitato

R_f frente relativo

RNA Ácido ribonucleico

rpm revoluciones por minuto

RT Reverso transcriptasa

SDS Dodecil sulfato de sodio

t_{1/2} tiempo de vida media

U. maydis *Ustilago maydis*

9.- BIBLIOGRAFÍA.

- Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. (1979). *Introductory Mycology*. 3^a ed. John Wiley Song, New York, 632 p.
- Ashok P, Sailas B, Soccol C, Nigam P, Krieger N, Soccol V. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl. Biochem.* 29:119-131.
- Bajpai P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Progr*; 15: 147-157.
- Banuet F. (2002). Pathogenic development in *Ustilago maydis* a progression of morphological transitions that results in tumor formation and teliospore production. *Molecular biology of fungal development. Marcel Dekker, Inc.* 14: 349-398.
- Bertinotti, A. Carrea, G, Ottolina, G. Riva, S. (1994). Regioselective esterification of polyhydroxylated steroids by *Candida Antarctica* lipase. *Tetrahedron* 50, 13165-13172.
- Blank K, Morfill J, Gump H, Gaub HE (2006). Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 125:474-483
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Castillo,E. Pezzotti,F. Navarro,A. Lopez-Munguia,A. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach *J Biotechnol* 102:251-259.
- Castillo,E. Torres-Gavilan,A. Severiano,P. Arturo,N. Lopez-Munguia,A. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. *Food Chemistry* 100:1202-1208.
- Choo D, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N (1998) A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol* 64: 486-491

- Christensen, J. J. (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Monograph No. 2. The American Phytopathological Society 41 p.
- Current Protocols in Protein Science (2007). Unidad 6, 6.3.3-6.3.4. Purification of Recombinant Proteins
- Davis, G. N. (1936). Some of the factors influencing the infection and pathogenicity of *Ustilago zaeae* (Beckm) Unger on *Zea mays* L. Iowa Agriculture Experimental Research Bulletin. 199:247-278.
- De la Isla, B. L. (1984). *Fitopatología*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México 377 p.
- Durán, R. (1973). Ustilaginales. En: The Fungi – An Advanced Treatise, 4B, Academic Press, New York, p. 281-299.
- Ergan, F. Trani, M. Andre, G. (1991). Use of lipases in multiphasic systems solely composed of substrates. J Am Oil Chem Soc 68:412-417.
- Fisher, G. W. and Holton, C. S. (1957). Biology and control of the smut fungi. Ronald Press, New York, 622 p.
- Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen SB (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82: 1033–1041.
- Estrada,G. Garcia,B.I. Schiavon,E. Ortiz,E. Cestele,S. Wanke,E. Possani,L.D. Corzo,G. (2007). Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CssII: Heterologous expression and proper folding in vitro *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1770 1161-1168.
- Gotor-Fernandez V, Busto E, Gotor V. (2006). Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348 7:797.
- Griffin, D. (1981). Fungal Physiology. John Wiley and sons, New York, 387 p.

- Gupta N, Rathi P, Gupta R (2002) Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal Biochem* 311:98–99
- Hames BD, Hooper NM, Houghton JD (1997). Aminoacids. In: *Instant Notes in Biochemistry*. 1st edition. Ed. Hames BD. BIOS Scientific Publisher. Leeds. U.K.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:235-251.
- Hasona A, York SW, Yomano LP, Ingram LO, Shanmugam KT. (2002). Decreasing the level of ethyl acetate in ethanolic fermentation broths of *Escherichia coli* KO11 by expression of *Pseudomonas putida* estZ esterase. *Appl Environ Microbiol*. Ju; 68:2651-9.
- Ito, S; Kobayashi T; Ara, K; Ozaky, K; Kawai, S, Hatada, Y. (1998). Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *Extremophiles*. 2:185-190.
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315–351.
- Katsivela E.; Kleppe F.; Lang S.; Wagner F. (1995). *Ustilago maydis* lipase I. Hydrolysis and ester-synthesis activities of crude enzyme preparation. *Enzyme and Microbial Technology* 17 739-745.
- Kealey, K. S. y Kosikowski, F. V. (1981). Corn smut as a food source-perspectives on biology, composition, and nutrition. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 15:321-350.
- Klose, J; de Sa, M.M; and Kronstad J.W. (2004). Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*, *Mol Microbiol* 52:823–835.
- Laemmli. UK, (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- Laidler, k. J. and bunting, P. S. (1973). *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. 2nd edn Oxford: Clarendon Press.

- Larsen M, Bornscheuer U , Hult K. (2008). Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein Expression and Purification*, Vol. 62:90-97
- Liu, D; Schmid R; Rusnak M. (2006). Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm—a screening system for a frequently used biocatalyst. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:1024-1032.
- Morris, F; Gotor, V. (1993). Useful and versatile procedure for the acylation of nucleosides through an enzymatic reaction. *J. Org. Chem.* 58, 653-660.
- Oh B, Kim H, Lee J, Kang S, and Oh T. (1999), *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* 179 385–392.
- Ollis, D.L., et al., & Goldman, A. (1992). The a/p hydrolase fold. *Protein fflg.* 5: 197-211.
- Oterholm A, Ordal ZJ, Witter LD. (1970). Purification and properties of a glycerol ester hydrolase (lipase) from *Propionibacterium shermanii*. *Appl Microbiol.* Jul 20:16–22.
- Pataky, J. K. (1991). Production of cuitlacoche (*Ustilago maydis* DS Corda) on sweet corn. *HortScience.* 26:1374-1377.
- Patel MT, Nagsranja R & Kirala. (1998). lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: A review. *Chem. Eng. Comm.* 153: 365-404.
- Patkar, S. A; Bjorking, F; Zundel, M. (1993). Purification of two lipases from *Candida Antarctica* and their inhibition by various inhibitors, *ind. J. Chem.* 32:76-80.
- Pleiss, J; Fischer, M; Thiele, C and Schmid, R. D. (2000). Lipase Engineering Database, Understanding and exploiting sequence-structure function relationships. *J. Mol. Catal. B-enzym.* 10:491-508.
- Reyes-Duarte,D. Castillo,E. Martinez,R. Lopez-Munguia,A. (2002). Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters* 24 2057-2061.

- Sarda, L; and P. Desnuelle. (1958). Action of pancreatic lipase on emulsified esters. *Biochim. Biophys. Acta.* 30:513-521.
- Schimid, R. D. and Verguer, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. ed. Engl;* 37: 1608-1633.
- Shurtleff, M. C. (1980). Compendium of corn diseases. 2a ed. Shurtleff, M. C. (Ed). The American Phytopathology Society, p. 38-40.
- Singh R, Gupta N, Goswami VK, Gupta R (2006) A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:679–682
- Snellman EA, Sullivan ER, Colwell RR. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *FEBS J*; 269 5771–9.
- Suen, W.C., Zhang, N.Y., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A. (2004). Improved activity and thermostability of *Candida Antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 133–140.
- Suzuki T.; Nakayama T.; Choo D.W.; Hirano Y.; Kurihara T.; Nishino T.; Esaki N (2002). Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1. *Protein Expression and Purification*, Vol. 30: 171-178.
- Torres-Gavilan,A. Castillo,E. Lopez-Munguia,A. (2006). The amidase activity of *Candida antarctica* lipase B is dependent on specific structural features of the substrates *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 41 136-140.
- Tsumoto, K.; Ejima, D.; Kumagai, I.; Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression Purif.* 28, 1-8.
- Turner, N. (2004). Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions. Review. *Curr Opin Chem Biol.* Vol. 8:114-119.
- Uppenberg, J; Öhrner, N; Norin, M; Hult, K; Kleywegt, G. J; Patkar, S; Weaagen, V; Anthonsen, T; and Jones, T. A. (1995). Crystallographic and molecular-

modelling studies of lipase B from *Candida Antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* 34: 16838-16851.

Vínculos:

- Lipase engineering database <http://www.led.uni-stuttgart.de>
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>