



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS DE  
BACILLUS PUMILUS GMA1 CON POTENCIAL EN  
BIOCATÁLISIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

HUGO AYALA ESQUIVEL



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** Raúl Genaro Aguilar Caballero

**VOCAL:**               **Profesor:** J. Eleazar Martínez Barajas

**SECRETARIO:**       **Profesor:** Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravia

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor:** Laura Carmona Salazar

**2° SUPLENTE:**       **Profesor:** Sandra Paola Sánchez Rodríguez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 312. CONJUNTO E. DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**   **Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravia**  
\_\_\_\_\_  
(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO:** **Dra. Carolina Peña Montes**  
\_\_\_\_\_  
(nombre y firma)

**SUSTENTANTE:**       **Ayala Esquivel Hugo**  
\_\_\_\_\_  
(nombre y firma)



## Agradecimientos

My mama **told me** when I was **young**  
**We** are **all** born **superstars**



**T**odo parecía eterno y de repente hoy encuentro que ya llegó el final de una etapa, se fue el momento pero la cantidad de horas que pasaron, me dejan la más grande satisfacción que hasta ahora he conocido. Sé que ya no habrá un momento igual, pero hoy digo adiós y no tengo miedo.

Hoy doy gracias a la UNAM por haberme dado la mejor preparación académica y por promover los valores que hoy en día me ayudan a crecer como profesionista y persona. Facultad de química y ENP 5 les doy las gracias por haberme dado las mejores experiencias de mi vida y por proporcionarme las herramientas necesarias para enfrentar las pruebas que la vida va poniendo en el camino.

Este proyecto no hubiera sido posible sin el apoyo del PAPIIT IN2148092, le dedico este trabajo, muchas gracias.

Quiero darle las gracias antes que a nadie, a Dios, por ser esa fuerza que me impulsa cada día a lograr todo lo que me propongo, por permitirme estar con las personas que más quiero y por dejarme ser así (There's nothing wrong with loving who you are... god makes no mistakes, cause HE made you PERFECT).

Este trabajo, la carrera, el inicio de la maestría y por todo lo que soy, se los dedico Mamá y Papá, porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible, sí pudiera escoger mi vida otra vez, la viviría con ustedes de nuevo. No sé si fue la suerte, pero es mi bendición tenerlos. Te doy las gracias mami por ser hasta el día de hoy el mejor ejemplo para mí, sé que si pudieras pelearías mis batallas tu por mí, vences la distancia y es tu amor lo que jamás se va de mí, sabes un poco de todo, me proteges me haces sonreír, somos tan iguales tan distintos pero tú me amas así...por todo esto quiero que sepas que todo ese esfuerzo valió la pena. Papi, tal vez ayer trataba de entender muchas cosas, tal vez, falle tratando de cambiar para poder llegar a ti, pero quiero que sepas que te quiero mucho y que también eres mi ejemplo.

Gracias hermanos, tía, abue & familia no se que hubiera hecho sin su apoyo. Armando, Diego y Juli, ustedes saben que los quiero mucho y que siempre están conmigo (I can feel your halo). Tía gracias por TODO, por estar siempre en el camino que elegí, en cualquier dirección en la que miré siempre tendré tu abrazo. Abue nunca tuve la menor duda de que estando contigo, bajo tu luz, tendría un ángel a mi lado.

Dra. Amelia Farrés, hoy sé que algo inalcanzable puede ser realidad si uno mismo lo cree, gracias por todas las palabras, el conocimiento y las experiencias que compartió conmigo, de verdad que con usted he conocido a un gran ser humano. Le quiero dar las gracias por enseñarme que soy lo suficientemente fuerte para seguir adelante y que es momento de actuar sin tanto miedo.





Dra. Carolina Peña (Caro) que te puedo decir, creo que todo lo hemos hablado jaja. Eres una de las personas más increíbles que jamás haya conocido. Te admiro, respeto y quiero. Todavía me impresiono con tu paciencia y dedicación. Más allá del apoyo técnico y/o conocimientos, quiero decirte que jamás lo hubiera logrado sin todo lo que me enseñaste. Gracias por la confianza, por tu amistad y por enseñarme que las buenas personas aún existen.

Maestro Augusto Gonzales yo le dedico este trabajo porque aprendí mucho con usted. Gracias por transmitirme su conocimiento, por la confianza y dedicación al proyecto.

Gracias a todos mis amigos por confiar en mí, quererme, escucharme y compartir momentos inolvidables: Laura, Vero G., Luisa, Paola, Alan, Melissa, Ximena, Aline, Olivia, Gaby, Querena, Sandra, Karina, Vale, Monse, por mencionar algunos. Con mención especial jajajaja te doy las gracias Laura Villarruel no solo por ayudarme moralmente en el lab, si no por la equipo de casi un poco más de la mitad de la carrera y obviamente por tu amistad, la verdad encontrar gente con la que te entiendes es muy difícil y gracias ti la carrera se hizo más fácil. Gracias a todos.

Agradezco a todos mis maestros desde la primaria hasta la universidad. Yo no los he olvidado y sé que también por ustedes, he logrado ser quien soy ahora. Quiero especialmente darte las gracias Vero G. por haber sido mi maestra y que a pesar de que eso fue hace tiempo, aún me sigues dando lecciones jajajaja, aprendí mucho contigo.

Maestra Rosa Luz Cornejo le dedico este trabajo y le doy las gracias por todo el conocimiento que compartió conmigo, es una de las mejores maestras que he tenido. Gracias por creer en mí.

Finalmente les doy las gracias y les dedico este trabajo a las maestras María Luisa García, Lolita, Isaura, Tere, Caro y Gina, por creer en mí y por compartir su experiencia, conocimiento y valores. Son mi más grande ejemplo a seguir. ¡Las quiero mucho!



## Índice General

|   |    |
|---|----|
| <b>Resumen</b>  | 4  |
| <b>Capítulo I. Introducción</b>                                       | 7  |
| 1.1 Justificación   | 8  |
| <b>Capítulo II. Objetivos</b>   |    |
| 2.1 Objetivos generales   | 10 |
| 2.2 Objetivos particulares  | 10 |
| <b>Capítulo III. Marco teórico</b>                                    |    |
| <b>3.1 Marco teórico. General</b>                                     | 11 |
| <b>3.1.1 Proteínas</b>  |    |
| 3.1.2 Estructura y características                                    | 12 |
| 3.1.3 Geometría de la unión peptídica                                 | 13 |
| 3.1.4 Clasificación y función   | 13 |
| <b>3.1.2. Enzimas</b>   |    |
| 3.1.2.2 Sitio catalítico o sitio activo                               | 15 |
| 3.1.2.3 Tipos de enzimas. Clasificación                               | 16 |
| 3.1.2.4 Hidrolasas de éster carboxílicos                              | 16 |
| 3.1.2.5 $\alpha/\beta$ Hidrolasas. Estructura                         | 17 |
| 3.1.2.6 Clasificación de las carboxilesterasas                        | 18 |
| <b>3.1.3 Actividad enzimática</b>                                     |    |
| 3.1.3.1 Modelos de reconocimiento enzima-sustrato Fisher y Koshland   | 21 |
| 3.1.3.2 Reacción por catálisis enzimática. Mecanismos                 | 22 |
| 3.1.3.3 Actividad enzimática. Determinación                           | 23 |
| <b>3.1.4 Fuentes de enzimas</b>                                       |    |
| 3.1.4.1 Enzimas de origen microbiano. Importancia                     | 25 |
| 3.1.4.2 El género <i>Bacillus</i> . Características                   | 25 |
| 3.1.4.3 Carboxilesterasas del género <i>Bacillus</i>                  | 26 |
| <b>3.1.5 Lipasas y carboxilesterasas</b>                              |    |
| 3.1.5.1 Aplicaciones de lipasas y esterasas                           | 28 |
| 3.1.5.2 Mecanismo enzimático  | 29 |
| 3.1.5.3 Métodos para detección y caracterización de lipasas esterasas | 31 |

|   |  |    |
|---|--|----|
| <b>3.1.6</b>                            | <b>Actividad promiscua de carboxilesterasa</b>                               | 34 |
| <b>3.1.7</b>                            | <b>Purificación de enzimas</b>   |    |
| 3.1.7.1                                 | Acondicionamiento de la muestra  | 35 |
| 3.1.7.2                                 | Métodos de purificación. General   | 36 |
| 3.1.7.3                                 | Cromatografía por filtración en gel  | 39 |
| 3.1.7.4                                 | Cromatografía de intercambio iónico  | 39 |
| 3.1.7.5                                 | Electroforesis de elución  | 40 |
| <b>3.2</b>                              | <b>Antecedentes en el grupo de trabajo</b>                                   |    |
| 3.2.1                                   | <i>Bacillus pumilus</i> GMA1. Características                                | 41 |
| 3.2.2                                   | Optimización del medio de cultivo  | 42 |
| 3.2.3                                   | Métodos de purificación en el grupo de trabajo                               | 42 |
| 3.2.4                                   | Caracterización de la enzima semi-pura                                       | 43 |
| 3.2.5                                   | Ensayos de biocatálisis de la enzima semipura                                | 43 |
| 3.2.6                                   | Identificación de la enzima  | 43 |
| <b>Capítulo IV. Diseño experimental</b> |  |    |
| <b>4.1</b>                              | <b>Material y reactivos</b>  | 44 |
| <b>4.2</b>                              | <b>Metodología</b>   | 46 |
| 4.2.1                                   | Cuantificación de proteína por el método de Bradford.<br>Microplaca          | 47 |
| 4.2.2                                   | Cuantificación de actividad enzimática cualitativa.<br>Microplaca            | 47 |
| 4.2.3                                   | Cuantificación de actividad enzimática cuantitativa.<br>Microplaca           | 48 |
| 4.2.3.1                                 | Determinación de actividad de esterasa con <i>p</i> -NFA                     | 48 |
| 4.2.3.2                                 | Determinación de actividad de esterasa con <i>p</i> -NFL                     | 48 |
| 4.2.3.3                                 | Adición de iones divalentes  | 49 |
| 4.2.4                                   | Electroforesis   | 49 |
| 4.2.4.1                                 | Preparación de geles de electroforesis. Geles<br>desnaturalizantes y Nativos | 49 |
| 4.2.4.2                                 | Precipitación con ácido tricloroacético.<br>Acondicionamiento                | 50 |
| 4.2.4.3                                 | Tinción con plata.<br>Máxima sensibilidad y rapidez                          | 50 |
| 4.2.4.4                                 | Renaturalización enzimática  | 50 |
| 4.2.4.5                                 | Revelado de actividad enzimática   | 51 |
| 4.2.5                                   | Purificación   |    |
| 4.2.5.1                                 | Acondicionamiento de la muestra  | 51 |
| 4.2.5.2                                 | Filtración en gel. Sephacryl S-300®  | 51 |
| 4.2.5.3                                 | Concentración con Amicón® de las fracciones elegidas                         | 52 |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 4.2.5.4                                   | Liofilización   | 52        |
| 4.2.5.5                                   | Electroforesis de elución. Prepcell   | 52        |
| 4.2.5.6                                   | Acondicionamiento de la muestra   | 53        |
| 4.2.5.7                                   | Concentración con Amicón® de las fracciones elegidas                          | 53        |
| 4.2.6                                     | Secuenciación   |           |
| 4.2.6.1                                   | Preparación de gel nativos para secuenciación                                 | 53        |
| 4.2.6.2                                   | Identificación de la proteína por espectrofotometría de masas                 | 54        |
| 4.2.7                                     | Peroxidasas. Ensayos de actividad   | 54        |
| 4.2.7.1                                   | Peroxidasas. Actividad cualitativa  | 54        |
| 4.2.7.2                                   | Peroxiredoxinas. Actividad cualitativa  | 55        |
| <b>Capítulo V. Análisis de resultados</b> |   |           |
| 5.1                                       | Extracto crudo. Actividad enzimática y perfil proteínico                      | 56        |
| 5.2                                       | Cromatografía de filtración en gel  | 58        |
| 5.3                                       | Ultrafiltración con Amicón de EC-FG   | 59        |
| 5.4                                       | Electroforesis de elución   | 60        |
| 5.5                                       | Monitoreo de actividad enzimática   | 67        |
| 5.5.1                                     | Monitoreo de actividad enzimática. Tabla                                      | 69        |
| 5.6                                       | Actividad enzimática residual. Eluatos  | 70        |
| 5.7                                       | Identificación  | 71        |
| 5.8                                       | Identificación por espectrometría de masas                                    | 72        |
| 5.9                                       | Peroxiredoxinas y promiscuidad de enzimas                                     | 73        |
| 5.10                                      | Identificación de la banda de alto peso molecular                             | 77        |
| <b>Capítulo VI. Conclusiones</b>          |   |           |
| <b>6.1</b>                                | <b>Conclusiones</b>   | <b>80</b> |
| <b>6.2</b>                                | <b>Perspectivas</b>   | <b>82</b> |
| <b>Capítulo VII. Bibliografía</b>         |   | <b>83</b> |
| <b>Capítulo VIII. Apéndices</b>           |   |           |
| 8.1                                       | Metodología. Curvas de calibración  | 92        |
| 8.2                                       | Ensayo cualitativo de actividad enzimática. Mecanismo                         | 94        |
| 8.3                                       | Caracterización de condiciones experimentales en la electroforesis de elución | 94        |
| 8.4                                       | Secuencia de enzima identificada  | 101       |

## Resumen

Las esterasas de ácidos carboxílicos son  $\alpha/\beta$ -hidrolasas que actúan sobre el enlace éster. Las esterasas se definen como enzimas que hidrolizan a los triglicéridos con cadenas cortas y sustratos solubles en agua, mientras que las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos de cadenas largas y prefieren sustratos insolubles en agua (Alberghina & Lotti, 2007).

Lipasas y esterasas son producidas por varias plantas, animales y microorganismos, lo que ofrece un rango amplio de enzimas en términos de propiedades bioquímicas y afinidad por sustrato, con aplicaciones biotecnológicas. Dentro de los géneros microbianos más usados comercialmente se encuentran los siguientes: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas*.

Este trabajo tiene como finalidad separar e identificar enzimas producidas por *Bacillus pumilus* GMA1 con actividades de interés para el área industrial de biocatálisis. Este microorganismo fue aislado de aguas termales mexicanas en la región de "Los Azufres", Michoacán. *Bacillus pumilus* GMA1. Se detectó actividad lipolítica en un extracto crudo, con máximos en 50°C y pH 10.5, (Bustos, 1995). Este extracto es capaz de catalizar diversas reacciones de interés, como la síntesis de ácido linoleico conjugado (Ruiz, 2008) y la lipofilización de flavonoides (Bermúdez, 2010).

En el genoma de *Bacillus* se encuentran codificadas varias lipasas y carboxilesterasas, la mayoría de bajo peso molecular. En el grupo de trabajo se ha detectado por técnicas zimográficas actividad de esterasa a 21 kDa. Tras un proceso de optimización de medio de cultivo en el que la actividad esterasa se incrementó, se detectó además una banda con actividad de esterasa de alto peso molecular. Ninguna banda se ha logrado purificar ni identificar para saber a cuál enzima con actividad lipolítica o de esterasa codificadas en el genoma corresponden. En este trabajo se usaron diversas metodologías de

purificación con el objeto de discriminar e identificar por secuenciación si estas enzimas corresponden a lipasas o esterases, o bien a otras con potencial catalítico producidas en medio optimizado por *Bacillus pumilus* GMA1

Los procesos de cromatografía de filtración en gel y de elución no permitieron la purificación a homogeneidad de la enzima, pero si el enriquecimiento de algunas bandas y obtener fracciones con mayor actividad de esterasa. Tras un procedimiento de concentración (100x) de esta fracción semipurificada, se detectaron a 3 bandas que presentaron actividad de esterasa por zimografía. Se procedió a su corte y envío a secuenciación por LC-MS/MS y se identificaron de la siguiente manera:

La banda de bajo peso molecular (20.6 kDa) corresponde a la secuencia de la Peroxiredoxina YkuU [*Bacillus pumilus* SAFR-032]. Cabe destacar que este resultado corresponde a otro obtenido previamente por el grupo de trabajo Peroxiredoxina YgaF [*Bacillus pumilus* SAFR-032] (Álvarez & Galindo, 2009).

Esta enzima está clasificada como una oxidoreductasa. Sin embargo, se observa que tiene la capacidad de hidrolizar ésteres carboxílicos en diversos ensayos cualitativos y cuantitativos, lo que indicaría que tiene actividad de esterasa y que, por lo tanto, puede considerarse una enzima promiscua.

En el caso de la la banda de alto peso molecular, los resultados no son concluyentes. Los péptidos identificados corresponden a: una poliribonucleotido-nucleotidil transferasa de ácidos nucleicos (75.1 kDa), que presenta homología a la enzima tanto de *Pseudomonas* como del genoma de *Bacillus pumilus*. Las diferencias en aminoácidos se pueden explicar por la heterogeneidad entre cepas. La actividad enzimática se debe corroborar. Otra proteína con la que presenta homogeneidad es una proteína que une sustratos a transportador ABC, así como con una subunidad alfa de la succinil coenzima A sintetasa. Estos resultados hablan de las limitaciones de

la técnica de elución de proteínas de los geles, puesto que al no estar puras pueden aparecer varias proteínas de pesos moleculares similares, incluso agregados. Por otra parte, se presenta también la posibilidad de actividades enzimáticas promiscuas, que en este caso no fueron exploradas.

Los resultados obtenidos ofrecen la posibilidad de emplear nuevas enzimas en biocatálisis. Los estudios de estructura de la proteína (peroxiredoxina YKU) su purificación a homogeneidad y su clonación permitirán explorar mejor el potencial biocatalítico de la misma. Asimismo, se deberán diseñar nuevos procesos de purificación que permitan separar las esterasas o lipasas codificadas en el genoma.

# Capítulo I

## Introducción

Las carboxilesterasas [EC 3.1.1.1] y lipasas [EC 3.1.1.3] son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster en ácidos carboxílicos y están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos (IUBMB, 2011). En el campo de la química, son de gran importancia en el área de química orgánica, ya que catalizan reacciones tales como esterificaciones, interesterificaciones y transesterificaciones.

Históricamente estas enzimas se han clasificado de acuerdo a su especificidad de sustrato. Se define como estererasas a las enzimas que hidrolizan ésteres con la adición de una molécula de agua. En general, una estererasa es específica, ya sea para el alcohol o el resto del sustrato ácido (hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos) (Jaeger, 1999).

Considerando que las carboxilesterasas preferentemente rompen los enlaces éster de ácidos grasos de cadena corta, las lipasas muestran un amplio rango de sustratos, más que las esterasas. Así, la lipasa es capaz de actuar sobre un sustrato insoluble, mientras las esterasas tienen preferencia por sustratos solubles en agua (Fojan, et. al, 2000). Por su hidrofobicidad, pueden formar agregados con facilidad.

Una posible limitación del uso de enzimas es su inestabilidad a temperatura, pH o a los propios disolventes, que se traduce en una baja actividad o bien la reducción de la vida media (Morrison & Boyd, 1990). Para evitar este inconveniente se aíslan diferentes enzimas de origen microbiano, en especial, los que se adaptan a ambientes extremos (termófilos, acidófilos, alcalófilos etc.).

La mayoría de sistemas de purificación de enzimas consisten en estrategias de varios pasos. Sin embargo, por lo general se usan procedimientos de pre-purificación que conducen a la recuperación secundaria de la enzima, para después llevar a cabo pasos posteriores de purificación. Una combinación de estos procedimientos con los métodos tradicionales de cromatografía permiten una recuperación rápida y alta de enzimas (Saxena et. al, 2003).

## **1.1 Justificación**

---

Las enzimas de *Bacillus pumilus* GMA1 son de gran interés debido a que se trata de un microorganismo termófilo, característica importante para la incorporación en procesos de la industria alimenticia, química y farmacéutica, pues se considera que las enzimas provenientes de microorganismos extremófilos serán capaces de resistir condiciones de operación extremos y mostrar mayor estabilidad. Se ha demostrado que el extracto es capaz de

catalizar reacciones de interés en industria farmacéutica y de alimentos, como son la lipofilización de flavonoides y la síntesis de ácido linoleico conjugado. Sin embargo, no se tiene la certeza de qué enzima lleva a cabo estas reacciones. Por lo tanto, se plantea un proceso de purificación, separación e identificación de las enzimas presentes. La actividad enzimática buscada es la de esterasa y/o lipasa, por su amplia gama de aplicaciones en biocatálisis.

## Capítulo II

### Objetivos

#### 2.1 Objetivos generales

- Separar por diferentes técnicas de purificación de proteínas, las enzimas con actividad de carboxilesterasa producidas por *Bacillus pumilus* GMA1 en un medio optimizado
- Identificar proteínas con actividad sobre ésteres de ácidos carboxílicos

#### 2.2 Objetivos particulares

- Evaluación de métodos de purificación para la separación de proteínas con actividad de esterasa
- Purificación de las enzimas con actividad sobre sustratos que presentan ésteres de ácidos carboxílicos, producidas por *Bacillus pumilus* GMA1
- Identificación de las enzimas por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

## Capítulo III

### Marco teórico

#### 3.1 Marco teórico. General

##### 3.1.1 Proteínas

El nombre de proteína proviene de la palabra griega *proteios*, que significa *primero*. Entre todos los compuestos químicos, las proteínas son ciertamente de los más importantes, puesto que son indispensables en la composición de los seres vivos (Lehninger, 2005).

Desde un punto de vista químico, las proteínas son polímeros grandes. Son poliamidas, y los monómeros de los cuales se derivan son los ácidos  $\alpha$ -aminocarboxílicos, figura 1 (McMurry, 2008).

A diferencia de las amidas y de los ácidos carboxílicos, los aminoácidos (a.a.) son sólidos cristalinos no volátiles, insolubles en disolventes no polares y sus soluciones acuosas se comportan como soluciones de sustancias de elevado momento dipolar (Morrison, 1990).

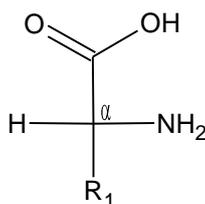


Fig. 1. Estructura de un aminoácido

### 3.1.2 Estructura y características

Se puede considerar una estructura proteínica en varios niveles (Fig. 2). Frecuentemente, se citan cuatro niveles de estructura. En el más bajo, existe una estructura *primaria*, el modo de unión por el cual los átomos de la proteína están unidos entre sí para formar las cadenas por enlace covalente. Después sigue la estructura *secundaria*, que se refiere a la disposición de estas cadenas en el espacio y es en forma de hélices, hojas o esferoides compactos, con puentes de hidrógeno que mantienen unidas diferentes cadenas o partes distintas de una misma cadena (Lehninger, 2005).

La forma globular de la cadena polipeptídica de una proteína se conoce como su estructura *terciaria*. Algo característico en esta estructura, es que el interior consta casi completamente de residuos no polares. Finalmente la estructura cuaternaria se refiere al ordenamiento espacial de las subunidades (cadenas polipeptídicas) y la naturaleza de sus interacciones (Berg et. al, 2007).

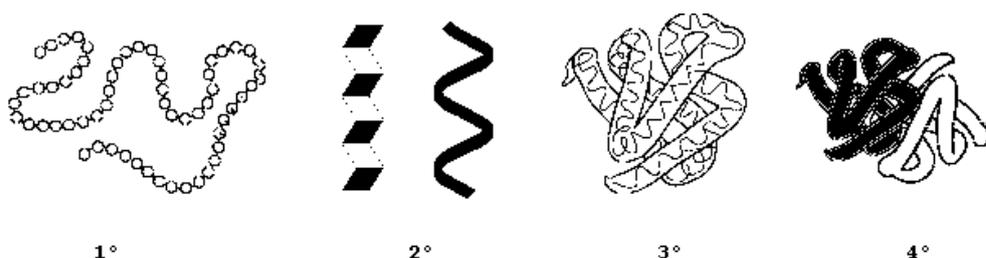


Fig 2. Estructura de las proteínas. De izquierda a derecha, estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

### 3.1.3 Geometría de la unión peptídica

Los péptidos son amidas formadas por interacción entre grupos amino y carboxilo de aminoácidos. En estos compuestos se acostumbra a describir el grupo amida, -NHCO-, como la unión peptídica (Ghélis et. al, 1998).

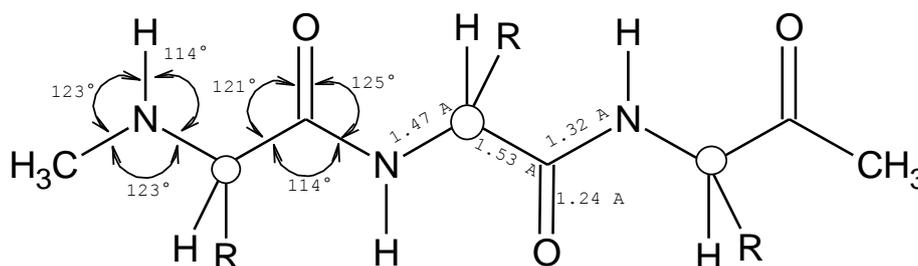


Fig. 3. Geometría de la unión peptídica (Morrison & Boyd 1990)

Los estudios de aminoácidos y dipéptidos con rayos X, indican que el grupo amida entero es plano: el carbono carbonílico, el nitrógeno y los cuatro átomos unidos a ellos se encuentran en un plano (Fig 3). La corta distancia carbono-nitrógeno (1.32 Å), significa que el enlace entre ellos tiene un carácter de doble enlace considerable, por lo que los ángulos de los enlaces con el nitrógeno son similares a los del átomo de carbono trigonal (Morrison & Boyd 1990).

### 3.1.4 Clasificación y función

Las proteínas se dividen en dos grandes grupos: proteínas fibrilares, que son insolubles en agua, y proteínas globulares, que son solubles en agua o en soluciones acuosas de ácidos, bases o sales (suelen ser coloides debido al gran tamaño de las moléculas).

Las proteínas globulares tienen varias funciones relacionadas con la manutención y regulación del proceso de la vida, funciones que precisan la movilidad (McMurry, 2008).

Este tipo de proteínas están plegadas formando unidades compactas que a menudo se aproximan a una forma esferoide. Estos plegamientos se producen de manera que las partes lipófilicas quedan en el interior, apuntándose entre sí y alejadas del agua; en cambio, las partes hidrófilas, por ejemplo, como grupos cargados, tienden a estar cerca de la superficie, donde se encuentran cerca del agua. Los puentes de hidrógeno son principalmente intramoleculares. Las áreas de contacto entre las moléculas son pequeñas, por lo que las fuerzas intermoleculares son débiles (Devlin, 2006).

### **3.1.2.1 Enzimas**

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores muy potentes y eficaces de las reacciones químicas de los sistemas biológicos (Parmjit et. al, 2010), actúan en pequeña cantidad y se recuperan indefinidamente, *in vivo*. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, sino que solamente aceleran las que podrían producirse espontáneamente  $\Delta G^{\circ} < 0$  (Ghélis, 1998).

Cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi actúan sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos (Primo, 2007). Este punto de vista está siendo cuestionado ante la aparición de un número cada vez mayor de enzimas con actividad promiscua (Babtie, Tokuriki y Hollander, 2010).

Desde el punto de vista fisicoquímico, y como consecuencia de su naturaleza proteica, la actividad catalítica depende del pH y de la temperatura de reacción entre otras condiciones, características que resulta de gran importancia en una aplicación industrial (Dordick, 1989).

### 3.1.2.2 Sitio catalítico o sitio activo

Las moléculas de enzimas contienen hendiduras o cavidades en las cuales se encuentra el sitio activo ó catalítico que es la región de la enzima a la cual se une el sustrato para que la reacción se lleve a cabo (Douglas, 1992). El sitio activo está formado por las cadenas laterales de residuos específicos, lo que ocasiona que tenga un arreglo tridimensional particular, diferente al resto de la proteína. Este sitio es afín por la estructura tridimensional del sustrato (Fig. 4).

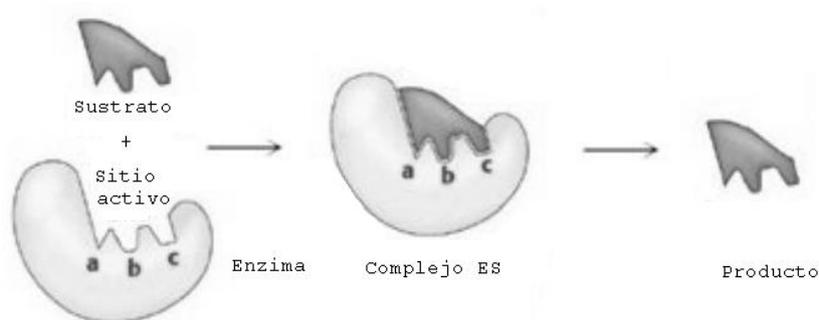


Fig 4. Representación de la unión del sustrato con el sitio activo

El sitio catalítico es una estructura que normalmente se conserva entre las enzimas. También pueden ser muy parecido en enzimas no relacionadas, pero con función similar. El ejemplo de este fenómeno, es la tríada catalítica Ser-His-Asp, la cual se encuentra en una gran variedad de hidrolasas (Holliday, 2009). A continuación se enlistan algunas de las características del sitio catalítico:

- Región tridimensional de la proteína.
- Une al sustrato específicamente, mediante un reconocimiento estructural complementario.
- Contiene a los grupos catalíticos y a los cofactores, si los hay.
- Es una región pequeña comparada con la magnitud total de la proteína.

- La interacción de éste, con el sustrato es no covalente, por tanto, es reversible.
- Es hidrofóbico, aunque puede tener a.a. polares y aún cargados
- Tiene capacidad de "orientar" al sustrato.
- Es una hendidura en la estructura de la enzima, localizada más o menos superficialmente en el cuerpo de la enzima.

### **3.1.2.3 Tipos de enzimas. Clasificación**

Las enzimas se pueden clasificar en diferentes categorías, según la reacción que catalizan (Whiteley & Lee, 2006):

- Oxidoreductasas (EC 1). Reacciones redox que involucran transferencia de electrones
- Transferasas (EC 2). Reacciones de transferencia de grupos funcionales
- Hidrolasas (EC 3). Reacciones de hidrólisis
- Liasas (EC 4). Crean dobles enlaces
- Isomerasas (EC 5). Reacciones de isomerización
- Ligasas (EC 6). Formación de puentes con rompimiento de ATP

### **3.1.2.4 Hidrolasas de éster carboxílico**

Las hidrolasas de éster de ácido carboxílico (EC 3.1.1.X) son enzimas que catalizan la hidrólisis de un éster carboxílico y se obtienen como subproductos un alcohol y un ácido carboxílico. Dentro de este grupo se incluyen las lipasas (EC 3.1.1.3) que catalizan la hidrólisis de triglicéridos en medio acuoso y actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilglicerolos para liberar ácidos grasos y glicerol. Se considera que cadenas a partir de diez átomos de carbono son sustratos preferentes para lipasas, mientras que la hidrólisis de cadenas menores a diez carbonos usualmente indica la presencia de

carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) que también pertenecen a este grupo. Sin embargo, las lipasas también pueden hidrolizar los sustratos característicos de las carboxilesterasas (Aldridge, 1993; Bornscheuer et. al, 2005; Chun-Sheng & Chin-Shuo, 2003; Neklyudov & Ivankin, 2002).

### **3.1.2.5 $\alpha/\beta$ Hidrolasas. Estructura**

En general las carboxilesterasas y lipasas, siguen el patrón de plegamiento de una estructura  $\alpha/\beta$  hidrolasa (Jaeger & Reetz, 1999). De acuerdo a estudios de cristalografía de rayos X, se sabe que el sitio catalítico se encuentra en el grupo carboxilo de la hoja  $\beta$  central, que consiste en una tríada catalítica formada por residuos nucleófilico (Ser-Hys-Asp), un residuo ácido (Asp o Glu) y un residuo de histidina (Hys), siempre en este orden de secuencia.

Las  $\alpha/\beta$ -hidrolasa en su mayoría son estructuras paralelas  $\alpha/\beta$  (Fig. 5). El pliegue tiene una hebra  $\beta_2$  antiparalela al resto de las conexiones.

La primera y la última hélice ( $\alpha_A$  y  $\alpha_F$ , respectivamente), se encuentran en un lado de la hoja, mientras que el resto de las hélices se encuentran en el lado opuesto de la misma.

La mayoría de los miembros de esta familia de enzimas, contienen inserciones de bucle que se pliegan en sub-dominios en el borde carboxilo de la hoja principal. Estos elementos de estructura secundaria forman lo que se ha llamado "tapas" y tienen un papel importante en la definición de la forma, y la regulación de la accesibilidad del sustrato al sitio activo. El catalizador es el residuo nucleófilo (Ser, Hys o Asp) y se encuentra localizado en la curva de la  $\beta_5$  y siguiendo a la hélice  $\alpha_C$ , esta estructura se conoce como "codo nucleófilo".

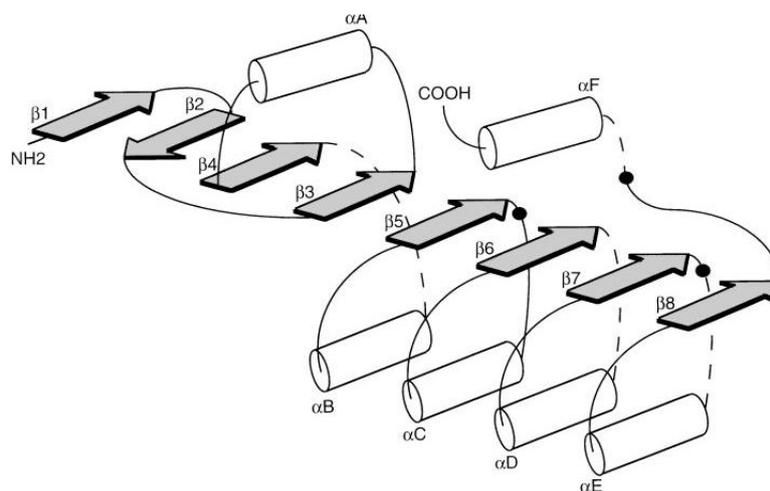


Fig 5. Estructura característica de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa. Las  $\alpha$  hélices están indicadas por los cilindros y las hojas  $\beta$  por flechas. Las líneas discontinuas indican los lugares donde algunas de las estructuras tienen giros. Se muestra como punto negro el elemento codo nucleófilo creado por el giro brusco entre  $\beta 5$  y  $\alpha C$ , al igual que los otros dos residuos de la tríada catalítica.

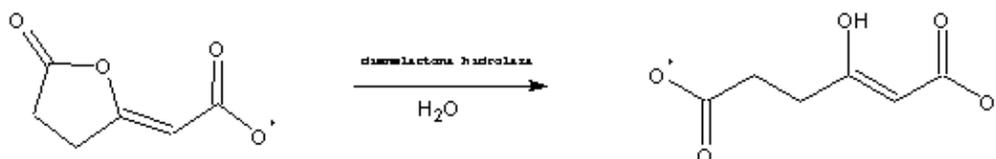
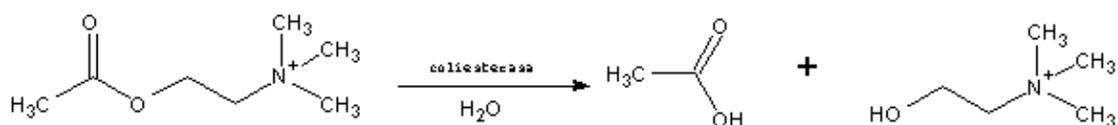
Esta estructura tiene una geometría tensa en la punta del codo y permite una presentación eficiente del nucleófilo en el sitio de ataque en el sustrato. Las posiciones espaciales de los átomos implicados en la catálisis, se conservan en todas las enzimas de esta familia.

Una parte importante del sitio activo de todas las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas es la disposición espacial de los donantes de enlaces de hidrógeno, la cavidad oxianiónica, la cual estabiliza el estado de transición de la reacción catalizada. Cabe mencionar que este tipo de enzimas no requiere de algún cofactor para realizar su función (Holmquist, 2000).

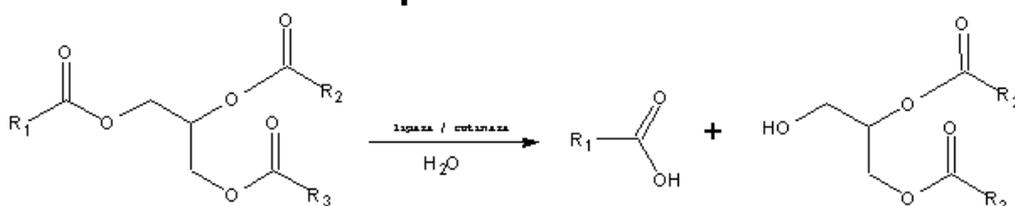
### 3.1.2.6 Clasificación de hidrolasas de éster carboxílico

Las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas son enzimas que catalizan una variedad de diferentes transformaciones (Koehl, 2009). Algunos ejemplos se presentan en Fig 6.

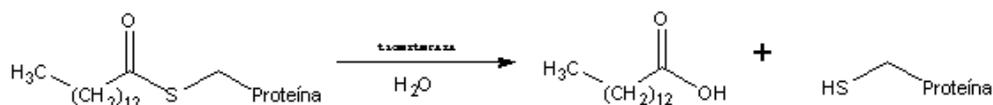
## Carboxilesterasas hidrolasas



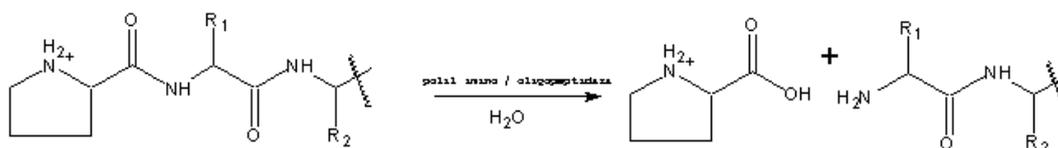
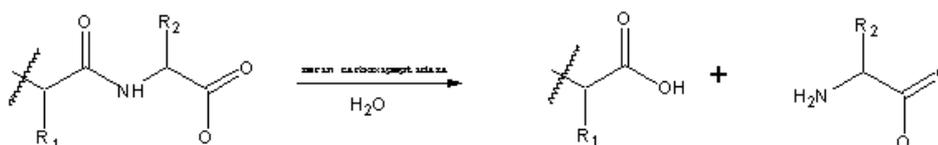
## Lípido hidrolasas



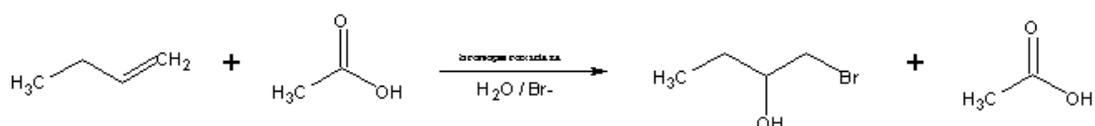
## Tioéster hidrolasas



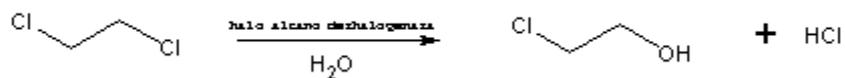
## Péptido hidrolasas



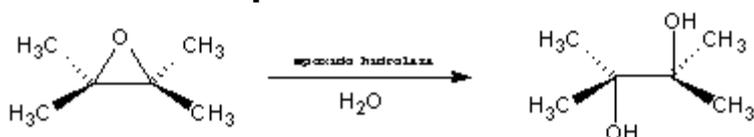
## Haloperoxidasas



## Deshalogenosas



## Epóxido hidrolasas



## Enzimas que hidrolizan enlaces C-C

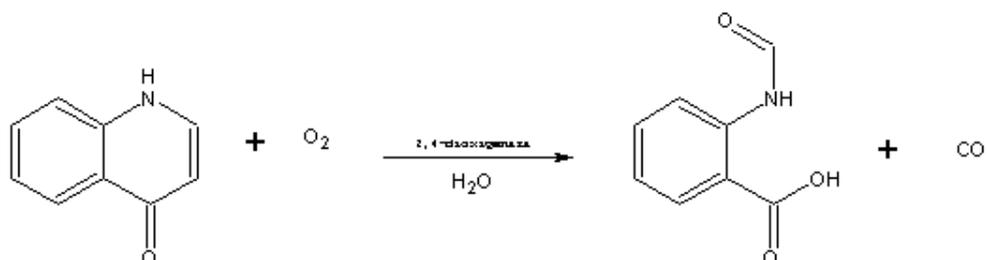
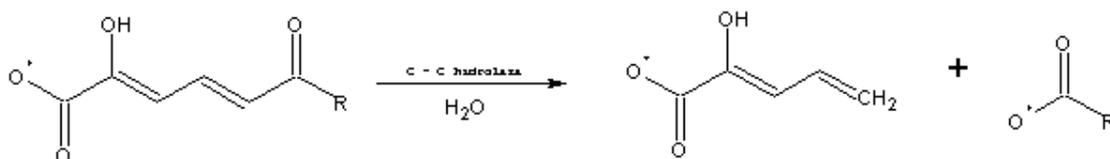
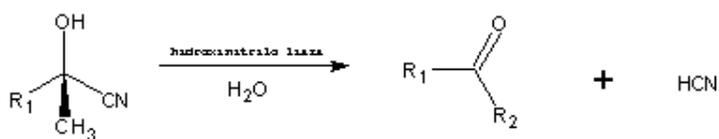


Fig. 6. Ejemplo de  $\alpha/\beta$  hidrolasas con actividad catalítica. Sustratos de diferente naturaleza (Holmquist, 2002)

### 3.1.3 Actividad enzimática

#### 3.1.3.1 Modelos de reconocimiento enzima-sustrato Fisher y Koshland

Hay dos modelos propuestos de cómo las enzimas trabajan: el modelo de la llave-cerradura y el de ajuste inducido. El modelo de la llave-cerradura asume que el sitio activo es un ajuste perfecto para un sustrato específico y que ninguna otra modificación es necesaria. En el caso del ajuste inducido el sustrato produce cambios en la conformación de la enzima, provocando la alineación apropiada de los grupos funcionales del sitio activo provocando la formación del complejo enzima-sustrato (Figura 7).

Los sustratos interactúan con el sitio activo de la enzima a través de enlaces del hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces covalentes temporales o una combinación de todos éstos, para formar el complejo enzima-sustrato. Los residuos del sitio activo actuarán como donantes o aceptadores de protones o de otros grupos en el sustrato para facilitar la reacción. Es decir el sitio activo modifica el mecanismo de la reacción para disminuir la energía de activación de la reacción (Vázquez-Contreras, 2003).

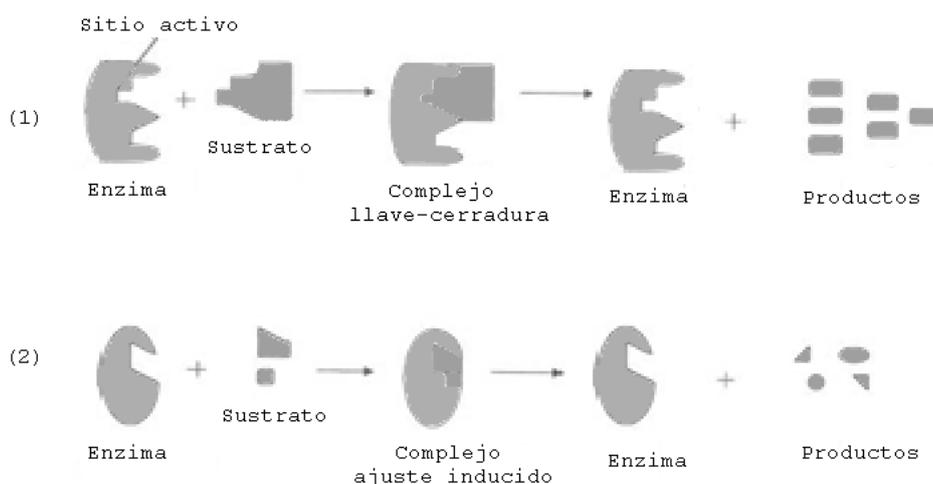


Fig. 7. Formación del complejo enzima-sustrato. (1) del modelo de Fisher y (2) modelo Koshland

### 3.1.3.2 Reacción por catálisis enzimática. Mecanismos

La catálisis es esencialmente un fenómeno químico. La capacidad de una sustancia para actuar como catalizador en un sistema específico depende de su naturaleza química (Wohlgemuth, 2010).

Los mecanismos de reacción de las enzimas son muy complejos, implicando un número de etapas elementales cada una de las cuales puede incluir interacciones complejas entre varios grupos de las moléculas de la enzima y el sustrato (Fuentes & Díaz, 1998). En las reacciones catalizadas por enzimas las velocidades de reacción, así como los mecanismos se ven afectados por cambios en la concentración, el pH y la temperatura. El mecanismo químico está determinado por el tipo de rompimiento y formación de enlaces que lleva a cabo la enzima (Page, 1979):

- catálisis enzimática ácido –base
- catálisis enzimática covalente
- catálisis enzimática por iones metálicos
- catálisis enzimática electrostática
- catálisis enzimática por efectos de proximidad y orientación
- catálisis enzimática unión preferencial al estado de transición del complejo

Cada paso de los mecanismos catalíticos se acompaña por cambios conformacionales que pueden estar localizados o distantes del sitio activo de una enzima (Ghélis, et al. 1998). Algunos de ellos son movimientos de gran amplitud en modo de flexión y otros que corresponden a pequeñas fluctuaciones de cadenas laterales. Los cambios conformacionales pueden persistir hasta cierto punto, incluso después de la disociación del complejo enzima-producto. De ahí su importancia en la catálisis enzimática (Bornscheuer & Kazlauskas, 2004).

Desde la perspectiva de la biotecnología son numerosas las ventajas potenciales en el empleo de enzimas en solventes orgánicos en comparación con medios acuosos. Debido a este planteamiento, es atractivo pensar que la catálisis enzimática en medios no acuosos (Fig. 8), ofrece una gran variedad de ventajas, por ejemplo, permite la solubilización de sustratos no polares, elimina la contaminación microbiana, favorece la síntesis con respecto a la hidrólisis, entre otras ventajas (Dordick, 1989).

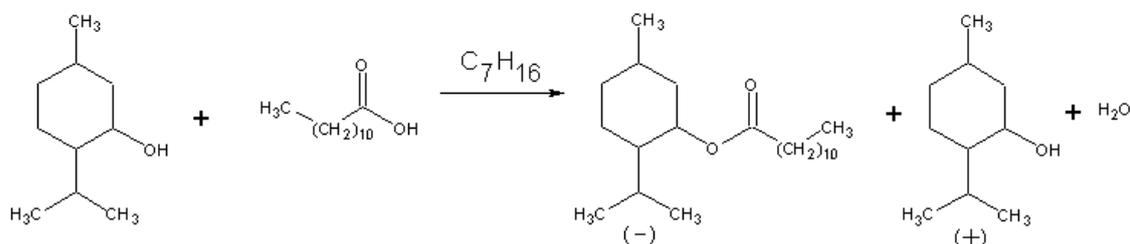


Fig. 8. Esterificación de mentol con ácido laurico catalizada por la lipasa de *C. cyindracea* en heptano. Sólo el isómero (-) es esterificado

### 3.1.3.3 Actividad enzimática. Determinación

La actividad enzimática se refiere a la desaparición del sustrato durante la reacción catalizada por la enzima o la aparición del producto (Lee & Whiteley, 2006). Cualquiera que sea el método de evaluación, éste debe ser cuantitativo y dar resultados en el orden de micromoles de producto formado o sustrato consumido durante un periodo de tiempo, por lo general minutos. Esto se llama tasa enzimática o actividad de la enzima.

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia o fluorescencia o algún otro parámetro óptico que se utiliza, es directamente proporcional a la concentración del reactivo (Ec 1).

Ec. 1

$$A = \epsilon lc$$

En el caso de las enzimas, la concentración está dada por unidad de tiempo, por ejemplo  $\mu\text{mol}^{-1}\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ . En consecuencia, si se conoce el coeficiente de extinción de una sustancia a una determinada longitud de onda y se mide la variación de parámetro óptico con el tiempo, es posible determinar la actividad volumétrica de la enzima (Ec. 2):

$$\text{Ec. 2} \quad v_1 = \Delta A \frac{V}{\epsilon t v}$$

donde **A** es el cambio en la absorbancia, **V** es el volumen total de la mezcla de reacción,  $\epsilon$  el coeficiente de extinción en  $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1}$ , **t** es el tiempo en minutos y **v** es el volumen de la muestra. El coeficiente de extinción de la sustancia de estudio se puede encontrar en la curva patrón, por lo general en la regresión lineal.

Las unidades de actividad enzimática por la cantidad de la proteína se denomina como la actividad específica y la cantidad de proteína en cada muestra se puede determinar de varias maneras dependiendo de la sensibilidad del método usado (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos de cuantificación de proteína

| Ensayo   | Sensibilidad         | Principio   | Reactivos  | Referencia                              |
|----------|----------------------|---|--|---|
| Biuret   | 1-10 mg              | coloración producida por la unión de un péptido con $\text{Cu}^+$   | tartrato de sodio y potasio, $\text{CuSO}_4$ , KI, 0.2 M NaOH y diluido a 250 mL   | Stoscheck CM, 1990                      |
| Lowry    | 20-300 $\mu\text{g}$ | Coloración producida por la unión de a.a. aromáticos, $\text{Cu}^+$ y fosfomolibdato  | $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 2% en 0.1 M NaOH, $\text{CuSO}_4$ 1%, $\text{KOOCH(OH)CH(OHCOONa)}$ 2%  | Lowry et al, 1951<br>Stoscheck CM, 1990 |
| Bradford | 1-100 $\mu\text{g}$  | Absorbancia máxima de un Sol. ácida de Coomassie, azul brillante G-250 a 465 - 595 nm cuando se produce unión a las proteínas | Reactivo de bradford: Coomassie, azul brillante G-250 en etanol 95%, $\text{H}_3\text{PO}_4$ 85%   | Bradford, 1976<br>Stoscheck CM, 1990    |
| BCA      | 0.2-50 $\mu\text{g}$ | BCA reduce $\text{Cu}^{2+}$ a $\text{Cu}^+$ en condiciones alcalinas. se produce molibdeno / tungsteno (azul)                 | RA: Bicinonato de sodio, $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , tartrato de sodio, NaOH, $\text{NaHCO}_3$ , agua pH 11.25 RB: $\text{CuSO}_4$ , agua | Stoscheck CM, 1990                      |

### 3.1.4 Fuentes de enzimas

Las enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidos por plantas, animales y microorganismos. Las enzimas de origen microbiano, principalmente bacterias y hongos, representan la clase más utilizada de enzimas en biotecnología y química orgánica (Gupta et. al, 2004).

#### 3.1.4.1 Enzimas de origen microbiano. Importancia

Las enzimas bacterianas tienen gran importancia comercial, ya que su producción a granel es mucho más fácil. Aunque un número de fuentes de bacterias productoras de enzimas están disponibles, sólo unas pocas son objeto de explotación comercial (Jaeger et. al 1994;. Palekar et al. 2000). Las más importantes son del género *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas*, (Tabla 2).

Tabla 2. Fuentes de algunas enzimas de interés industrial

| Enzima                              | E.C. No. | Fuente   |
|-------------------------------------|----------|--|
| <b>Enzimas de origen bacteriano</b> |          |  |
| $\alpha$ -amilasa                   | 3.2.1.1  | <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i><br><i>B. amyloliquefaciens</i>      |
| $\beta$ -amilasa                    | 3.2.1.2  | <i>B. sp.</i>  |
| Asparaginasa                        | 3.5.1.1  | <i>E. coli</i>   |
| Glucosa isomerasa                   | 5.3.1.18 | <i>B. coagulans</i> , <i>Actinoplanes missouriensis</i>                          |
| Pullulanasa                         | 3.2.1.41 | <i>B. acidophulluliticus</i>   |
| Proteasa                            | 3.4.24.4 | <i>B. subtilis</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i> , <i>B. amyloliquifaciens</i> |
| <b>Enzimas de levaduras</b>         |          |  |
| $\beta$ -galactosidasa              | 3.2.1.23 | <i>Khryveromyces fragilis</i> , <i>K. marxianus</i>                              |
| Invertasa                           | 3.2.1.26 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  |
| Lipasa                              | 3.1.1.3  | <i>Candida sp.</i>   |
| Rafinasa                            | 3.2.1.22 | <i>Saccharomyces sp.</i>   |
| <b>Enzimas de hongos</b>            |          |  |
| $\alpha$ -amilasa                   | 3.2.1.1  | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>                                      |
| Celulasa                            | 3.2.1.4  | <i>A. sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i>   |
| Dexranasa                           | 3.2.1.11 | <i>F. moniliforme</i>  |
| $\beta$ -galactosidasa              | 3.2.1.23 | <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>   |
| Glucoamilasa                        | 3.2.1.3  | <i>A. niger</i>  |
| Glucosa oxidasa                     | 1.1.3.4  | <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Penicillium notatum</i>                  |
| Lipasa                              | 3.1.1.3  | <i>P. sp.</i> , <i>A. sp.</i>  |
| Pectinasa                           | 3.2.1.15 | <i>A. niger</i>  |

|                                 |            |  |
|---------------------------------|------------|--|
| Proteasa                        | 3.4.24.4   |  |
| <b>Enzimas de plantas</b>       |            |  |
| Ácido fosfatasa                 | 3.1.3.2    | Papa                                     |
| α-amilasa                       | 3.2.1.1    | Cereales y semillas                      |
| β-amilasa                       | 3.2.1.2    | Cebada                                   |
| Bromelina                       | 3.4.22.4   | Piña                                     |
| β-glucanasa                     | 3.2.1.6    | Cebada                                   |
| Lipoxigenasa                    | 1.13.11.12 | Soya                                     |
| Papaína                         | 3.4.22.2   | Carica papaya                            |
| <b>Enzimas de origen animal</b> |            |  |
| Fosfatasa alcalina              | 3.1.3.1    | Intestino de ternero                     |
| α-amialasa                      | 3.2.1.1    | Glándulas pancreáticas de bovino/porcino |
| Catalasa                        | 1.11.1.6   | Hígado de bovino                         |
| Quimotripsina                   | 3.4.21.1   | Páncreas                                 |
| Lipasa                          | 3.1.1.3    | Páncreas                                 |
| Pepsina                         | 3.4.23.1   | Estomago de porcino/bovino               |

### 3.1.4.2 El género *Bacillus*. Características

El género *Bacillus* recientemente ha representado un grupo de bacterias extenso y heterogéneo (Guncheva et. al, 2011). Dentro de este grupo se encuentran en su mayoría, bacterias gram positivo en forma de bastón, aerobias, anaerobias facultativas y formadoras de endoesporas (Nazina et. al, 2001).

Con los años se ha ido subdividiendo el género *Bacillus*: *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus*, *Gracilibacillus*, *Ureibacillus* (Nazina et. al, 2001). Las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Geobacillus* son las principales fuentes de lipasas en la familia *Bacillaceae* (Banat Marchant & Rahman, 2004).

Entre los diversos microorganismos productores de enzimas el género *Bacillus* presenta ventaja respecto a otros, ya que muy pocas especies son patógenas, además tiene una alta capacidad de secreción de enzimas (Mnisi et. al, 2005).

Muchas de las carboxilesterasas provenientes del género *Bacillus* han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente a partir de especies como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thermocatenulatus* y *B. thermoleovorans* entre otras. En general las lipasas provenientes de este género, son de gran importancia

biotecnológica, debido a que tienen secuencias proteicas únicas y propiedades tales como pH y temperatura óptimos, son poco comunes (Bornscheuer, 2002).

### 3.1.4.3 Carboxilesterasas del género *Bacillus*

La información disponible en los bancos de datos GenBank, Swiss Protein Sequence Database hasta el 2009, reveló un registro de 38 enzimas presentes en el genoma de *B. pumilus* (Tabla 3), de las cuales 24 tienen actividad carboxilesterasa.

Tabla 3. Carboxilesterasas presentes en el genoma de *B. pumilus*

| Enzima  | ID Gen  | P.I. | P.M.<br>(kDa) |
|---|---------|------|---------------|
| [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                                       | 5621175 | 5.67 | 26.099        |
| Phospholipase/carboxylesterase family [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032] | 5623012 | 5.36 | 22.580        |
| Esterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                              | 5623000 | 6.51 | 28.099        |
| Esterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                              | 5620384 | 5.06 | 27.960        |
| Carboxylesterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                      | 5622326 | 5.15 | 28.456        |
| Hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                             | 5622207 | 6.72 | 34.100        |
| Thioesterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                          | 5619879 | 4.86 | 26.800        |
| $\alpha/\beta$ hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]              | 5622103 | 8.87 | 31.562        |
| Carboxylesterase A [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                    | 5619700 | 4.94 | 32.768        |
| $\alpha/\beta$ hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]              | 5619691 | 4.96 | 30.458        |
| Carboxylesterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                      | 5619656 | 7.07 | 25.927        |
| Hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                             | 5621987 | 9.13 | 30.672        |
| Lysophospholipase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                     | 5621953 | 6.76 | 29.856        |
| Dienelactone hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                | 5619568 | 6.17 | 22.358        |
| Thioesterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                          | 5619551 | 5.85 | 27.977        |
| Cephalosporin-C deacetylase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]           | 5619524 | 5.28 | 35.736        |
| $\alpha/\beta$ fold family hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]  | 5619469 | 7.83 | 32.708        |
| $\alpha/\beta$ fold family hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]  | 5619406 | 6.18 | 33.419        |
| $\alpha/\beta$ fold family hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]  | 5619318 | 7.78 | 37.241        |
| Hydrolase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                             | 5621382 | 5.70 | 28.975        |
| Esterase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                              | 5621006 | 5.28 | 34.614        |
| Lysophospholipase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                     | 5622206 | 5.76 | 33.831        |
| Acylytransferase [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                      | 5622884 | 9.43 | 67.885        |
| Lipolytic enzyme lipc [ <i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032]                 | 5619613 | 8.83 | 23.834        |

P.I. punto isoeléctrico

P.M. peso molecular

La mayoría de las enzimas del género *Bacillus*, son inestables en presencia de surfactantes no iónicos (Tween 80), surfactantes aniónicos (SDS) y peróxido de hidrógeno (Kumar et. al, 2011).

Estudios anteriores reportan que el microorganismo termófilo de estudio, *B. pumilus* GMA 1, produce un enzima con actividad de lipasa, presentando máximos de actividad en 50 °C y pH con un peso de 21 kDa (Bustos, 1995). Se optimizó un medio de cultivo (Ibañez, 2007) donde se observó un incremento en la actividad de esterasas.

### **3.1.5 Lipasas y carboxilesterasas**

Muchas proteínas capaces de hidrolizar ésteres están presentes en los materiales biológicos de todo tipo (microorganismos, plantas, invertebrados y vertebrados). Actúan de acuerdo a su especificidad de sustrato y la distribución dentro de los organismos, está definida por las funciones biológicas (Gupta et. al, 2004).

Las esterasas (EC 3.1.1.1) y lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster y se encuentran ampliamente distribuidas en los animales, plantas y microorganismos (Bornscheuer et. al, 2002).

En medios orgánicos, catalizan reacciones como la esterificación, interesterificación y transesterificación. Las lipasas se pueden distinguir de las esterasas, por el fenómeno de la activación interfacial y / o un dominio hidrofóbico que cubre el sitio activo de la enzima (Houde et. al, 2004). Por otra parte, las esterasas se definen como enzimas que hidrolizan a los triglicéridos con cadenas cortas y sustratos solubles en agua, mientras que las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos de cadenas largas y prefieren sustratos insolubles en agua (Alberghina & Lotti, 2007).

#### **3.1.5.1 Aplicaciones de lipasas y carboxilesterasas**

La mayoría de lipasas y carboxilesterasas pueden ser utilizadas en disolventes orgánicos, por lo tanto, se han convertido en dos de las enzimas más ampliamente utilizadas en síntesis orgánica y diversas aplicaciones industriales: la industria del detergente, la industria

alimentaria, industria oleoquímica, la industria del papel y la resolución de los fármacos quirales (Gupta et. al, 2004) tabla 4.

Específicamente en la industria de los alimentos algunas aplicaciones son en formulas infantiles, actividad en ácidos grasos en posición sn-1,3 y en triglicéridos sn-2, aceleración de la maduración de quesos y, en general, en la manufactura de productos lácteos.

Tabla 4. Aplicaciones industriales de esterasas/lipasas (Houde et. al, 2004)

| <b>Industria</b>          | <b>Efecto</b>  | <b>Producto</b>                     |
|---------------------------|--|-------------------------------------|
| Lácteos                   | Hidrólisis de grasa de láctea, maduración de queso y mantequilla | Saborizantes, queso, mantequilla    |
| Panadería                 | Potenciador de sabor, aumenta vida de anaquel                    | Productos de panadería              |
| Bebidas                   | Mejorador de aroma   | Bebidas                             |
| Condimentos               | Mejora la calidad  | Mayonesa                            |
| Complementos alimenticios | Transesterificación y desacetilación                             | Lípidos funcionales y antioxidantes |
| Cárnicos                  | Sabor y remoción de grasa  | Productos cárnicos                  |
| Farmacéutica              | Síntesis estereoquímica de ésteres                               | Intermediarios principios activos   |
| Limpieza                  | Hidrólisis   | Detergentes                         |

Las carboxilesterasas y lipasas rara vez han sido utilizadas en procesos industriales, debido a su baja estabilidad en las condiciones del proceso operativo. La búsqueda de nuevas enzimas con alta estabilidad bajo condiciones de proceso es necesaria para la industria (Ateslier & Metin, 2006).

### **3.1.5.2 Mecanismo enzimático**

El mecanismo de reacción que permite la ruptura del enlace éster procede por medio de un intermediario acil-enzima, seguido por la adición de una molécula de agua. Esto es muy similar al mecanismo descrito para una serin proteasa (Holmquist, 2000). En el caso de lipasas y carboxilesterasas el mecanismo se presenta en 4 pasos (Fig. 9). En el primero ocurre la formación de un intermediario tetraédrico enzima-éster, el cual está cargado negativamente. En seguida se libera un fenol a partir del intermediario, de forma que se

produce una acil-enzima. Como tercer y cuarto paso, respectivamente, la acil-enzima se hidroliza a partir de un intermediario tetraédrico, para liberar el ácido y a la enzima libre (Bornscheuer et. al, 2005).

La influencia del sustituyente en el fenol es importante para los dos primeros pasos, la formación y el colapso del primer intermediario tetraédrico. La presencia de electrones en los sustituyentes estabilizan al intermediario tetraédrico y facilitan así el paso 1, a efectos inductivos.

Del mismo modo estos sustituyentes estabilizan al fenol, facilitando el paso 2. Para todas las enzimas, el resto de fenol tiene que ser acomodado en el sitio activo, de manera que el enlace éster quede accesible para ser debidamente presentado a la maquinaria de la enzima catalítica (Makimoto & Taniguchi, 1986).

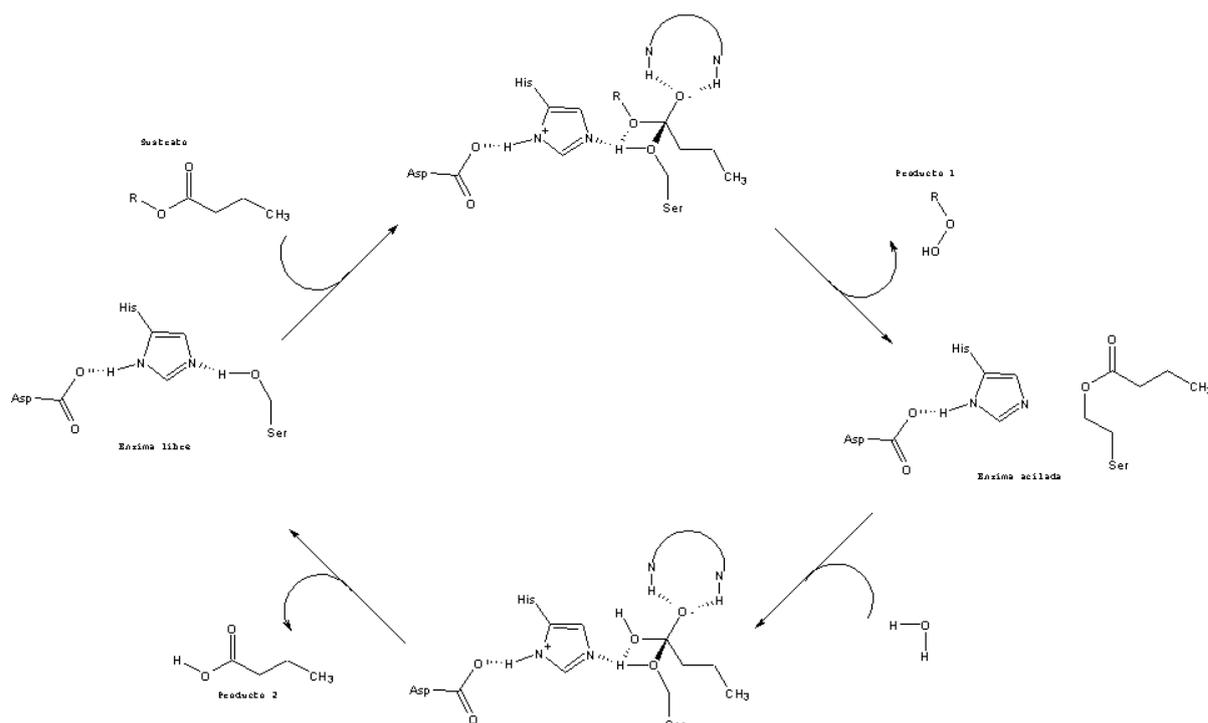


Fig. 9. Mecanismo de reacción de una hidrolasa, catalizando la ruptura del enlace éster. Los grupos importantes de Ser-His-Asp están mostrados de acuerdo a su importancia catalítica.

El progreso para la comprensión del mecanismo del grupo de las carboxilesterasa/lipasa, depende de la investigación del aislamiento,

purificación y el examen detallado de la especificidad de sustrato, estas propiedades están definidas por la proteína pura (Aldridge, 1993).

### **3.1.5.3 Métodos para detección y caracterización de lipasas y carboxilesterasas**

No existe un método único y universal de ensayo de actividad de carboxilesterasa/lipasa. La elección de un método en particular dependerá de los requisitos específicos de la naturaleza de la enzima. Para el ensayo de cualquier enzima, la sensibilidad, la disponibilidad de sustratos, y la facilidad del procedimiento tienen que ser considerados (Fariha et. al, 2009).

Puesto que todas las enzimas son proteínas, deben aplicarse las precauciones necesarias para evitar la desnaturalización que conduce a la pérdida de actividad.

Se han desarrollado varios métodos para la medición de actividad de la lipasa en muestras con enzima cruda o purificada. Dicha actividad puede ser medida por la determinación de la velocidad de desaparición del sustrato o bien la velocidad de producción de ácidos grasos. A continuación se enlistan algunos métodos para determinar actividad hidrolítica en el enlace éster:

- Métodos en medios sólidos (tributirina, yema de huevo ó trioleína)
- Métodos Volumétricos (liberación de ácidos grasos)
- Nefelometría y turbidimetría
- Liberación de glicerol a partir triglicéridos
- Conductividad eléctrica
- Método de la placa de Wilhelmy (tensiometría interfacial)
- Conductancia de onda acústica
- Métodos colorimétricos (p-NFA, P-NFB, p-NFL, ..., p-NF-R)
- Métodos Fluorométricos

- Espectrometría de masas
- Espectroscopia IR
- Método de RMN
- Métodos cromatográficos (HPLC, cromatografía de gases )
- Kits de ensayo
- Sustratos basados en cumarinas
- Lipoproteína lipasa kit de ELISA
- sustrato EnzChek para lipasa
- kit de ensayo fluorescente lipasa MarkerGene™
- kit de ensayo lipasa QuantiChrom™ (DLP-100).
- Métodos inmunológicos
- Microscopia de fuerza atómica
- Detección por microscopía electrónica
- Ensayos Radiactivos

Existen varios métodos que emplean un sustrato especialmente diseñado para dar un producto final de color después de la hidrólisis, o uno que se puede convertir fácilmente a un producto coloreado. La hidrólisis de los ésteres de *p*-nitrofenol con ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena es ampliamente usada para determinar actividad de lipasa y/o carboxilesterasa (Fariha et. al, 2009). La hidrólisis de ésteres carboxílicos de  $\alpha$ -naftol, *p*-nitrofenol o 2,4-dinitrofenol, conducen a la liberación de los alcoholes correspondientes, que pueden ser monitoreados continuamente y cuantitativamente utilizando un método espectrofotométrico, Fig. 10 (Mastropaolo & Yourno, 1981).

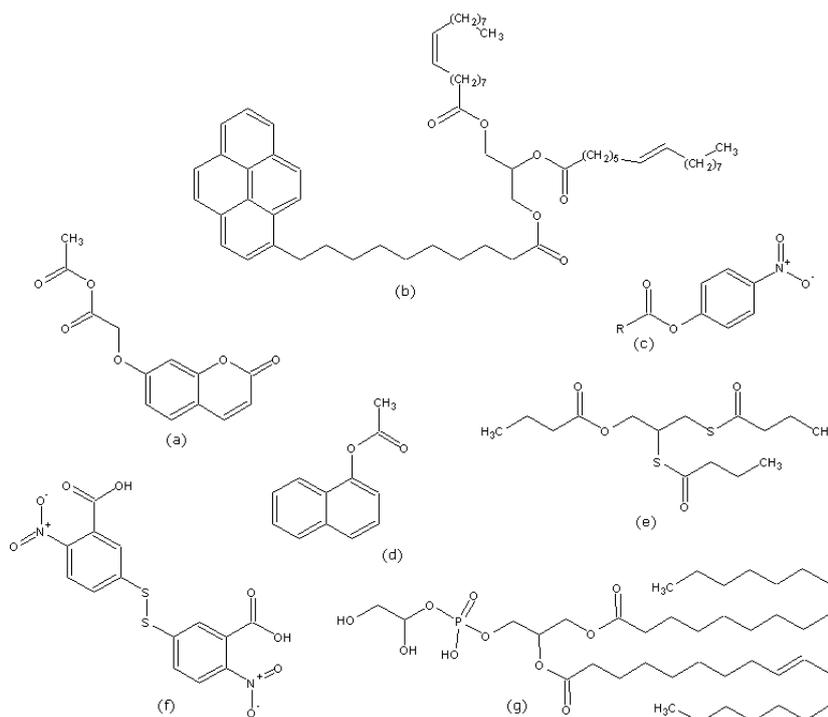


Fig 10. Sustratos utilizados en la medición de actividad enzimática. (a) o-pivaloiloximetil umbeliferona (b) 1,2-dioleil-3-(1-piren-1-il) decanoil rac-glicerol (c) p- Nitrofenil ésteres, (d)  $\alpha$ -naftilacetato (e) dimercaptopropanol tributirato BALB (f) 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) DTNB (g) 1-palmitoleil-oleoilfosfatidilglicerol. (Fariha et. al, 2009).

El *p*-nitrofenol da una coloración amarilla (pKa 7.15) y puede ser medida por la lectura de la absorbancia a 405 nm o 410 nm, Fig. 11 (Abramic et. al, 1999). La actividad enzimática se puede expresar en  $\mu$ moles de *p*-nitrofenol liberado por minuto.

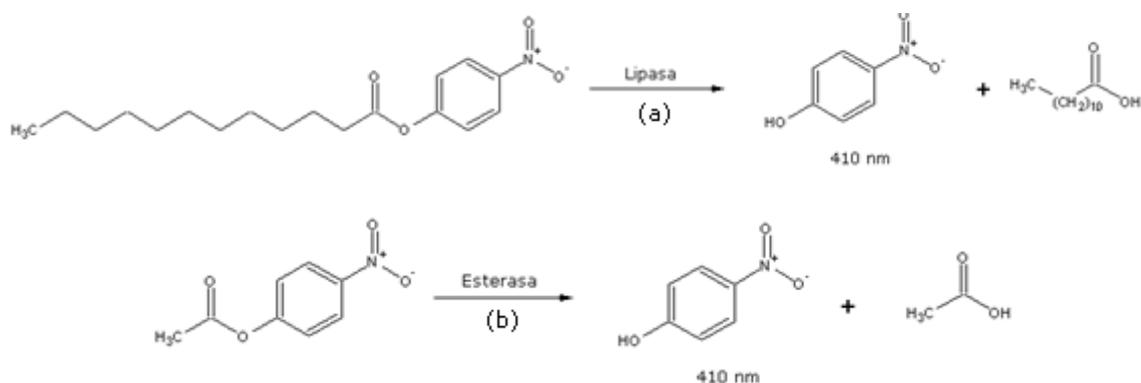


Fig. 11. Hidrólisis de sustratos de naturaleza éster de *p*-nitrofenilo. (a) reacción catalizada por una lipasa, usando *p*-NFL como sustrato. (b) carboxilesterasa actuando en *p*-NFA

### 3.1.6 Actividad promiscua de carboxilesterasa

La promiscuidad enzimática se refiere a la capacidad de una enzima de catalizar dos reacciones distintas. En los últimos años se ha descubierto que la promiscuidad enzimática puede ser un mecanismo alternativo para la obtención de nuevas actividades enzimáticas de forma previa a la duplicación génica (Sánchez-Moreno et al; 2009).

En la literatura están reportadas diferentes enzimas con actividad promiscua hidrolítica, por ejemplo, se ha encontrado una peroxiredoxina Prdx6 con actividad de fosfolipasa en adición a la actividad sobre hidroperóxidos (Manevich et. al, 2009; Nevalainen, 2010), albúmina de suero bovino con actividad de carboxilesterasa (Córdova, et al; 2008), lipasas y esterases con actividad en anillos  $\beta$ -lactámicos y adición de Michael (Bornscheuer & Kazlauskas, 2004) y proteasas con actividad de carboxilesterasa (Sroga & Dordick, 2001; Peña-Montes, et al; 2008).

### 3.1.7 Purificación de enzimas

La purificación de proteínas es la metodología seguida para obtener una muestra proteica que contiene un sólo tipo de molécula. Es de gran importancia el desarrollo de los procesos de purificación de proteínas, dado que los costos de purificación tienden a dominar la economía global del proceso (Gordon et. al, 1990).

Los procedimientos de purificación de proteínas consisten, por lo general, de múltiples pasos, tales como filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico entre otros, para emplear diferentes propiedades de la proteína en el proceso de separación. Recientemente, las técnicas de cromatografía de afinidad se usan cada vez más. Puesto que todas las enzimas son proteínas, los métodos de extracción y purificación les son aplicables. Aquí se deben tomar las precauciones pertinentes para evitar la desnaturalización que puede desencadenar en la pérdida de actividad (Primo, 2007).

Las principales limitaciones en procesos de purificación tradicionales incluyen bajos rendimientos y largos períodos de tiempo, por lo que nuevas técnicas como los procesos en membrana, sistemas acuosos de dos fases e inmunopurificación poco a poco han cambiado el panorama de la purificación de enzimas (Kumar, et. al, 2009). Por otro lado, la purificación de enzimas permite la determinación de los aminoácidos que conforman la estructura primaria y más recientemente la estructura tridimensional, esto permite el establecimiento de la relación estructura-función y contribuye a la comprensión de los mecanismos de cinética en la hidrólisis, síntesis e intercambio de grupos ésteres (Berg et. al, 2007).

Básicamente un esquema de purificación consiste en 3 etapas:

1. Pre-purificación. Acondicionamiento
2. Purificación intermedia. Evaluación de métodos
3. Purificación

El objetivo de las etapas iniciales es la concentración de la proteína, clarificación y el fraccionamiento de la muestra. En la evaluación de los métodos se busca remover interferencias tales como productos de degradación o moléculas contaminantes, con el objetivo de preparar una solución lista para una purificación final. Frecuentemente 1 o 2 etapas coinciden, sin embargo, los propósitos de las 3 están bien establecidos que tienen la propiedad de combinarse.

### **3.1.7.1 Acondicionamiento de la muestra**

La mayoría de las lipasas de origen microbiano son extracelulares, es decir, se excretan a través de la membrana externa en el medio de cultivo. Por esta razón la filtración, extracción con disolventes

orgánicos, precipitación y centrifugación son métodos previos a cualquier etapa de purificación.

También el cambio de pH se usa para la precipitación de proteínas, ya que éstas tienen baja solubilidad en su punto isoeléctrico, y el método representa un bajo costo. Otro parámetro que influye en la precipitación de las proteínas es la temperatura, manteniendo la concentración de sales constante, combinación que permite fraccionar la solución proteínica (MBMB, 2005).

Por otro lado la centrifugación es comúnmente usada para recuperar proteína después de la precipitación (Tabla 5). Otra alternativa es el uso de la extracción de fase líquido-líquido para la separación de 2 fases líquidas inmiscibles.

Tabla 5. Agentes precipitantes utilizados en etapas de pre-purificación (Harris, 2007)

| <b>Agente</b>     | <b>Naturaleza</b> | <b>Propiedades</b>                          |
|-------------------|-------------------|---|
| Sulfato de amonio | Sal               | Fácil solubilidad, estabilizante            |
| Sulfato de sodio  | Sal               | -   |
| Etanol            | Solvente          | Inflamable, con riesgo de desnaturalización |
| Acetona           | Solvente          | Inflamable, con riesgo de desnaturalización |
| Polietilenglicol  | Polímero          | Sin carga                                   |

Alrededor del 80% de los métodos de purificación reportados en la literatura hacen uso de la precipitación, 60% de estos esquemas utilizan sulfato de amonio y 35% usan etanol o acetona (Aires-Barros et. al, 1992).

### **3.1.7.2 Métodos de purificación. General**

La purificación de una determinada proteína de una mezcla compleja, por lo general requiere una serie de etapas de purificación basadas en diferentes principios de separación. Este tipo de separaciones se realizan con mayor frecuencia en columnas, que implican una fase estacionaria sólida adsorbente y una fase móvil líquida que contiene los solutos de interés (Allen et. al, 1973). La cromatografía en

columna es capaz de proporcionar alta resolución mediante la incorporación de un gran número de placas de separación teórica o etapas de equilibrio (Gordon et. al, 1990).

Tabla 6. Métodos de separación cromatográfica, utilizados en la purificación de proteínas.

| <b>Método cromatografico</b>                          | <b>Principio</b>   | <b>Referencia</b>         |
|---|--|---------------------------|
| Filtración en gel o exclusión molecular               | Tamaño y forma de las moléculas                                    | Akaiwa, 1979              |
| Intercambio iónico                                    | Carga neta y distribución de grupos con carácter iónico            | Aires-Barros et. al, 1992 |
| Isoelectroenfoque                                     | Punto isoeléctrico   | Goldman & Baptist, 1979   |
| Interacción hidrófoba & cromatografía en fase reversa | Hidrofobicidad de las moléculas                                    | Whiteley & Lee, 2006      |
| Cromatografía covalente                               | Exposición de grupos -SH   | Whiteley & Lee, 2006      |
| Cromatografía de afinidad                             | Afinidad bioespecífica con ligandos, receptores, anticuerpos, etc. | Gordon et. al, 1990       |

Las técnicas cromatográficas más importantes están enlistadas en la tabla 6. Las condiciones para cada técnica se ajustan de acuerdo a la naturaleza de la proteína a purificar: fuerza iónica, pH, adición de aditivos tales como detergentes, agentes reductores y metales son un ejemplo de estas condiciones.

Comúnmente se utiliza una combinación de métodos cromatográficos. De los esquemas de purificación reportados en el pasado, 67% hacen uso de cromatografía de intercambio iónico; en segundo lugar se encuentra la cromatografía de exclusión molecular con 60% y en tercer lugar la cromatografía de afinidad, con 27% (Aires-Barros et. al, 1992). Cabe mencionar que estas metodologías se llegan a utilizar más de una vez en el proceso de purificación.

La mayoría de los procedimientos seguidos para la purificación de lipasas del genero *Bacillus* incluyen etapas de precipitación seguido por diferentes procedimientos cromatográficos, (Tabla 7).

Tabla 7. Etapas de purificación de algunas lipasas de *Bacillus*.

| <b>Especies de <i>Bacillus</i></b> | <b>Etapas de purificación</b>   | <b>Factor de purificación</b> | <b>Referencia</b>           |
|------------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>Bacillus thermocatenulates</i>  | Desintegración celular, precipitación con calentamiento, cromatografía de intercambio iónico & cromatografía de interacción hidrofóbica | 312                           | Schmidt-Dannet et. al, 1996 |
| <i>Bacillus spp. THL027</i>        | Ultrafiltración y Sephadex G-100  | 2.6                           | Dharmsthiti & Luchai, 1999  |
| <i>Bacillus pumilus</i>            | Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , filtración en gel con Sephadex G-100                                | 75                            | Jose & Kurup, 1999          |
| <i>Bacillus alcalophilus</i>       | Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Sephadex G-100  | 111                           | Ghanem et. al, 2000         |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | CM-Sepharose & DEAE-Sepharose   | 11.6                          | Kim et. al, 2000            |
| <i>Bacillus spp.</i>               | 2 precipitaciones con acetona, octyl-Sepharose CL-4B, Q-Sepharose & Sepharose-12  | 3028                          | Imamura & Kitaura, 2000     |
| <i>Bacillus coagulans BTS-3</i>    | Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , DEAE-Sepharose  | 40                            | S. Kumar et al. 2005        |
| <i>Bacillus licheniformis S-86</i> | Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , DEAE-Sepharose, octyl-sepharose                                     | 76.7                          | Torres et. al, 2008         |
| <i>Bacillus licheniformis</i>      | Cromatografía de afinidad (ácido nitrilo acético quelado con Ni <sup>2+</sup> Ni-NTA)   | 80                            | M.B. Nthangeni et. al, 2001 |
| <i>Bacillus licheniformis P40</i>  | Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Sephadex G-100, Cromatografía de afinidad Source-RPC                | 100.84                        | Teixeira et. al, 2009       |

### 3.1.7.3 Cromatografía por filtración en gel

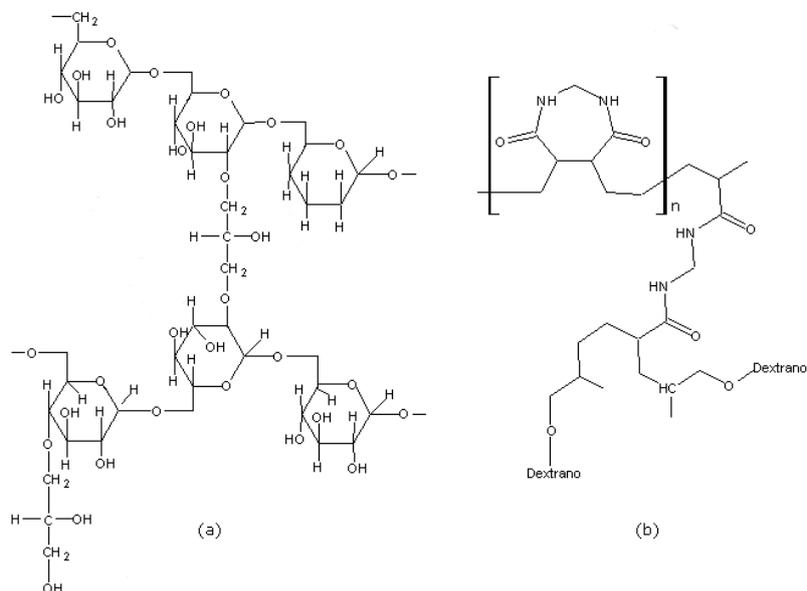


Fig 12. Estructura química del Sephadex (a) gel dextrano entrelazado y Sephacryl (b) gel dextrano entrelazado con NN'-metilen-bisacrilamida, comúnmente utilizados en la técnica de filtración en gel

Se pueden conseguir separaciones más discriminatorias, basadas en el tamaño, por medio de la técnica de cromatografía de filtración en gel, también conocida como cromatografía de exclusión molecular. En esta técnica las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de la columna y aparecen antes porque tienen accesible un volumen del líquido más pequeño; mientras que las moléculas pequeñas, serán las últimas en salir. En la figura 12 se muestran las estructuras de algunos soportes para esta técnica: Sephadex y Sephacryl (Gordon et. al, 1990).

### 3.1.7.4 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico está basada en la atracción entre los iones del soluto y los centros cargados unidos a la fase estacionaria (Harris, 2007). Existen dos tipos de intercambiadores: aniónicos y cationicos (Tabla 8).

Tabla 8. Grupos comunes en soportes de intercambio iónico (Harris, 2007)

| Tipo                               | Abreviatura     | Nombre  | Estructura   |
|------------------------------------|-----------------|---|--|
| <b>Intercambiadores catiónicos</b> |                 |   |  |
| <b>Ácido fuerte</b>                | SP,SE           | Sulfopropil, Sulfoetil  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H<br>-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H                   |
| <b>Ácido intermedio</b>            | P               | Fosfato   | -OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>   |
| <b>Ácido débil</b>                 | CM              | Carboximetil  | -OCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H  |
| <b>Intercambiadores aniónicos</b>  |                 |   |  |
|                                    | TEAE            | Trietilaminoetil  | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>   |
| <b>Base fuerte</b>                 | QAE             | Dietil (2-hidroxi-<br>propil),<br>amonio cuaternario<br>de                            | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br> <br>CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>3</sub> |
| <b>Base intermedia</b>             | DEAE<br>ECTEOLA | Dietilaminoetil<br>Trietanolamina unida<br>a celulosa a través<br>de cadenas gliceril | -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   |
| <b>Base débil</b>                  | BD<br>PAB       | Grupos DEAE<br>benzoilados<br>p.Aminobencil   | -O-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>   |

### 3.1.7.5 Electroforesis de elución

La electroforesis de elución tiene un efecto de tamiz molecular (Akaiwa, 1979), es decir, la separación de las proteínas se basa en el tamaño y no en la carga, como soporte tamizante se utiliza comúnmente acrilamida (Devlin, 2006).

Las técnicas preparativas de electroforesis sirven a menudo como un paso útil en la purificación de proteínas. Los métodos electroforéticos se basan en diferentes tipos de movimientos de las proteínas a través del gel y a continuación la elución del producto deseado (Mulvey & Ohlendieck, 2003). Se han reportado distintos métodos cromatográficos electroforéticos, tal es el caso de la electroforesis realizada en el punto isoelectrico (pI) de la proteína a ser purificada (Baptist & Goldman, 1979).

## 3.2 Antecedentes en el grupo de trabajo

### 3.2.1 *Bacillus pumilus* GMA1. Características

*Bacillus pumilus* GMA1, fue aislado de aguas termales mexicanas en la región de "Los Azufres", Michoacán (Bustos, 1995). Este microorganismo produce enzimas con actividad en ésteres carboxílicos. Sus enzimas son de gran interés debido a la actividad a altas temperaturas y valores extremos de pH. En el grupo de trabajo se realizó su caracterización bioquímica (Tabla 9) y fue identificada también por técnicas moleculares (Bustos-Jaimes et al., 2010). Se destaca la actividad de lipasa y sobre diferentes carbohidratos.

Si bien en el genoma de *Bacillus* se encuentran codificadas varias lipasas y carboxilesterasas, en general se trata de enzimas de bajo peso molecular (Álvarez & Galindo, 2009). En extractos enzimáticos producidos en medio BHI aparece una banda de peso molecular cercano a 21 kDa.

Tabla 9. Caracterización bioquímica de la cepa *B. pumilus* GMA1

| Sustrato               | Resultado | Sustrato              | Resultado |
|------------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| Glicerol               | +         | Sorbitol              | -         |
| Esculina               | +         | Sacarosa              | +         |
| Inulina                | -         | Lipasa                | +         |
| Glucosa                | +         | Eritritol             | -         |
| Galactosa              | -         | Ureasa                | -         |
| H <sub>2</sub> S       | -         | Xilitol               | -         |
| L-fucosa               | -         | β-galactosidasa       | +         |
| Catalasa               | +         | Citrato               | -         |
| Manitol                | +         | Indol                 | -         |
| D-tagatosa             | +         | Fructosa              | +         |
| Hidrólisis de gelatina | +         | Ornitina              | -         |
| Hidrólisis de xilano   | +         | descarboxilasa        | -         |
|                        |           | Reducción de nitratos | -         |

### 3.2.2 Optimización del medio de cultivo

Se optimizó el medio de cultivo para la producción de lipasas y carboxilesterasas, que se presenta en la tabla 10 (Ibáñez, 2007).

Tabla 10. Medio optimizado para la promoción de lipasas y esterases de *B. pumilus* GMA1 (50°C, 24 h, 100 rpm)

| <b>Componente</b>                               | <b>g/L</b> |
|---|------------|
| Tween 80  | 0.005      |
| Glucosa   | 0.43       |
| Aceite de olivo                                 | 1.3        |
| NaHPO <sub>4</sub>                              | 2.5        |
| Extracto de levadura                            | 2.94       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3.26       |
| NaCl  | 5          |
| Glicerol  | 9.7        |
| Extracto de carne                               | 17.5       |

En los intentos de purificación llevados a cabo con extractos obtenidos en este medio, aparece una banda de alto peso molecular adicional a una banda en 21 kDa en geles nativos, la que se intensifica con respecto a la banda obtenida en medio BHI.

### 3.2.3 Métodos de purificación en el grupo de trabajo

Inicialmente se intentó purificar la enzima mediante una columna de filtración en gel Superosa 12 Pharmacia (Wong, 2001), con resultados no reproducibles. Esto se logró con una columna Sephacryl® S-300, con la que en 14 corridas se observó que el intervalo de fracciones 31-49 contiene la actividad de esterasa de ácido carboxílico de 21 kDa. Posteriormente se utilizó una columna de intercambio iónico (Mono Q®). Sin embargo, no hubo reproducibilidad en este esquema de purificación.

### 3.2.4 Caracterización de la enzima semi-pura

Alvarez y Galindo (2009) centraron sus esfuerzos de purificación sobre la proteína de alto peso molecular. No fue posible renaturalizar la enzima de estudio después de la electroforesis en geles SDS-PAGE. Sin embargo con los detergentes 3-(decyldimethyl amonio) propano-1-sulfonato y heptil- $\beta$ -D-glucopiranosido observaron una banda con actividad en zimograma, de menor peso molecular (21 kDa). Dichos autores lograron separar dos fracciones, denominadas A y B, asumieron que su naturaleza era de esterasa y lipasa respectivamente, por la afinidad a sustratos con diferente largo de cadena. Se evaluó la actividad enzimática de ambas muestras, obteniendo como resultado que la fracción A y la fracción B presentan un máximo de actividad enzimática en 30°C y pH 7.2. Supusieron que se trataba de una subunidad del agregado y procedieron a su identificación. En ese caso, no se pudo identificar la proteína de alto peso molecular por LC/MS.

### 3.2.5 Ensayos de biocatálisis de la enzima semipura

Se produjo un biocatalizador a partir del extracto crudo de *Bacillus pumilus* GMA1 (Bermúdez, 2010). Presentó actividad lipolítica con una actividad final de 2.17 U/mg en un soporte inmovilizado. El extracto fue capaz de llevar a cabo reacciones de acetilación y desacetilación sobre diferentes flavonoides como la quercetina y la naringina, así como la esterificación regioselectiva con ácidos grasos de cadena media.

### 3.2.6 Identificación de la enzima

Se hizo un corte en la zona de 21 kDa y se secuenció por espectrometría de masas. La banda de 21 kDa corresponde a la secuencia de una peroxiredoxina YgaF [*Bacillus pumilus* SAFR-032].

## Capítulo IV

### Diseño experimental

#### 4.1 Material y reactivos

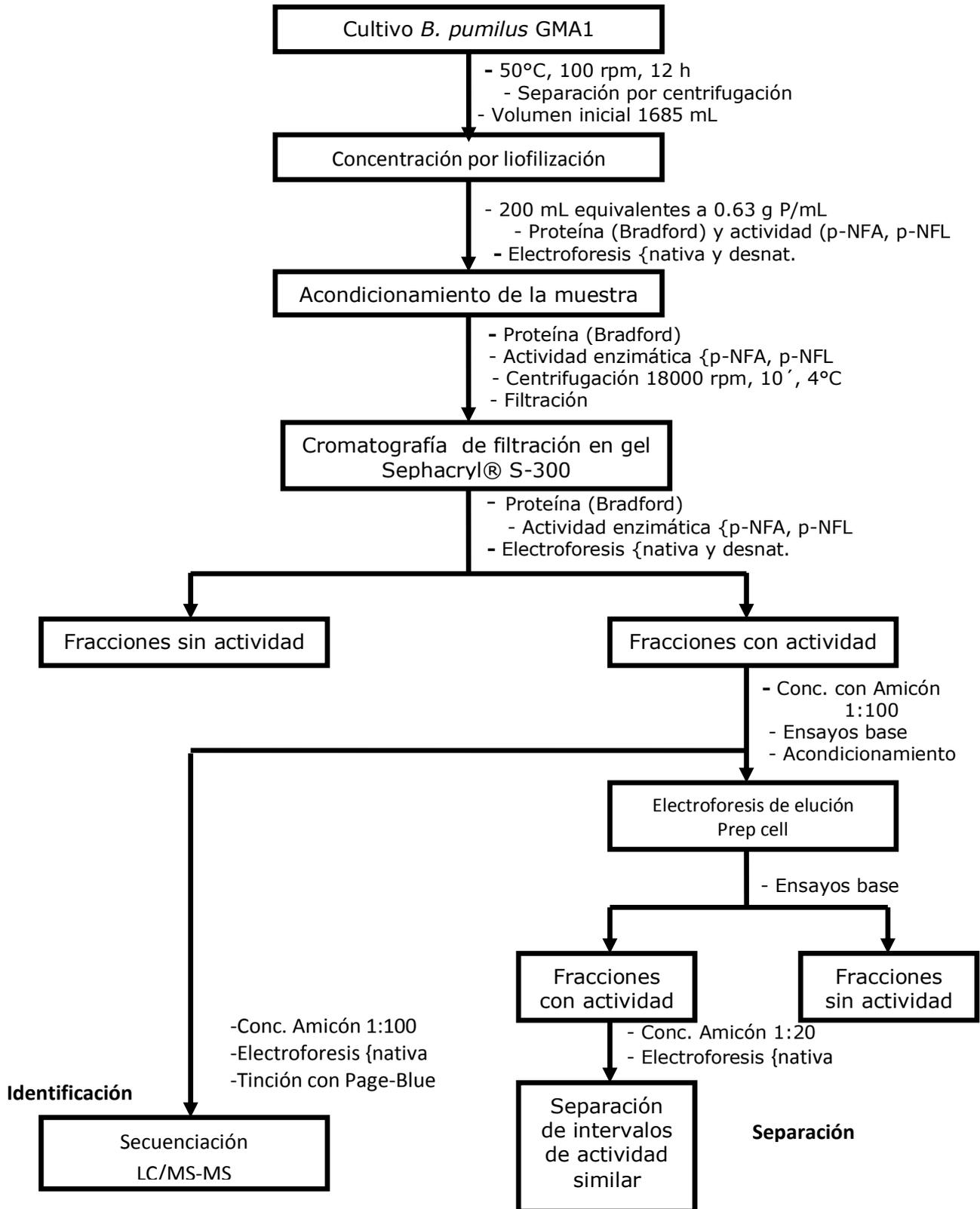
- Acetona
- Ácido clorhídrico conc., 0.1 N, 10%
- Ácido acético
- Acrilamida 30%
- Agua desionizada
- Albúmina estándar
- Bis-Acrilamida %
- Agua desionizada
- Azul de bromofenol 1%
- Buffer de carga para geles nativos pH 8.3
- Buffer de carga para geles desnaturizantes pH 8.3
- Buffer concentrador pH 8.8
- Buffer de fosfatos de potasio pH 7.2 0.05 M
- Buffer separador pH 6.8
- Buffer Tris-HCl 0.05 M pH 8.2
- Buffer Tris-HCl 0.05 M pH 7.2
- Cloruro de calcio 100 mM
- Cloruro de magnesio hexahidratado 100 mM
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10%
- Etanol 70%
- Glicerol
- Glicina
- $\alpha$ -Naftilacetato
- Fast-Red
- Fosfato de potasio monobásico 1 M
- Fosfato de potasio dibásico 1 M
- Hidróxido de sodio 0.1 N, 1N
- Isopropanol 70%
- Kit para tinción con plata

- Marcador de bajo peso molecular Fermentas
- Persulfato de amonio (APS) 10%
- p-Nitrofenol Sigma 1 mM, 10 mM
- p-Nitrofenil acetato Sigma 1 mM
- p-Nitrofenil laurato Sigma 1 mM
- Reactivo de Bradford
- Sephacryl® S-300
- TEMED Biorad
- Tritón X-100
- Tris Base

## Equipos

- Agitador magnético
- Amicón, equipo de ultrafiltración
- Autoclave Yamato SM300
- Balanza analítica Voyager
- Balanza granataria Adamson
- Centrifuga Biofuge
- Centrifuga Beckman J2-MC
- Espectro UV-Vis Biomate
- Estufa Gravity E-71 37°C
- Lector de microplacas Epoch Biotek
- Liofilizadora Labconco
- Membrana MF-Millipore 0.22  $\mu\text{m}$ , 0.40  $\mu\text{m}$
- Membrana 10,000 Da; 1000 Da Millipore
- Potenciómetro
- Prep cell Model 491Bio Rad

## 4.2 Metodología



#### **4.2.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford. Microplaca**

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford cuya sensibilidad es de 1-100  $\mu\text{g}$  (Lee & Whiteley, 2006). El método se realizó en microplaca, usando el reactivo de Bradford (Biorad). El volumen final de reacción fue de 200  $\mu\text{L}$ . La relación entre el reactivo de Bradford y la muestra corresponde a 1:5 respectivamente. Después de 5 min de efectuada la reacción se procedió a medir la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas Epoch (Biotek). Dependiendo de la cantidad de proteína presente, se realizan las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia entre en un rango confiable de una curva de estándar, realizada con albúmina sérica.

#### **4.2.2 Cuantificación de actividad enzimática cualitativa. Microplaca**

La actividad enzimática se evidenció por medio de un ensayo cualitativo, usando  $\alpha$ -naftilacetato (Sigma) como sustrato y Fast Red Salt B (Sigma) como revelador. Para preparar el sustrato, se utilizó acetona como disolvente y buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7.2. En el revelador se utilizó Tritón X-100 como disolvente y buffer. Se utilizaron volúmenes de reactivos en igual proporción con la muestra. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 15 min, y transcurrido el tiempo se adicionó el revelador. El volumen final es de 225  $\mu\text{L}$ , por lo que se adicionó 75  $\mu\text{l}$  de muestra, sustrato y revelador.

### **4.2.3 Cuantificación de actividad enzimática cuantitativa. Microplaca**

El método usado para la cuantificación de actividad enzimática, es un método espectrofotométrico (Bornscheuer et. al, 2005; Nawani, 2000). Se utilizaron sustratos del tipo ésteres de *p*-Nitrofenol con ácidos grasos. Después de la hidrólisis del enlace éster, estos sustratos liberan *p*-Nitrofenol, el cual es un compuesto colorido cuya absorbancia máxima es a 410 nm (Bornscheuer et. al, 2005). Para obtener la actividad enzimática, se realizó una curva estándar en el lector de microplacas Biotek con *p*-Nitrofenol (Sigma) en acetona, en un rango de 1 mM a 10 mM.

#### **4.2.3.1 Determinación de actividad de esterasa con acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NFA)**

El acetato de *p*-nitrofenilo (Sigma) es un éster de cadena corta ( $C < 10$ ), por lo que, la actividad revelada es la de una carboxilesterasa y a su vez lipasa. Se pesaron aproximadamente 18 mg de sustrato y se realizaron las diluciones pertinentes para obtener una concentración de 0.0018 mg/ $\mu$ L. La mezcla de reacción se realizó en microplaca con un volumen final de 200  $\mu$ L. La relación extracto enzimático:sustrato es 1:10. Una vez iniciada la reacción, se siguió la cinética a 410 nm por 15 min en el lector de microplaca Epoch Biotek.

#### **4.2.3.2 Determinación de actividad de esterasa con laurato de *p*-nitrofenilo (*p*-NFL)**

El laurato de *p*-nitrofenilo (Sigma) es un éster de cadena larga ( $C > 10$ ), por lo que, la actividad revelada es únicamente de lipasa. Se pesaron aproximadamente 32 mg de sustrato y se realizaron las

diluciones pertinentes para obtener una concentración de 0.0032 mg/ $\mu$ L, posteriormente se siguió la metodología del ensayo con *p*-NFA. Una vez iniciada la reacción, se siguió la cinética a 410 nm por 5 min en el lector de microplaca Epoch Biotek.

#### **4.2.3.3 Adición de iones divalentes**

La actividad enzimática se ve favorecida a menudo por la adición de iones. Se usaron soluciones de CaCl<sub>2</sub> (Baker) y MgCl<sub>2</sub> (Baker) 100 mM. Se adicionaron en los ensayos cualitativos de actividad, en concentraciones 1% y 10% respectivamente.

#### **4.2.4 Electroforesis**

Se utilizó la técnica descrita por Laemmli (1970). Las muestras que se sometieron a electroforesis fueron mezcladas con buffer de carga 4X. La naturaleza de dicho buffer depende del tipo de gel a usar, es decir, para un gel desnaturizante el buffer de carga contiene un agente reductor como DTT 0.5 M y detergente (SDS). La muestra se calentó a 95°C por 5 min, en el caso de geles nativos no se adiciona agente reductor ni detergente. Se usó un marcador de peso molecular de proteínas (Fermentas), cuyo rango está entre 116 y 14 kDa. La electroforesis se llevó a cabo en 3 h en una cámara de electroforesis Miniprotean II BioRad, inicialmente a 72 V; una vez que pasó la fase concentradora, el voltaje se aumentó a 92 V.

##### **4.2.4.1 Preparación de geles de electroforesis Geles desnaturizantes y Nativos**

Los geles para electroforesis se prepararon al 12%, con los siguientes reactivos: agua desionizada, solución stock de acrilamida, buffer concentrador pH 8.8, buffer separador pH 6.8, APS 10%,

TEMED (Biorad), de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). En el caso de geles desnaturizantes se le adiciona SDS (Biorad) al 10%, y para geles nativos se sustituye por agua desionizada.

#### **4.2.4.2 Precipitación con ácido tricloroacético Acondicionamiento**

Para muestras destinadas a geles desnaturizantes, se precipitó una cantidad de proteína con TCA (Baker) 100% (p/v) en una relación 1:10 (TCA:muestra). Posteriormente se realizaron dos lavados con acetona, la proteína precipitada se resuspendió en la solución amortiguadora de carga 4X y se calentó a 95°C por 5 min.

#### **4.2.4.3 Tinción con plata Máxima sensibilidad y rapidez**

El perfil de proteína de las muestras de cada etapa, se evidenció con la técnica de tinción con plata. Se siguió el protocolo del proveedor del kit para tinción con plata de Fermentas (PAGE Silver™ Silver Staining kit). Se usaron dos variantes de dicho protocolo: máxima sensibilidad (SensitiveProtocol™) y máxima rapidez (QuickProtocol™).

#### **4.2.4.4 Renaturalización enzimática**

Después de la electroforesis en gel desnaturizante, las muestras se renaturalizaron para observar actividad en gel. Se sumergió el gel primero en buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7.2, durante 15 minutos, posteriormente en Tritón X-100 al 5% en el mismo buffer por 15 min y finalmente en Tritón X-100 al 0.05% en el buffer de fosfatos por 24 h.

#### **4.2.4.5 Revelado de actividad enzimática en geles**

Se incubaron los geles en una mezcla de reacción similar a la usada en el ensayo de actividad enzimática cualitativo. En el caso de geles nativos, se reveló la actividad una vez que salieron de la electroforesis, y en el caso de geles desnaturizantes, se realizó después de la renaturalización.

#### **4.2.5 Purificación**

##### **4.2.5.1 Acondicionamiento de la muestra**

Se pesaron 50 g de los liofilizados de extracto crudo y se disolvieron en buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7.2, volumen que se llevó a 500 mL (Sol I). Se tomó una alícuota de 250 mL de esta solución y nuevamente se llevó a un volumen de 500 mL (Sol. II). La Sol II contiene aproximadamente 1 mg de proteína/mL, concentración requerida para la columna de filtración en gel.

##### **4.2.5.2 Filtración en gel. Sephacryl S-300®**

Una vez que se acondicionó la muestra, se centrifugó a 18000 rpm/10 min/4°C y se filtró a través de una membrana Millipore de 0.22 µL con el propósito de clarificarla. La columna que se utilizó es una columna preparativa Sephacryl S-300®. EL volumen de muestra inyectado fue de 10 mL por corrida. La muestra se inyectó con un flujo de 1 mL/min y una velocidad en el colector de 5 mL/ tubo. Obteniendo en promedio 80 tubos con 5 ml cada uno, por corrida.

#### 4.2.5.3 Concentración por ultrafiltración en Amicón® de las fracciones elegidas

La actividad de carboxilesterasa fue evaluada cualitativamente para cada una de las fracciones de cada corrida. Aquéllas con actividad enzimática representativa, se juntaron para obtener un volumen final de 900 mL. Este volumen se dividió en 3 lotes de aproximadamente 300 mL cada uno. Posteriormente la muestra se ultrafiltró en Amicon® usando una membrana de 10 kDa y un factor de concentración 1:100. Se utilizaron los 2 primeros lotes para la electroforesis de elución.

#### 4.2.5.4 Liofilización

Después de la etapa de filtración en gel, para garantizar la estabilidad de algunas muestras, se liofilizó una fracción con la liofilizadora (Labconco). Previamente se congeló la muestra con etanol y hielo seco y se mantuvo 24 h a -70°C, posteriormente se liofilizó durante aproximadamente 7 h. El residuo obtenido se resuspendió en buffer de fosfatos de potasio 0.05 M pH 7.2.

#### 4.2.5.5 Electroforesis de elución. Prepcell

La electroforesis de elución se probó con 3 diferentes condiciones, enlistadas a continuación (Tabla 11):

Tabla 11. Condiciones de electroforesis de elución

| Tipo de gel | Acrilamida % | pH  | Centrifugación 18000 | Vol. inyectado mL |
|-------------|--------------|-----|----------------------|-------------------|
| Nativo      | 7.5          | 8.2 | Sí                   | 1                 |
|             | 12           | 7.2 | Sí                   | 1.2               |
|             | 12           | 7.2 | No                   | 1.2               |

#### **4.2.5.6 Acondicionamiento de la muestra**

Una vez identificadas las fracciones que tenían actividad enzimática, después de la cromatografía de filtración en gel, se concentró la muestra con ultrafiltración en Amicon® usando una membrana de 10 kDa y un factor de concentración de 1:100. Posteriormente se utilizó una membrana de 1 kDa para reducir el volumen anterior aproximadamente a 1 mL.

#### **4.2.5.7 Concentración con Amicon® de las fracciones elegidas**

Después de la electroforesis de elución, se obtuvieron 3 corridas con aproximadamente 90 tubos cada una en promedio con 5 mL cada uno de ellos. Se realizaron los ensayos base (Bradford y actividad cuantitativa), para detectar zonas de posible presencia de la enzima de interés. Se verificaron sus perfiles de proteína en geles SDS-PAGE y se concentraron dichas zonas por ultrafiltración en Amicon® con una membrana de 10 kDa y aproximadamente un factor de concentración de 1:20.

#### **4.2.6 Secuenciación**

##### **4.2.6.1 Preparación de geles nativos para secuenciación**

Se usaron geles nativos al 12% de acrilamida para la secuenciación de las bandas de interés, la realización de éstos se hizo conforme a lo descrito en el punto 4.2.4.1. Cada solución se preparó con agua grado Milli-Q.

#### **4.2.6.2 Identificación de la proteína por espectrofotometría de masas**

Se cortaron las bandas correspondientes a las actividades presentes en el gel nativo de secuenciación. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su envío al Instituto de Biotecnología-UNAM, donde se llevó a cabo un análisis espectrométrico por LC-MS/MS para la identificación de la proteína. La muestra fue digerida "in gel" con tripsina y los péptidos resultantes se aplicaron en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) con "splitter" (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co.) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Fueron seleccionados iones con carga  $2^{+}$  y  $3^{+}$  para estos eventos de fragmentación. Se descartaron los iones con carga superiores a  $4^{+}$  y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones, con un tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI Inr a través del programa Matrix Science (Mascot Search Result).

#### **4.2.7 Peroxidasas. Ensayos de actividad**

##### **4.2.7.1 Peroxidasas. Actividad cualitativa**

Las muestras que tenían actividad sobre el sustrato *p*-NFA y la muestra acondicionada para la filtración en gel, se sometieron a un ensayo de actividad cualitativa de peroxidasa. Se emplearon como sustratos guayacol y bencidina. El ensayo consiste en la adición de la

enzima, buffer de fosfatos pH 7, el sustrato y finalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La prueba se considera positiva si se desarrolla coloración rojiza en el caso de la oxidación del guayacol y azul en el caso de la bencidina. Para observar un cambio diferenciable, las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 1 h.

#### **4.2.7.2 Peroxiredoxinas. Actividad cualitativa**

El extracto crudo, acondicionado para la filtración en gel, se sometió a un ensayo de redox cualitativo. La muestra se pre-incubó 30 min. con DTT (agente reductor) y posteriormente se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM y se incubó 30 minutos. Finalmente se adicionaron sulfato férrico amónico y tiocionato de potasio. La reacción se considera positiva si se observa una coloración roja [Fe(SCN)(H<sub>2</sub>O)<sub>5</sub>]<sup>2+</sup>.

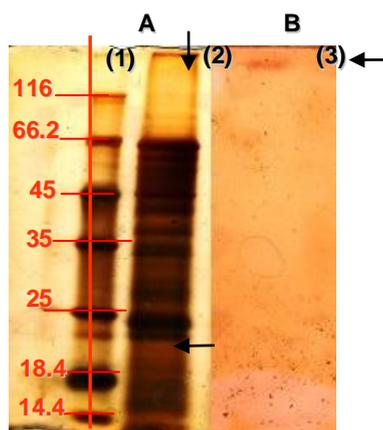
## Capítulo V

# Resultados y discusión

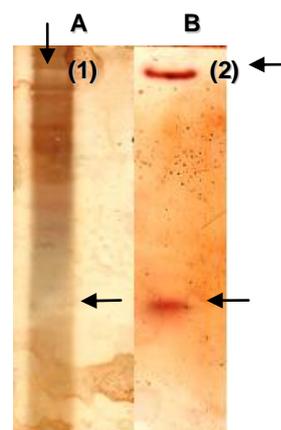
### 5.1 Obtención del extracto enzimático

Se preparó un extracto crudo (EC) a partir de un cultivo de la cepa de *Bacillus pumilus* GMA1 en medio optimizado (Ibañez, 2007). En el extracto se encuentran enzimas con actividad de esterasa de ácidos carboxílicos. El extracto crudo fue liofilizado para su almacenamiento.

Se verificó la actividad enzimática y cantidad de proteína del extracto liofilizado, para calcular la actividad específica de las enzimas de interés. El extracto crudo tiene 53.03 mg<sub>proteína</sub> /mL y 0.844 U/mL. Su perfil proteínico en geles nativos y desnaturizantes se muestra en la Fig. 13.



**Figura 13.** Perfil de proteínas del extracto crudo (EC) en gel SDS-PAGE. Panel A. Tinción con plata; carril (1) Marcador LW; carril (2) EC y panel B, carril (3) zimograma EC tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato. Las flechas indican las bandas de interés.



**Figura 14.** Perfil de proteínas del extracto crudo (EC) en gel nativo. Panel A. Tinción con plata; carril (1) EC y panel B, carril 2 (EC) zimograma, tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato. Las flechas indican las bandas de interés.

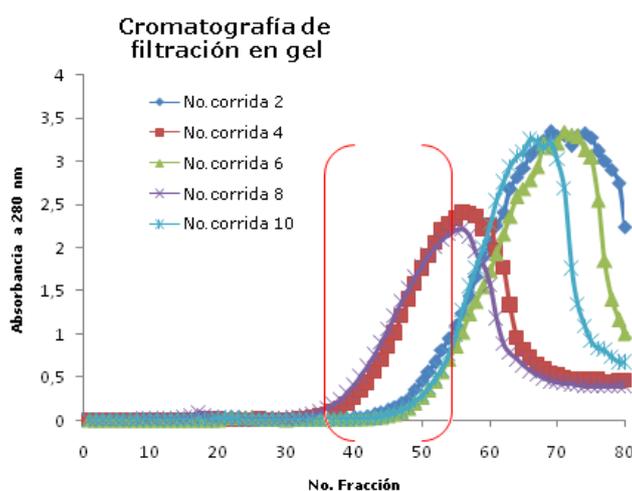
En la Fig. 13, panel A, se puede observar que el EC posee un perfil de proteína complejo, sin embargo, en zimograma al renaturalizar la muestra se observa una única banda con actividad de esterasa (fig. 13, panel B), cuyo peso molecular está por encima de 116 kDa. Puede tratarse de un agregado con un peso aproximado de 150 kDa (Álvarez & Galindo, 2009). De la misma forma se realizó un gel nativo, que se muestra en la Fig. 14 (panel A) y en donde se observa un perfil proteínico similar, en este caso se encuentran 2 bandas con diferente peso molecular que muestran actividad de esterasa (panel B).

De acuerdo a la información disponible en banco de datos, se sabe que de las 24 enzimas con actividad de carboxilesterasa codificadas en el genoma de *Bacillus pumilus*, ninguna excede 67 kDa y ninguna es menor a 26 kDa (GenBank & Swiss Protein Sequence Database, 2009; Álvarez & Galindo, 2009) por lo que la actividad revelada en el gel SDS-PAGE se puede deber a un agregado. La formación de un agregado enzimático se puede dar por las interacciones hidrofóbicas características de una enzima con varias regiones hidrofóbicas.

## 5.2 Cromatografía de filtración en gel

No todas las proteínas presentes en el extracto crudo son responsables de la actividad de carboxilesterasa, como se observó por zimografía. Para poder identificar por secuenciación las actividades de interés observadas anteriormente, se sometió la muestra a un proceso de purificación. La cromatografía de filtración en gel permite la separación de las moléculas de acuerdo a su peso molécula y la actividad enzimática se debe monitorear con un método de detección de actividad enzimática.

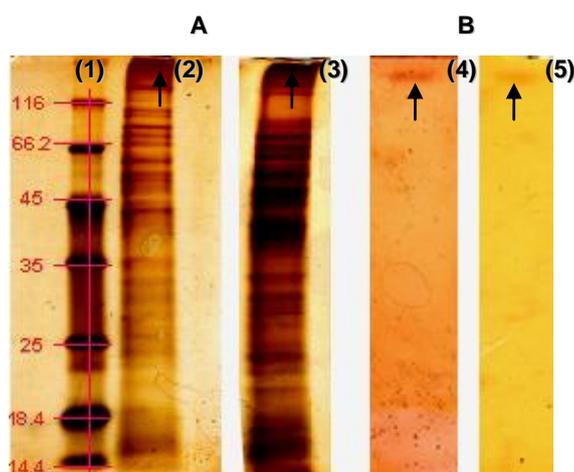
Después de inyectar la muestra a la columna, se graficó la distribución de proteína en cada una de las fracciones eluidas (Fig. 15), Se graficaron las corridas que muestran el comportamiento general de la muestra después de haber sido sometida a filtración en gel. En total se realizaron 20 inyecciones y en cada corrida, se obtuvieron en promedio 90 fracciones, por lo que se analizaron 1800. Se encontró que en cada corrida, eran por lo general las fracciones 38-55 las que poseían actividad enzimática y se reunieron en una sola muestra. En algunas corridas se observa un desplazamiento con respecto a la distribución de proteína, debido a la variabilidad en el flujo de la muestra dentro de la columna.



**Figura 15.** Cromatograma del extracto crudo después de haber sido inyectado en una columna Sephacryl S-300. En promedio las fracciones 38-55 poseen actividad enzimática (ensayo con  $\alpha$ -naftilacetato), se muestran entre paréntesis.

### 5.3 Ultrafiltración con Amicón de EC-FG

Las fracciones recolectadas que presentaron actividad enzimática, provenientes de la filtración en gel (EC-FG) sumaron en total un volumen de 900 mL, por tanto la enzima se encuentra diluída. Se concentró utilizando una membrana de 10 kDa que permitiera eliminar las fracciones de bajo peso molecular y sales. El perfil proteínico en el gel SDS-PAGE no muestra una purificación, ya que están presentes casi todas las bandas, pero si se enriquecen las que están en la región entre 30 y 50 kDa. Los zimogramas del panel B de la figura 16 muestran en los dos casos bandas de alto peso molecular con actividad.

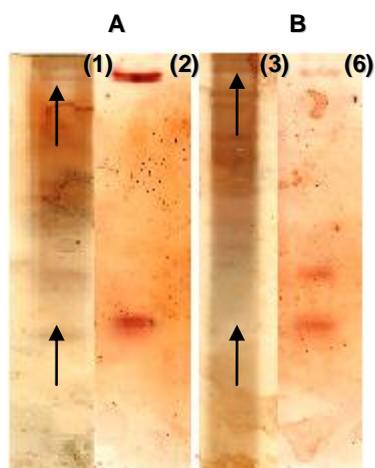


**Figura 16.** Perfil de proteínas en gel SDS-PAGE de EC y EC-FG concentrado 10x. Panel A. Tinción con plata; carril (1) Marcador LW; (2) EC; (3) EC-FG y panel B, tinción de actividad de esterasa; (4) EC; (5) EC-FG. Las flechas indican las bandas de interés.

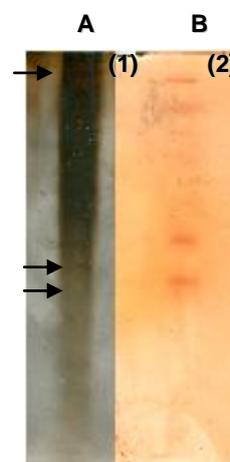
En gel nativo, la muestra EC-FG presenta una actividad adicional a las que se observaban anteriormente en el EC (Fig. 17). Esta actividad indica que en el EC se encuentra otra enzima con actividad de carboxilesterasa. El factor de concentración es responsable de dicha manifestación, debido a que posiblemente esta enzima se encuentre en menor cantidad en comparación con las reveladas originalmente en el EC.

La misma situación se presenta al someter nuevamente la muestra EC-FG a ultrafiltración con un factor de concentración final

de 100 veces. En la Fig. 18 se observa la presencia de otra actividad, sumando en total 4 bandas de actividad.



**Fig. 17.** Gel nativo. Panel A. Tinción con plata; carril (1) EC y tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato; carril (2) EC y panel B, carril (3) EC-FG conc. 10x; (4) EC-FG conc. 10x. Las flechas indican las bandas de interés



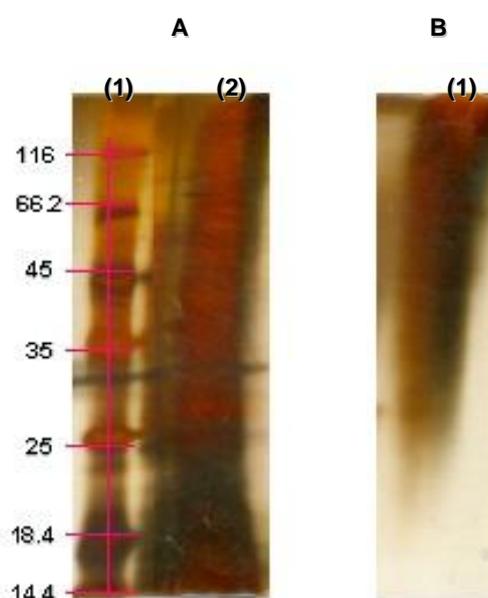
**Fig. 18.** Gel nativo. Panel A. Tinción con plata; carril (1) EC-FG conc. 100x y panel B, tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato; carril (2) EC-FG conc. 100x. Las flechas indican las bandas de interés

#### 5.4 Electroforesis de elución

Para seguir con la purificación de la muestra, se utilizó la electroforesis de elución para separar las diferentes enzimas con actividad de carboxilesterasa, por medio de la diferencia en pesos moleculares. Se realizaron 3 electroforesis con diferentes condiciones (Tabla 11), hasta encontrarse las mejores. En cada condición se obtuvieron 80 fracciones en promedio. En total se caracterizaron 273 fracciones eluidas. El perfil de proteína y actividad enzimática de las fracciones de cada una de las condiciones de la tabla 13 se muestra en el Apéndice 8.3.

En la condición A, el ensayo de actividad de esterasa se ve interferido por la alcalinidad del pH, por tanto el sustrato se hidroliza espontáneamente en el mismo medio; sin embargo, se logra observar un cambio medible de actividad enzimática. En consecuencia, en condiciones posteriores se utilizó pH neutro para evitar la hidrólisis del sustrato debida al medio.

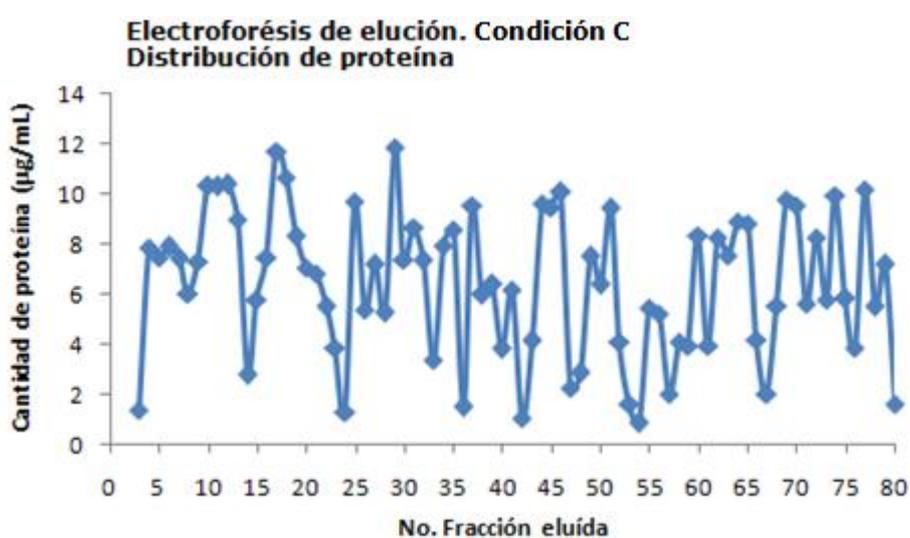
En el caso de la condición B, el tamaño de poro es más pequeño, debido al incremento del % de acrilamida, por lo que la distribución de proteína cambia, la resolución entre picos aumenta. La desventaja de esta condición está dada por la centrifugación, ya que en el pellet se pierde proteína insoluble con actividad. Se observó que la muestra pierde actividad por la centrifugación antes de someterla al proceso de electroelución. En el pellet se detectó actividad importante, empleando métodos cualitativos- Esto se puede deber a la insolubilidad de las enzimas con actividad de carboxilesterasa presentes en EC-FG. El perfil de proteína se observa en la Fig. 19, y es similar al que presenta la muestra concentrada, destinada a la electroforesis de elución. La centrifugación retira la proteína insoluble de la muestra EC-FG, por lo que cuando la muestra se inyecta a electroelución sólo entra la fracción soluble, de ahí las bajas concentraciones de proteína en las condiciones A y B usadas para electroelución. Después de este análisis se inyectó la muestra sin centrifugar (condición C de electroelución).



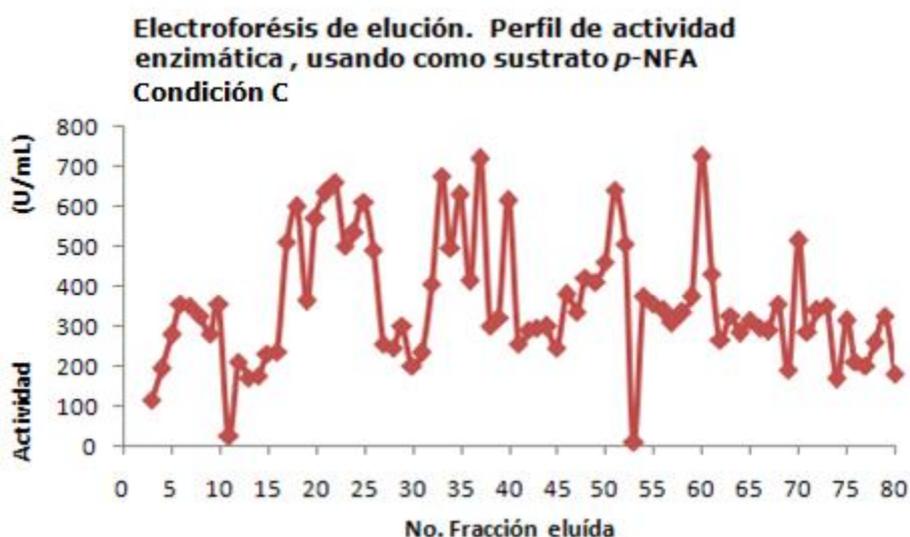
**Fig. 19.** Panel A. Gel SDS-PAGE. Tinción con plata, carril (1) Marcador LW; carril (2) pellet (muestra centrifugada); y panel B. Gel nativo. Tinción con plata, carril (1) pellet (muestra centrifugada).

Con respecto a la condición C, se tienen las mismas ventajas mencionadas anteriormente, y a diferencia de la condición B, la muestra no se centrifugó para evitar la pérdida de enzima insoluble.

En la Fig. 20 se muestra el cuantificación de proteína de las fracciones eluidas con la condición C. Se observa una amplia distribución de proteína en toda la corrida. En la Fig. 21 se muestra el cromatograma de actividad enzimática, donde se pueden observar picos similares en un diferente intervalo de fracciones.



**Fig. 20.** Cromatograma de distribución de proteína de la condición C (Método de Bradford en microplaca)



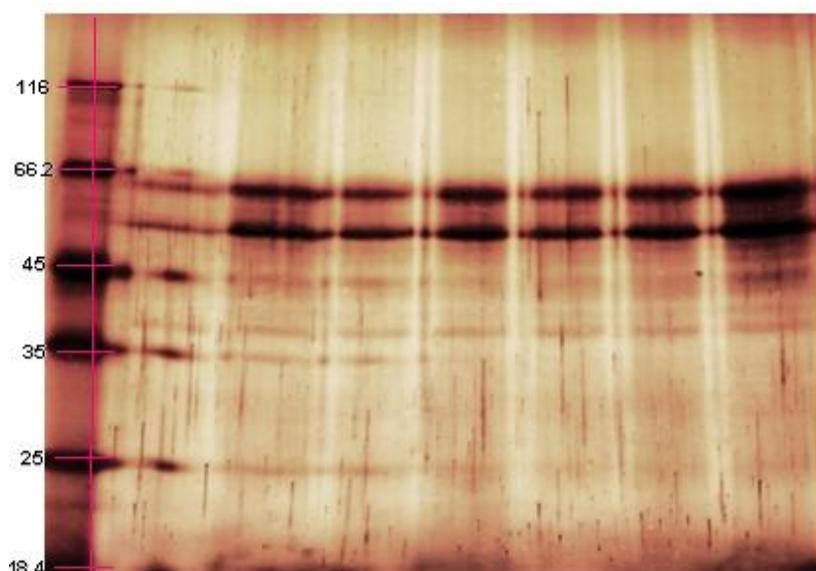
**Fig. 21.** Cromatograma de actividad enzimática de la condición C (Método cuantitativo en microplaca; sustrato *p*-NFA)

En cada fracción eluída de las diferentes condiciones la cantidad de proteína es muy baja, pues los niveles cuantificados están en un rango de 0-25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el caso de la condición C, de 0-14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

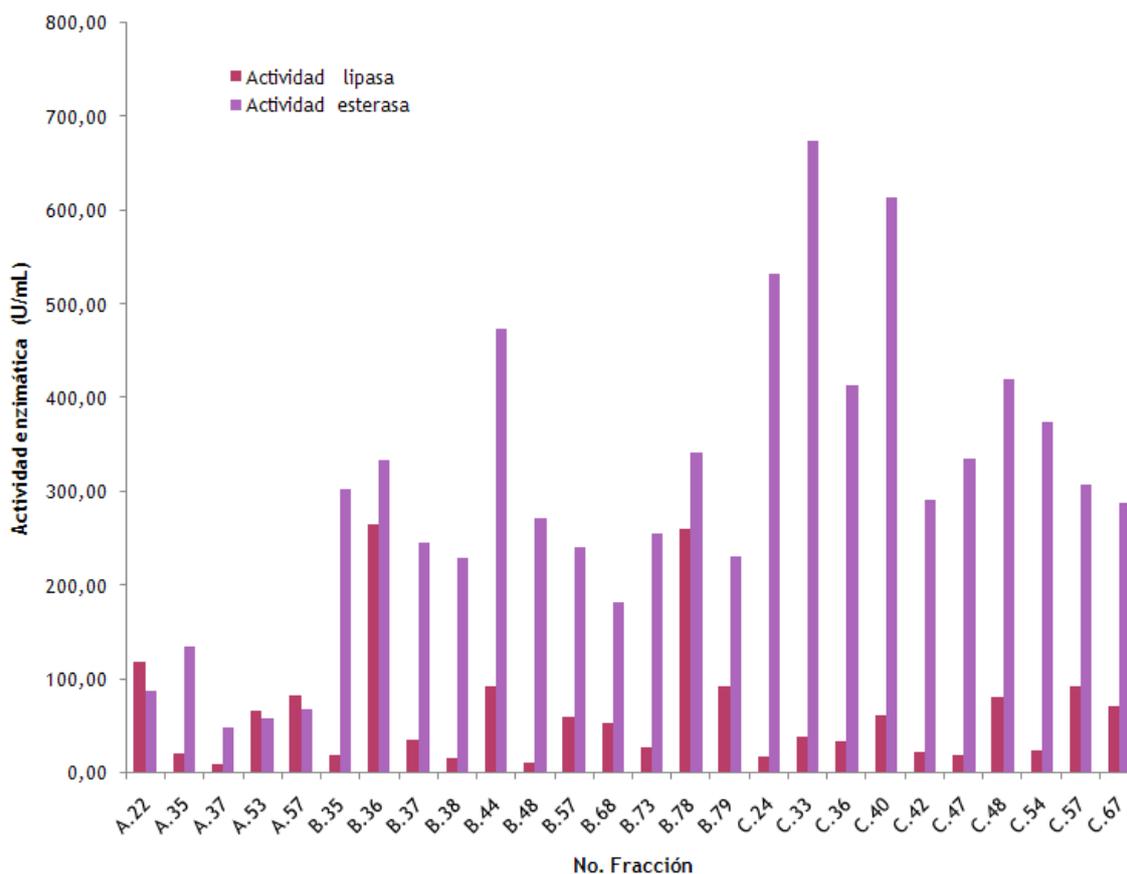
Cada condición se caracterizó, y las fracciones con actividad enzimática destacada se sometieron directamente a gel SDS-PAGE para observar su perfil de proteína. Solo se pudo observar el perfil de proteína de las primeras fracciones de la condición C (Fig. 22).

La electroforesis de elución es más eficiente como proceso de purificación (Fig. 20), pues se pudieron separar diferentes grupos de proteínas con peso similar a partir del patrón complejo que presentaba la muestra EC-FG. Se puede decir que tras esta etapa la muestra se encuentra semipura.

En la Fig. 22 también se observan bandas constantes en la región de 50-70 kDa. Estas bandas están presentes en todas las fracciones eluídas por el método. Pudiera tratarse de contaminación con queratina de la piel debido a la manipulación de la muestra o por parte del equipo.



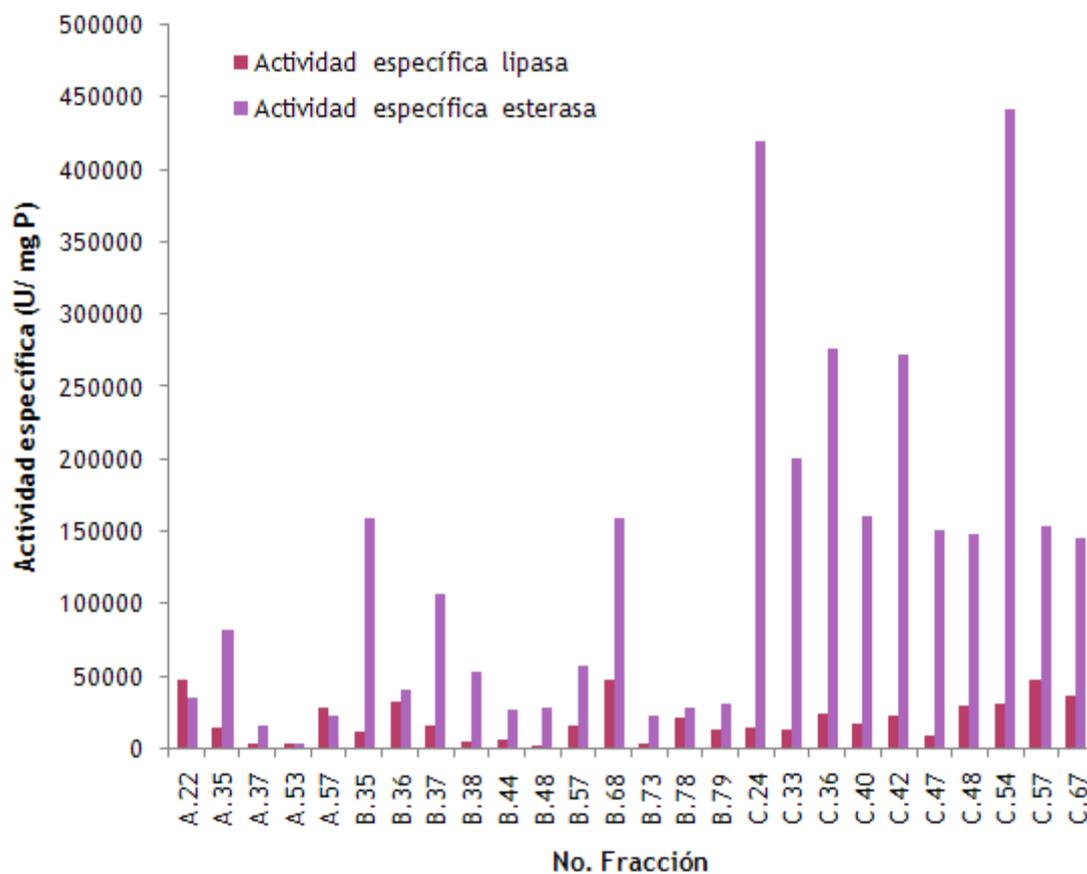
**Figura 22.** Perfil de proteínas después de electroforesis de elución en gel SDS-PAGE. Tinción con plata, primeras fracciones con actividad de esterasa eluídas con la condición C.



**Figura 23.** Electroforesis de elución. Fracciones con actividad enzimática. Sustratos *p*-NFA (esterasa) y *p*-NFL (lipasa).

Las fracciones con actividad destacada de cada condición son las que se observan en la Fig. 23. Las fracciones A.22, A.53, A.57, B.36, B.78 tienen actividad similar sobre los sustratos *p*-NFA y *p*-NFL, por lo que en éstas se encuentra una posible actividad de lipasa, ya que una enzima de este tipo también puede catalizar preferentemente la hidrólisis de un éster de cadena larga y a la vez sustratos con cadena corta (A.22, A.53, A.57) ó no existe una diferencia marcada entre ambas actividades (B.36, B.78).

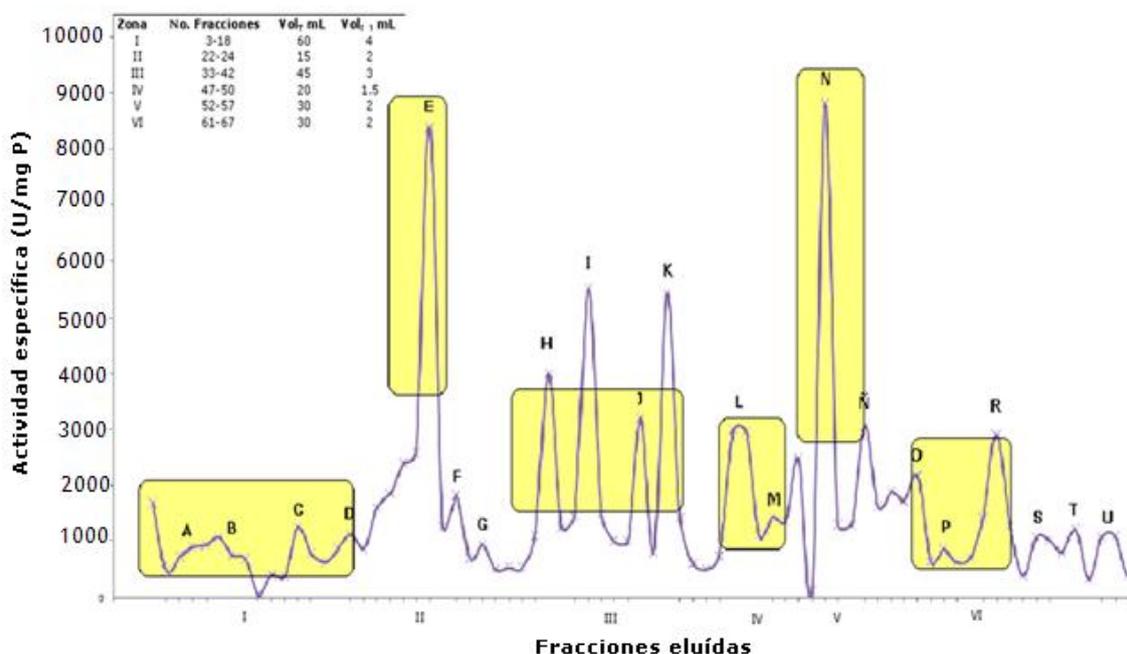
Las fracciones restantes de la Fig. 23, tienen actividad mayoritariamente de carboxilesterasa, se destacan las muestras C.33 y C.40. En la Fig. 24, se puede observar la actividad específica de cada fracción de la Fig. 23.



**Figura 24.** Electroforesis de elución. Separación de fracciones con diferente actividad enzimática

Con la cantidad de proteína y la actividad de cada una de las fracciones caracterizadas, se obtuvo el cromatograma de actividad específica de cada condición (Apéndice 8.3).

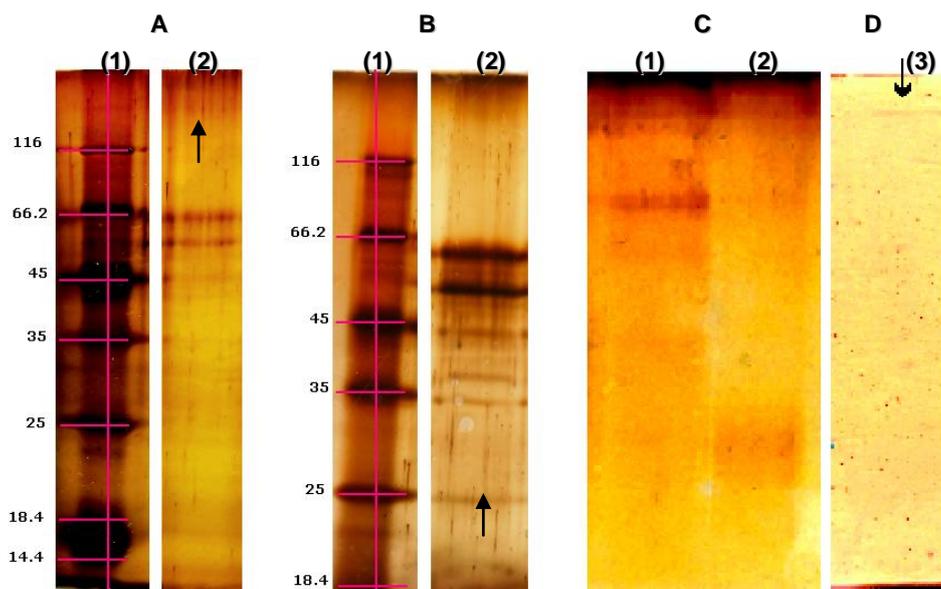
En la Fig. 25 se muestra el cromatograma de actividad específica de la condición C. Destacan picos denominados E y N, pero también se observan intervalos donde las fracciones tienen un perfil similar, tal es el caso de intervalo conformado por los picos H,I,J,K.



**Figura 25.** Cromatograma de actividad específica de la condición C

Se agruparon intervalos de fracciones con actividad específica similar. En la Fig. 25 se muestran 6 intervalos. Se formó un "pool" con cada uno y se ultrafiltraron con una membrana de 10 kDa proteína y en promedio el factor de concentración es de 13.5 veces.

En gel nativo se observa el perfil proteínico de dos grupos de fracciones, pero solo se revela la actividad de un probable agregado (Fig. 26), que corresponde al intervalo de actividad específico V, observado en el cromatograma de la condición C. El perfil proteico de bajo peso molecular observado en carril 2 de panel A corresponde al intervalo de actividad específica II del mismo cromatograma.



**Figura 26. Panel A.** Perfil de proteínas en *gel SDS-PAGE* después de la electroelución. Tinción con plata, carril (1) Marcador LW y carril (2) perfil proteínico del intervalo V de la condición C. **Panel B.** *Gel SDS-PAGE*. Tinción con plata, carril (1) Marcador LW y carril (2) perfil proteínico del intervalo II de la condición C. **Panel C.** Gel nativo. Tinción con plata, carril (1) perfil proteínico del intervalo V de la condición C; carril (2) perfil proteínico del intervalo II de la condición C y tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato en carril (3) intervalo V de la condición C. Las flechas indican las bandas de interés

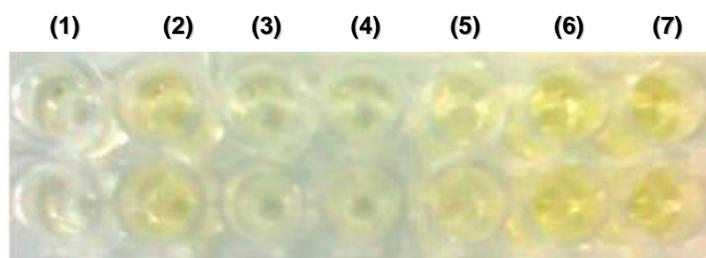
El proceso de purificación separó fracciones con actividades y pesos moleculares diferentes, sin embargo, la cantidad de proteína es insuficiente para una posterior identificación vía espectrometría de masas.

## 5.5 Monitoreo de actividad enzimática.

Se cuantificó la cantidad de proteína y actividad de cada una de las etapas del proceso de purificación de carboxilesterasas. Cada paso debe ser monitoreado para evaluar el rendimiento en la purificación, pureza y actividad específica de cada fracción obtenida.

En la Fig. 27 se presenta el aspecto del ensayo enzimático cualitativo que presentaban las fracciones obtenidas de cada etapa, desde el acondicionamiento de EC (2) hasta el aislamiento y concentración del intervalo de fracciones de electroelución con

actividad específica similar (6-7). Al final de la concentración se observa un incremento importante en la actividad cualitativa. Estos datos se cuantificaron espectrofotométricamente (Tabla 12 y 13).



**Figura 27.** Monitoreo de actividad enzimática. Ensayo de actividad cuantitativa, usando *p*-NFA como sustrato. Micropozo (1) blanco, autohidrólisis del sustrato; (2) Acondicionamiento 0.63 g P/mL; (3) muestra después de Filtración en gel; (4) EC-FG concentrada 10 veces; (5) EC-FG concentrada 100 veces; (6) intervalo II de condición C y (7) intervalo V de condición C.

Con respecto al rendimiento del proceso, se obtuvo un rendimiento muy bajo (0.020% y 0.040%) debido a la baja cantidad de proteína en los intervalos concentrados, sin embargo, el factor de purificación indica una elevada pureza con respecto a las enzimas presentes en EC. En el caso de la actividad de carboxilesterasa se obtuvieron como factores de purificación 25.82 y 76.50. Con respecto a actividad de lipasa se obtuvieron 3.11 y 9.40, esto indica que la enzima purificada presenta una actividad de carboxilesterasa.

### 5.5.1 Monitoreo de actividad enzimática. Tabla

Tabla 12. Monitoreo de actividad enzimática. Caracterización del proceso de purificación. Ensayo de actividad cuantitativa usando *p*-NFA como sustrato

|                                      | mL  | µg P/mL | mgP/mL | U/mL   | U/mL <sub>T</sub> | Mg P <sub>T</sub> | U/mg P   | R (%)  | F     |
|--------------------------------------|-----|---------|--------|--------|-------------------|-------------------|----------|--------|-------|
| <b>Acondicionamiento 0.63 g P/mL</b> | 200 | 638,76  | 0,6388 | 106,5  | 21300,0           | 127,75            | 166,72   | 100,00 | 1,00  |
| <b>1° Columna (FG)</b>               | 600 | 11,63   | 0,0116 | 10,86  | 6518,88           | 6,98              | 934,20   | 5,46   | 5,60  |
| <b>Concentrado 10 veces</b>          | 60  | 134,2   | 0,1342 | 56,72  | 3403,20           | 8,05              | 422,65   | 6,30   | 2,54  |
| <b>Concentrado 100 veces</b>         | 1,2 | 468,7   | 0,4687 | 100,00 | 120,00            | 0,56              | 213,36   | 0,44   | 1,28  |
| <b>Zona II.<br/>Condición C</b>      | 2   | 25,74   | 0,0257 | 110,81 | 221,61            | 0,05              | 4304,83  | 0,040  | 25,82 |
| <b>Zona V.<br/>Condición C</b>       | 2   | 12,60   | 0,0126 | 160,63 | 321,26            | 0,03              | 12753,53 | 0,020  | 76,50 |

Tabla 13. Monitoreo de actividad enzimática. Caracterización del proceso de purificación. Ensayo de actividad cuantitativa usando *p*-NFL como sustrato

|                                      | mL  | µg P/mL | mgP/mL | U/mL   | U/mL <sub>T</sub> | Mg P <sub>T</sub> | U/mg P  | R (%)  | F    |
|--------------------------------------|-----|---------|--------|--------|-------------------|-------------------|---------|--------|------|
| <b>Acondicionamiento 0.63 g P/mL</b> | 200 | 638,76  | 0,6388 | 97,31  | 19462,21          | 127,76            | 152,33  | 100,00 | 1,00 |
| <b>1° Columna (FG)</b>               | 600 | 11,63   | 0,0116 | 15,42  | 9253,73           | 6,98              | 1326,13 | 5,46   | 8,71 |
| <b>Concentrado 10 veces</b>          | 60  | 134,2   | 0,1342 | 16,03  | 961,62            | 8,05              | 119,43  | 6,30   | 0,78 |
| <b>Concentrado 100 veces</b>         | 1,2 | 468,7   | 0,4687 | 169,15 | 202,99            | 0,56              | 360,90  | 0,44   | 2,37 |
| <b>Zona II.<br/>Condición C</b>      | 2   | 25,74   | 0,0257 | 12,20  | 24,41             | 0,05              | 474,11  | 0,040  | 3,11 |
| <b>Zona V.<br/>Condición C</b>       | 2   | 12,60   | 0,0126 | 18,04  | 36,08             | 0,03              | 1432,19 | 0,020  | 9,40 |

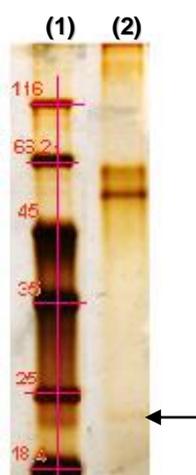
P: proteína; P<sub>T</sub>: proteína total; U: actividad volumétrica (µmol *p*-NFR/min); U<sub>T</sub>: actividad volumétrica total; R: rendimiento; F: factor de purificación

## 5.6 Actividad enzimática residual. Eluatos

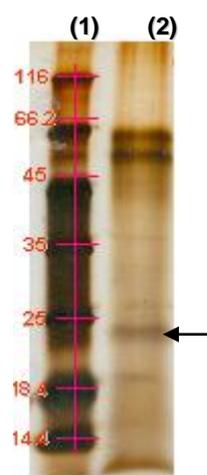
Se sabe que durante la ultrafiltración con Amicon se pierde una cantidad importante de actividad, debido a que el eluato correspondiente da positivo con el ensayo cualitativo de actividad. En este paso se utilizó una membrana con un límite de 10 kDa. El eluato de la concentración de la muestra EC-FG presentó actividad cuantitativa (Tabla 14). En la concentración de la muestra EC-FG se pierden 810  $U_{\text{esterasa}}/\text{mL}$  y 2410.88  $U_{\text{lipasa}}/\text{mL}$  de las originales 6518.88  $U_{\text{esterasa}}/\text{mL}$  y 9253.73  $U_{\text{lipasa}}/\text{mL}$ . La pérdida de enzima se ve reflejada en los rendimientos.

En gel SDS-PAGE aparece una banda por debajo de 25 kDa, posiblemente se trate de la enzima de interés de 21 kDa (Fig. 28). La actividad en gel no se pudo recuperar.

Se concentró al eluato 10 veces más con una membrana de 1 kDa. Su perfil proteínico se encuentra en la Fig. 29. Se confirma una banda con el peso molecular esperado, pero no se recuperó actividad. El eluato es una muestra que fácilmente pierde actividad.



**Figura 28.** Gel SDS-PAGE. Tinción con plata, carril (1) Marcador LW; (2) Eluato de la concentración de EC-FG. La flecha indica la posible presencia de la enzima en la región de interés (21 kDa)



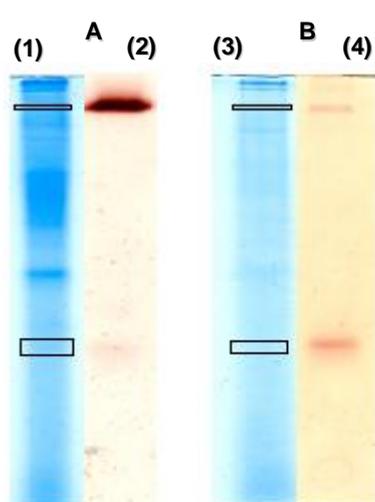
**Figura 29.** Gel SDS-PAGE. Tinción con plata, carril (1) Marcador LW; (2) Eluato de la concentración de EC-FG concentrado 10 veces con una membrana de 1 kDa. La flecha indica la posible presencia de la enzima en la región de interés (21 kDa)

**Tabla 14.** Caracterización del eluato de la muestra EC-FG. Sustratos *p*-NFA y *p*-NFL

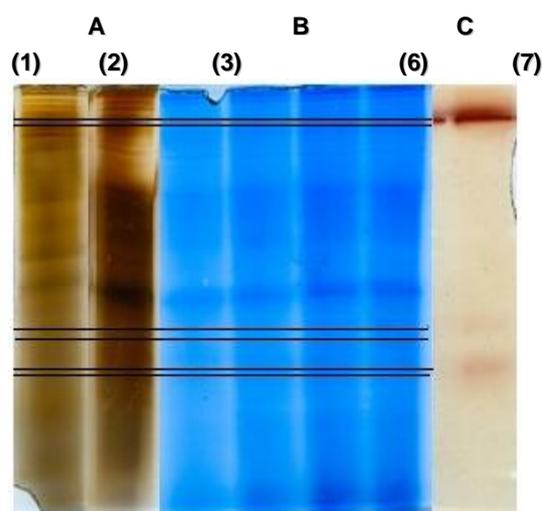
|                     | Vol. mL | μgP/mL | mgP/mL | U/mL | U <sub>T</sub> /mL | mgP <sub>T</sub> | U/mgP  |
|---------------------|---------|--------|--------|------|--------------------|------------------|--------|
| <b><i>p</i>-NFA</b> |         |        |        |      |                    |                  |        |
| Eluato [10 kDa]     | 320     | 9,98   | 0,010  | 2,58 | 824,00             | 3,19             | 258,02 |
| Eluato [1 kDa]      | 70      | 41,78  | 0,042  | 4,66 | 325,99             | 2,92             | 111,46 |
| <b><i>p</i>-NFL</b> |         |        |        |      |                    |                  |        |
| Eluato [10 kDa]     | 320     | 9,98   | 0,010  | 7,53 | 2410,88            | 3,19             | 754,91 |
| Eluato [1 kDa]      | 70      | 41,78  | 0,042  | 6,68 | 467,67             | 2,92             | 159,91 |

## 5.7 Identificación

La muestra EC-FG se utilizó para la secuenciación de las enzimas de interés dado que no se alcanzó la concentración necesaria de proteína después de la electroelución. Se utilizó simultáneamente otra muestra EC-FG-2, perteneciente al lote que almacenó el grupo de trabajo. Ambas muestras comparten el mismo perfil de proteína después de la tinción con Page Blue (Fermentas). Finalmente se observan 2 actividades en gel nativo, sin embargo la muestra EC-FG presenta una actividad mayor en un peso molecular alto y en la muestra EC-FG-2, la mejor actividad se presenta en la banda de menor peso molecular (Fig. 30).



**Fig. 30.** Gel nativo. Panel A. Tinción con Page-Blue; carril (1) EC-FG-2 y tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato, carril (2) EC-FG-2. Panel B. Tinción con Page-Blue; carril (3) EC-FG y tinción de actividad, carril (4) EC-FG



**Fig. 31.** Gel nativo. Panel A. tinción con plata, carril (1) EC-FG; carril (2) EC-FG-2. Panel B. Tinción con Page-Blue; carril (3-6) EC-FG-(A). Panel C. Tinción de actividad de esterasa con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato, carril (7) EC-FG-2.

De acuerdo al perfil de proteína de la muestra EC-FG-2, se observa una concentración mayor con respecto a la de la muestra EC-FG. La actividad de peso molecular alto puede deberse a la agregación de una enzima. En el genoma de *Bacillus pumilus* no existen reportes de esterasas o lipasas de este peso molecular.

Se realizó un gel nativo para cortar y secuenciar las proteínas que mostraban actividad en el zimograma. En el gel se revelaron 3 actividades de diferente peso molecular (Fig. 31), las cuales se mandaron a identificación por LC/MS-MS al Instituto de Biotecnología UNAM .

## 5.8 Identificación por espectrometría de masas

La identificación de proteínas se realizó por LC/MS-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem) permitió detectar varios péptidos.

En el caso de la enzima de bajo peso molecular, cuya secuencia se muestra en la figura 32, corresponde sorprendentemente a la peroxiredoxina YkuU de *B. pumilus* (EC 1.11.1.15), con un peso de 20.6 kDa.

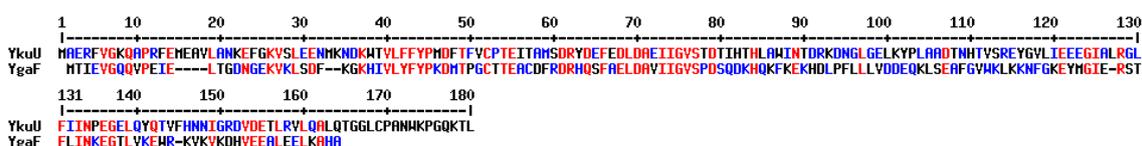
```

1 MAERFVGKQA PRFEMEAVLA NKEFGKVSLE ENMKNDKWTV LFFYPMDFTF
51 VCPTEITAMS DRYDEFEDLD AEIIGVSTDT IHTHLAWINT DRKDNGLGEL
101 KYPLAADTNH TVSREYGVLI EEEGIALRGL FIINPEGELQ YQTVFHNNIG
151 RDVDETLRVL QALQTGGLCP ANWKPGQKTL
    
```

**Figura 32.** Secuencia de peroxiredoxina YkuU Peroxiredoxin YkuU  
[*Bacillus pumilus* SAFR-032]

Alvarez y Galindo (2009), siguiendo, como en este caso, un procedimiento de purificación de esterasas, identificaron la presencia de la peroxiredoxina YgaF, que presenta una equivalencia a la YkU en los aminoácidos 60-80. En aquel momento, consideraron que el resultado podría deberse a un error de metodología y debía

verificarse, dado que no se espera que este tipo de enzimas rompan enlaces éster, razón por la que se llevó a cabo el presente trabajo. En este caso, trabajando con cantidades mayores de enzima, y tras repetirse el resultado en cuanto a tipo de enzima, se decidió explorar la posibilidad de que este tipo de enzimas pueda degradar enlaces éster, considerando el creciente número de casos en los que se ha demostrado promiscuidad enzimática.



**Figura 33.** Alineamiento de secuencia de la peroxiredoxina YkuU con la peroxiredoxina YgaF obtenida anteriormente en el grupo de trabajo

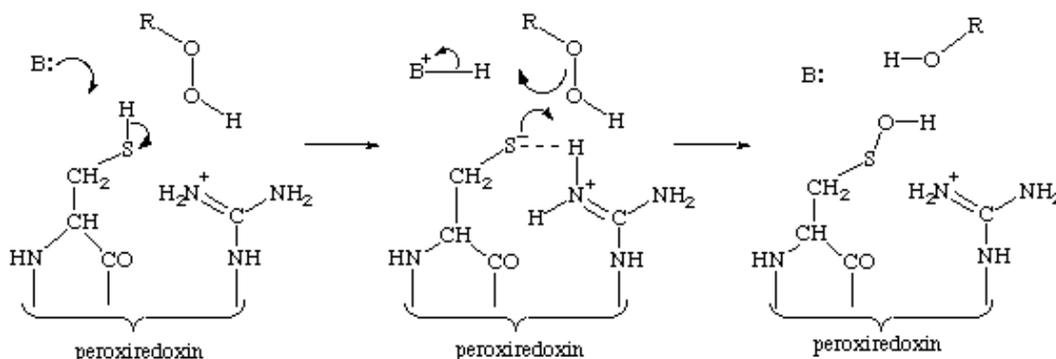
La banda observada por arriba de la enzima de menor peso molecular no se pudo identificar y la actividad observada en mayor peso corresponde a péptidos de 3 diferentes enzimas (sección 5.1.10).

## 5.9 Peroxiredoxinas y promiscuidad de enzimas

Las peroxiredoxinas (Prxs) son una amplia familia de enzimas antioxidantes, protegen a la célula contra peróxidos, e hidroperóxidos orgánicos. Sus funciones se deben al grupo tiol -SH conservado por la cisteína (Lu Jie et. Al, 2008). Los mismos autores señalan que la producción de peroxiredoxinas en el medio de cultivo se da como respuesta stress oxidativo. En el presente trabajo, el microorganismo se cultivó a alta temperatura de incubación (50°C), lo que también podría producir una condición de stress.

Las peroxiredoxinas, actúan en dos etapas. En la primera se realiza una ruptura de enlace para dar paso a la formación de un producto R-OH (Fig. 34). Se puede decir que, por analogía, es en

esta etapa donde el sustrato de naturaleza éster podría ser hidrolizado para posteriormente producirse *p*-Nitrofenol (R-OH).



**Figura 34.** 1era etapa del mecanismo enzimático de las peroxiredoxinas, el residuo redox de Cys realiza un ataque nucleofílico al hidropéroxido, como resultado se da la formación de un intermediario reactivo denominado ácido sulfénico R-SOH.

El término de promiscuidad de enzimas está relacionado con la evolución catalítica de diferentes enzimas, es decir, actividades secundarias no nativas que permiten nuevas funciones en catálisis.

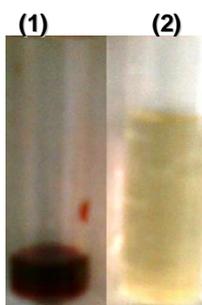
Las actividades promiscuas en la mayoría de los casos, implican el mismo sitio activo de una actividad primaria, dado el potencial de los sitios de interacción y grupos reactivos.

El sitio activo de las peroxiredoxinas está conformado por Arg, Thr y Pro. En el caso de  $\alpha/\beta$  hidrolasas, la tríada catalítica está conformada por Ser, Hys y un residuo ácido Asp ó Glu. Cabe mencionar que el grupo reactivo de Thr es el mismo que el de Ser y la función de la Hys y Arg en ambos mecanismos enzimáticos es la misma. Debido a estas similitudes en los grupos reactivos del sitio activo de la peroxiredoxina identificada, se podría pensar que la enzima identificada puede llevar a cabo la reacción de hidrólisis de ésteres. De ser así, la peroxiredoxina YkuU posee un gran potencial biocatalítico.

Como se mencionó en el marco teórico ya se han encontrado enzimas con actividad promiscua de carboxilesterasa utilizando como sustratos ésteres de  $\alpha$ -naftilo ó *p*-nitrofenilo con ácidos grasos (Díaz-

Rodríguez & Davis, 2011; Liu et. al, 2007). Sin embargo, no existen reportes de peroxiredoxinas con esta actividad. Únicamente se ha reportado una anhidrasa carbónica con actividad de carboxilesterasa que por evolución dirigida se modificó a peroxidasa (Okrasa & Kazlauskas, 2006; Höst et. al, 2006). También existen reportes de carboxilesterasas con actividad de peroxidasa (Glasner et. al, 2007).

Con el fin de evaluar la hipótesis de que existieran en el extracto enzimático estas enzimas, se realizaron ensayos cualitativos para evidenciar actividad. El primero es un ensayo de peroxiredoxinas (Wassmann et. al, 1999), donde el  $H_2O_2$  es el agente oxidante que propicia la formación del complejo  $[Fe(SCN)(H_2O)_5]^{2+}$  (rojo).



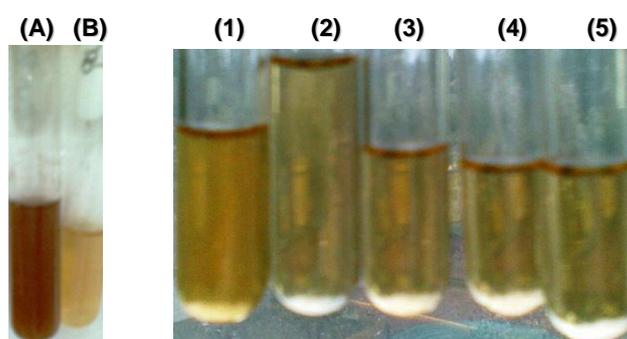
**Figura 35.** Determinación de actividad cualitativa de actividad de peroxiredoxina. (1) control positivo  $H_2O_2$  50  $\mu M$ ; (2) Extracto crudo acondicionado para la filtración en gel

Las pruebas se realizaron con el extracto crudo EC. En la Fig. 35 se observa en presencia de  $H_2O_2$  se forma un complejo colorido. Si en el extracto crudo (panel 2) hay peroxiredoxina, éste agente convierte en  $H_2O$ , por lo que no puede ocurrir la oxidación de  $Fe^{2+}$ . y, por lo tanto, un cambio de color. Esta prueba indica que cualitativamente se puede demostrar la presencia de peroxiredoxina.

En un segundo ensayo, se evaluó la posibilidad de modificación de un sustrato susceptible a oxidación y reducción, con un método que permitiría cuantificar la magnitud del cambio pues puede detectarse espectrofotométricamente. Se emplearon dos diferentes: guayacol y bencidina. La oxidación del guayacol se debe a la

formación de un complejo de color rojo. La muestra dio negativo a esta prueba, no ocurrió oxidación posiblemente porque el mecanismo catalítico las peroxiredoxinas requiere un ambiente reductor.

En el caso de la bencidina se observa un cambio en las mezclas de reacción (Fig. 36), sin embargo para que la prueba sea positiva, la mezcla se debe tornar de color azul, el cambio de color en la figura 35 se debe a que el complejo de bencidina no se formó ya que la peroxiredoxina no lleva a cabo oxidaciones. Las absorbancias de cada muestra, se encuentran en la tabla 15..



**Figura 36.** Ensayo de actividad de peroxidasa usando bencidina como sustrato. (A) Control positivo, peroxidasa de EC de brócoli (exceso); (B) EC acondicionado para Filtración en gel; (1) EC 300  $\mu$ L; (2) EC 100  $\mu$ L; (3) Pellet de EC-FG centrifugada; (4) intervalo V condición C y (5) intervalo II condición C.

Tabla 15. Ensayo de actividad de peroxidasa. Sustrato bencidina

| No. Fig. 35 | Muestra   | Abs 450 nm |
|-------------|---|------------|
| 1           | EC acondicionado para Filtración en gel         | 1.029      |
| 2           | EC acondicionado para Filtración en gel diluido | 0.456      |
| 3           | Pellet de EC-FG centrifugada                    | 0.453      |
| 4           | intervalo V condición C                         | 0.387      |
| 5           | intervalo II condición C                        | 0.396      |

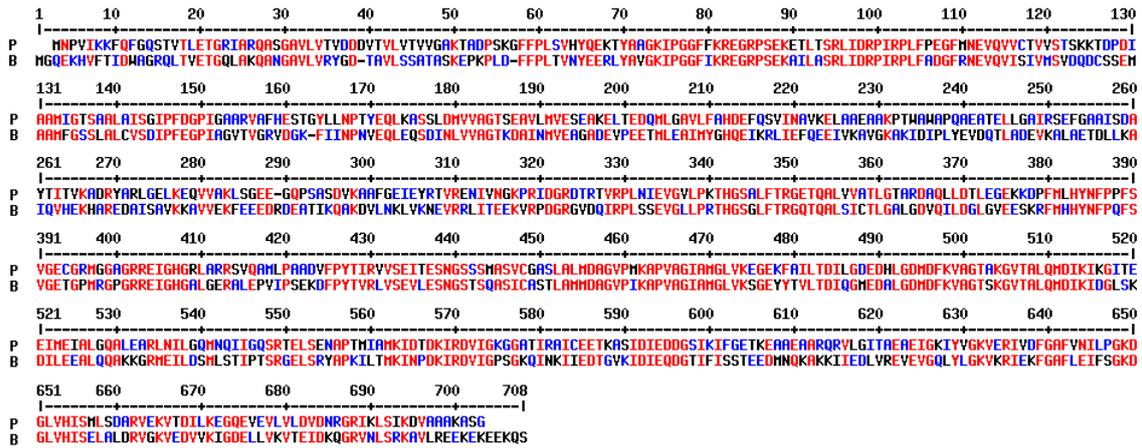
Se puede apreciar que no existe una relación lineal entre la cantidad de proteína presente en cada muestra (Tabla 12) y los valores de absorbancia. De acuerdo a estos resultados, la actividad de oxido-reducción podría estar presente en la muestra, sin embargo es necesario profundizar en este estudio y realizar ensayos con

diferentes sustratos específicos para comprobar la actividad que sugiere la secuencia identificada.

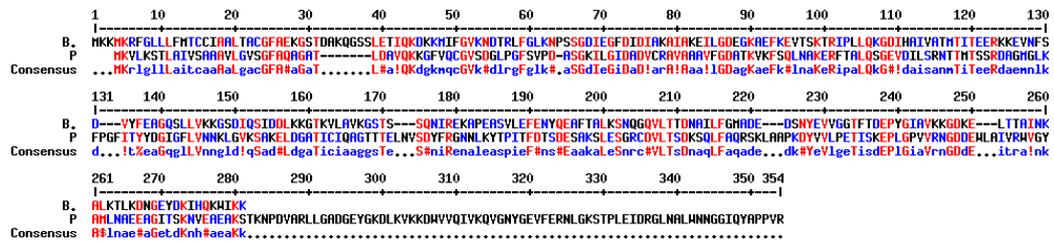
### **5.10 Identificación de la banda de alto peso molecular**

Se identificaron péptidos correspondientes a banda de alto peso molecular que presentaba actividad enzimática y sus secuencias se muestran en el Anexo 8.4. Se encuentra homología con la Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa [*Pseudomonas fluorescens* WH6] cuyo peso es 75.1 kDa y su dímero es de 150.2 kDa. El resultado fue obtenido con The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Además, la secuencia se buscó en el genoma de *Bacillus pumilus* (Fig. 37). Al parecer esta enzima también posee actividad promiscua de esterasa, debido a la similitud de la naturaleza del enlace éster de los sustratos utilizados con la del enlace fosfodiéster de los nucleótidos.

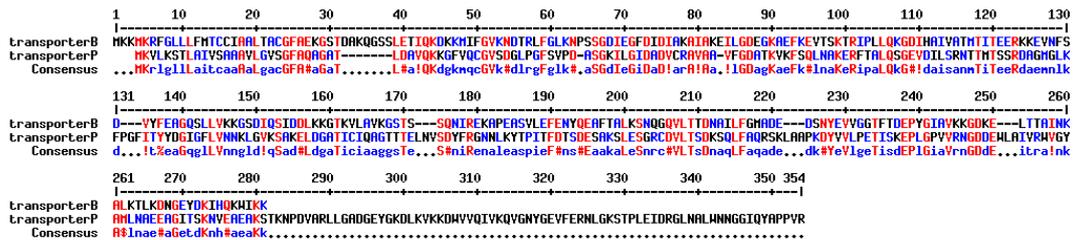
También se encontró homología a una subunidad alfa de la succinilCoA sintetasa y a un transportador ABC (Fig. 38 y 39). En estos casos, sería más difícil explicar la actividad promiscua de esterasa. En el caso del transportador ABC, existen reportes de que se requiere para la manifestación y excreción de actividad esterasa en *Pseudoalteromonas* (Dlugolecka et. al, 2008), y es posible que la actividad detectada en el zimograma se deba a su asociación con alguna otra esterasa.



**Figura 37.** Alineamiento de secuencias de la enzimas de alto peso molecular identificada por LC/MS-MS. (Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa [Pseudomonas fluorescens WHF]: P y Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa [Bacillus pumilus SAFR-032]: B)



**Figura 38.** Alineamiento de secuencias de los péptidos identificados en la enzima de alto peso molecular. La secuencia corresponde a una subunidad alfa de la succinilCoA sintetasa



**Figura 39.** Alineamiento de secuencias de los péptidos identificados en la enzima de alto peso molecular. La secuencia corresponde a un transportador ABC

Cabe señalar que los resultados obtenidos pueden explicarse también por las limitaciones propias del procedimiento. No se partió de una preparación purificada a homogeneidad, el corte de las bandas puede incluir varias proteínas de peso molecular similar. Por

lo tanto, se requeriría de una preparación de mayor grado de pureza, procedente de un nuevo protocolo de purificación, o del aislamiento, clonación y expresión de los genes correspondientes para evaluar la actividad esterasa, además de la propia de cada enzima.

Los resultados obtenidos ofrecen la posibilidad de emplear nuevas enzimas en biocatálisis. Estudios de estructura de esta proteína, su purificación a homogeneidad y su clonación permitirán explorar mejor el potencial biocatalítico de la misma.

## Capítulo VI

### Conclusiones

#### 6.1 Conclusiones

- La cromatografía de filtración en gel no fue una técnica eficiente, para separar proteínas.
- La concentración de la muestra EC-FG permitió evidenciar la presencia de 3 proteínas de diferente peso molecular con actividad enzimática sobre sustratos con éster de ácidos carboxílicos.
- La ultrafiltración con Amicon se traduce en una pérdida de actividad enzimática considerable. El eluato correspondiente a la concentración de la muestra EC-FG presentó actividad y en su perfil proteínico se observa la presencia de una banda con un peso molecular por debajo de los 25 kDa, muy cercano al peso de la enzima de interés (21 kDa).

- La electroforesis de elución es más eficiente en cuanto a la separación de enzimas con base en el peso molecular. Sin embargo, la cantidad de proteína que se obtiene mediante esta técnica es considerablemente baja.
- Las fracciones A.22 (118.69 U/mL), A.53 (66.81 U/mL), A.57 (83.87 U/mL), B.36 (265.10 U/mL), B.78 (261.19 U/ mL) poseen actividad preferentemente de lipasa y las fracciones C.33 (675.30 U/mL) y C.40 (613.90 U/mL) presentan actividad de carboxilesterasa preferentemente.
- La secuenciación por LC/MS permitió identificar una Peroxiredoxina YkuU de 20.6 kDa y una Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa de 75.1 kDa de *B. pumilus*, A pesar de que el extracto crudo fue producido en un medio optimizado para la producción de una lipasa de 21 kDa, cuya presencia se corroboró por actividad enzimática en zimogramas.
- Se logró demostrar la presencia de peroxiredoxina en el extracto crudo, por lo que se puede sugerir la promiscuidad enzimática como explicación a la actividad esterasa presente en el extracto.

## 6.2 Perspectivas

- Evaluar protocolos de purificación diferentes, con otras técnicas de separación como cromatografía hidrofóbica, o modificación de condiciones de electroforesis de elución para lograr una separación más eficiente de enzimas y llegar a obtener una preparación purificada a homogeneidad con actividad de lipasa o esterasa.
- Clonar la peroxiredoxina de *Bacillus pumilus* GMA1 para su posterior caracterización fisicoquímica, verificación de su actividad promiscua y su posible aplicación en reacciones químicas.
- Clonar la Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa y determinar si tiene actividad promiscua, o la subunidad alfa de la succinilCoA y el transportador ABC.

## Capítulo VII Bibliografía

1. Abramic M., Jasenka P., Korica T., Lescic I., Saenger W. & Vitale L. (1999). ***Purification and properties of extracellular lipase from Streptomyces rimosus***. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 25. Pp. 522–529.
2. Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S. and Taipa M.A. (1992). ***Purification of lipases***. Journal of Biotechnology, Vol. 26. Pp. 111- 142.
3. Alberghina L. & Lotti M. (2007). ***Lipases: molecular structure and function***. Industrial Enzymes, Pp. 263–281.
4. Aldridge W.N. (1993). ***The esterases: perspectives and problems***. Chem. Biol. Interactions, Vol. 87. Pp 5-13.
5. Allen H.J., ReznickA. Z. & Winzler R.J. (1973). ***Sequential elution of proteins in small volumes by preparative polyacrylamide gel electrophoresis***. Analytical Biochemistry, Vol. 52. Pp. 395-401.
6. Akaiwa S. (1979). ***Studies on preparative electrophoresis apparatus: some eminent advantages of the elution chamber sandwiched between gel column halves***. Analytical Biochemistry, Vol. 92. Pp. 205-212.
7. Ateslier Z., Burcu B. & Metin K. (2006). ***Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a***

- thermophilic Bacillus sp.*** Enzyme and Microbial Technology, Vol. 38. Pp. 628–635.
8. Babtie A., Tokuriki N. & Hollfelder F. (2010). ***What makes an enzyme promiscuous?***. Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 14. Pp. 200–207.
  9. Banat I.M., Marchant R. & Rahman T.J.(2004): ***Geobacillus debilis sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of Bacillus pallidus to Geobacillus pallidus comb. nov.*** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 54. Pp. 2197-2201.
  10. Baptist J. N. & Goldman W. F. (1979). ***Isoelectric point electrophoresis: a new technique for protein purification.*** Journal of Chromatography, Vol 179. Pp. 330-332.
  11. Bartlett G.J. et. al (2005). ***Using a library of structural templates to recognise catalytic sites and explore their evolution in homologous families.*** J. Mol. Biol., Vol. 374. Pp. 565-581.
  12. Barton D.G., Biscardi J., Gines M., Iglela E. & Soled S. (1997). ***Bifunctional pathways in catalysis by solid acids and bases.*** Catalysis Today, Vol. 38. Pp. 339-360.
  13. Bejar S., Ellouz-Chaabouni S., Jaouadi B. & Rhimi M. (2008). ***Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Bacillus pumilus CBS with high catalytic efficiency.*** Biochimie, Vol. 90. Pp. 1291-1305.
  14. Berg J.M., Tymoczko J. & Stryer L. (2007). ***Bioquímica.*** Reverté S.A., Barcelona, España. Pp. 46-49.
  15. Blais, R. & Marceau N. (1975). ***A practical design of an elution system for preparative electrophoresis in polyacrylamide gel.*** Analytical Biochemistry, vol 68, Pp. 17-25.
  16. Bornscheuer U.T., Gollin A., Hidalgo A., Hitchman T., Lyon J., Rodríguez-Ordoñez G. & Weiner D. (2005). ***Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters.*** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 36. Pp. 8–13.
  17. Bornscheuer U.T. (2002). ***Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis.*** FEMS Microbiology Reviews, Vol. 26. Pp. 73-81.

18. Bornscheuer U.T. et. al, (2002). **Optimizing lipases and related enzymes for efficient application**. TRENDS in Biotechnology, Vol. 20. Pp. 433-437.
19. Bornscheuer Uwe T. and Kazlauskas Romas J. (2004). **Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways**. Angew. Chem. Int., Vol. 43. Pp. 6032 –6040.
20. Bricogne G., Bott R., Day A.G., Power S., Vonrhein C., & Shaw A. (2002). **A novel combination of two classic catalytic schemes**. J. Mol. Biol, Vol. 320, Pp. 303-309.
21. Burton S., Guebitz G.M., Kudanga T. & Nyanhongo G.S. (2011). **Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review**. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 48. Pp. 195–208.
22. Bustos, I. (1995). **Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo**. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM.
23. Bustos-Jaimes, I., Mora-Lugo, R., Calcagneo, M. & Farrés, A. (2010). **Kinetic studies of Gly 28:Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: changes of Kcat and thermal dependence**. BBA Proteins and Proteomics, 180:12; 2222-2227
24. Chun-Sheng S. & Chin-Shuo H. (2003). **Lipase-catalyzed enantioselective esterification of (S)-naproxen hydroxyalkyl ester in organic media**. Biotechnology Letters 25: 413–416.
25. Córdova J; et al. (2008). **Esterase activity of bovine serum albumin up to 160 °C: A new benchmark for biocatalysis**. Enzym. Microb. Technol. Vol. 42(3). Pp. 278-283.
26. Costa-Ferreira M., Duarte J. & Sá-Pereira P. (2000). **Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus sp. CCM1 966***. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 27, Pp. 95–99.
27. Davidson W., Giri B., Saxena R.K. & Sheoran A. (2003). **Purification strategies for microbial lipases**. Journal of Microbiological Methods, Vol. 52. Pp. 1–18.

28. Departamento de programas audiovisuales, FQ, UNAM (2010). <http://depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPamm1.html>  
Pagina visitada el 26 de Febrero de 2011.
29. Devlin, T.M. (2006). **Bioquímica. Aplicaciones clínicas**. Reverté S.A., Barcelona, España. Pp 143-144.
30. Díaz-Rodríguez A. & Davis B.G. (2011). **Chemical modification in the creation of novel biocatalysts**. Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 15. Pp. 211-219.
31. Dlugolecka A., Ciemlijski H., Turkiewicz M., Biaikowska A. & Kur J. (2008). **Extracellular secretion of *Pseudoalteromonas sp.* Cold-adapted esterase in *Escherichia coli* in the presence of *Pseudoalteromonas sp.* Components of ABC transport system**. Protein expression and purification, Vol. 62. Pp. 179-184.
32. Dordick J.S. (1989). **Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents**. Enzyme Microb. Technol., Vol. 11. Pp. 194-211.
33. Douglas K.T. (1992). **Alteration of enzyme specificity and catalysis**. Current Opinion in Biotechnology, Vol. 3. Pp. 370-377.
34. Eggert T. et al. (2002). **Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis***. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 26: 37-46.
35. Erdmann H., Kieslich K. & Vorderwillbecke T. (1992). **Comparison of lipases by different assays**. Enzyme Microb. Technol., Vol. 14. Pp. 631-639.
36. Fariha H., Amer A. & Abdul H. (2009). **Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review**. Biotechnology Advances, Vol. 27. Pp. 782-798.
37. Fernandez-Lafuente R. (2009). **Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation**. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 45, Pp. 405-418.
38. Forman H.J. (2005). **Introduction to serial reviews on peroxiredoxins**. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 38. Pp. 1411-1412.
39. Fuentes S. & Díaz G. (1997). **Catálisis enzimática** [http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/059/htm/sec\\_7.htm](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/059/htm/sec_7.htm). Página visita el 5 de marzo de 2011.

40. Gandour R.D. (1981). ***On the importance of orientation in general base catalysis by carboxilate***. Bioorganic chemistry, Vol. 10. Pp. 169-176.
41. García-Garibay M., Quintero-Ramírez R., López-Munguía A. (2004). ***Biotecnología alimentaria***. 5ta ed. Limusa S.A. de C.V. México, D.F. Pp. 103-115.
42. Ghélis C., Perahia D. & Yon, J.M. (1998). ***Conformational dynamics and enzyme activity***. Biochimie, Vol. 80. Pp. 33-42.
43. Gioia J. et. al, (2007). ***Paradoxical DNA Repair and Peroxide Resistance Gene Conservation in Bacillus pumilus SAFR-032***. PLoS one, [www.plosone.org](http://www.plosone.org) Vol 9. Pp. 1-10.
44. Glasner M., Gerlt J. & Babbitt P.C. (2007). ***Mechanisms of protein evolution and their application to protein engineering***. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology Vol. 75. Pp. 193-239.
45. Gordon N.F., Cooney C.L. & Moore Christine M. V. (1990). ***An overview of continuous protein purification processes***. Biotech. Adv., Vol. 8. Pp. 741-762.
46. Guncheva M. & Zhiryakova D. (2011). ***Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases***. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 68. Pp. 1-21.
47. Gupta N., Gupta R. & Rathi P. (2004). ***Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties***. Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 64. Pp. 763-781.
48. de Haën, C. (1987). ***Molecular weight standards for calibration of gel filtration and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: Ferritin and apoferritin***. Analytical Biochemistry, Vol. 66, Pp 235-245.
49. Harris, D.C. (2007). ***Análisis químico cuantitativo***. 3ra. Ed. Reverté S.A., Barcelona, España. Pp 641-644.
50. Holliday G.L., Mitchell J. & Thornton J.M. (2009). ***Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis***. J. Mol. Biol., Vol. 390. Pp. 560-577.

51. Holmquist M. (2000). ***Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms***. Current Protein and Peptide Science, Vol. 1, No. 2, Pp. 209-235.
52. Höst G. et. al, (2006). ***Redesign of human carbonic anhydrase II for increased esterase activity and specificity towards esters with long acyl chains***. Biochimica et Biophysica Acta 1764 Pp. 1601-1606.
53. Houde A., Kademi A. & Leblanc D. (2004). ***Lipases and Their Industrial Applications***. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 118. Pp. 155-170.
54. Ibáñez A. (2007). ***Optimización de un medio de cultivo para la obtención de lipasa de Bacillus pumilus GMA1***. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM.
55. Jaeger K-E., Dijkstra B.W. & Reetz, M.T. (1999). ***Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases***. Annu. Rev. Microbiol, Vol. 53. Pp. 315-51.
56. Jie L., Yang F., You Li, Xinxin Z., Bin Xia & Changwen J. (2008). ***Reversible conformational switch revealed by redox structures of Bacillus subtilis thiol peroxidase***. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 373. Pp. 414-418.
57. Ju-A. K., Sunjoo P., Kangwha K., Sue Goo Rhee & Won Kang S. (2005). ***Activity assay of mammalian 2-cys peroxiredoxins using yeast thioredoxin reductase system***. Anal. Biochemistry, Vol. 338. Pp. 216-223.
58. Koehl P., Le Q. & Pollastri, G. (2009). ***Structural alphabets for protein structure clasification: a comparison study***. J. Mol. Biol., Vol. 387. Pp 431-450.
59. Kumar M., Saxena A., Tripathi B.P. & Shahi V.K. (2009). ***Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview***. Advances in Colloid and Interface Science, Vol. 145. Pp. 1-22.
60. Kumar R. et. al, (2011). ***Identification of variables and value optimization for optimun lipase Production by Bacillus pumilus RK31 using statical methodology***. New Biotechnology, Vol. 28. Pp. 65-71.

61. Lee D.J & Whiteley C.G.(2006). **Enzyme technology and biological remediation**. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 38. Pp. 291–316.
62. Lehninger, A L., Nelson, L. & Cox, I M (2005). **Principios de bioquímica**. 4ª ed., Editorial Omega. Pp. 1232.
63. Liu P et. al, (2007). **Crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est55 and its activation of prodrug CPT-11**. J Mol. Biol., Vol. 367. Pp. 212-223.
64. McMurry Jhon (2008). **Química Orgánica**. 7ª ed., Cengage Learning Editores S.A. de C.V., México D.F. Pp. 1352.
65. Makimoto, S. & Taniguchi, Y. (1986). **Volume profiles of the reaction mechanism of esterase: evidence of a single-proton-transfer mechanism**. Physica, Vol 139. Pp 853-859.
66. Mastropaolo W. & Yourno J. (1981). **An Ultraviolet spectrophotometric assay for  $\alpha$ -naphthyl acetate and  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterases**. Analytical Biochemistry, Vol. 115. Pp. 188-193.
67. MBMB (2005). Methods for working with proteins. Pagina visitada el 25 de Febrero de 2011.
68. Mnisi S.M., Louw M.E. & Theron J. (2005). **Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11**. Current Microbiology, Vol. 50. Pp. 196-201.
69. Morrison & Boyd (1990). **Química Orgánica**. 5ta ed., Addison-Wesley Iberoamericana, Estados Unidos. Pp. 1323,1327,1333-34,1342-43.
70. Mulvey C. & Ohlendieck K. (2003). **Use of continuous-elution gel electrophoresis as a preparative tool for blot overlay analysis**. Analytical Biochemistry, Vol. 319. Pp. 122–130.
71. Nazina T.N., et. al, (2001). **Taxonomic study of aerobic thermophilic *Bacillus***. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, Vol. 51. Pp 433–446.
72. Neklyudov, A.D. & Ivankin A.N. (2002). **Biochemical processing of fats and oils as a means of obtaining lipid products with improved biological and physecochemical properties: a review**. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 38. Pp. 399-409.

73. Nevalainen T.J. (2010). ***1-Cysteine peroxiredoxin: A dual-function enzyme with peroxidase and acidic Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 activities.*** Biochimie, Vol. 92. Pp. 638-644.
74. Okraza K. & Kazlauskas R.J. (2006). ***Manganese-substituted carbonic anhydrase as a new peroxidase.*** Chem. Eur. J. Vol. 12. Pp. 1587 – 1596.
75. Page, M. I. (1979). ***The principles of enzymatic catalysis.*** Int. J. Biochemistry, Vol 10. Pp. 471-476.
76. Parmjit, P .S, Satwinder S. Marwaha. Harish K. Chopra (2010). ***Enzymes in food processing: fundamentals and potential applications.*** International Publishing House. New Delhi, India. Pp. 23-29.
77. Peerzada K. et. al, (2006). ***A novel esterase from Bacillus subtilis (RRL 1789): Purification and characterization of the enzyme.*** Protein Expression and Purification, Vol. 45, Pp. 262–268.
78. Peña-Montes C., Gonzalez A., Castro-Ochoa D. & Farrés, A., (2008). ***Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from Aspergillus nidulans.*** Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 78(4), Pp. 603-612.
79. Primo, E. (2007). ***Química Orgánica básica y a aplicada: de la molécula a la industria.*** Reverté, Tomo II. Pp. 1019.
80. Qing Huang, Yong P., Xin Li, Wang H. & Yizheng Z. (2003). ***Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease with Dehairing Function from Bacillus pumilus.*** Current Microbiology, Vol. 46. Pp. 169–173.
81. Rodríguez M.I., R. Filho M. & Maugeri F. (1993). ***Optimization of a process of continuous enzyme purification by surface response analysis.*** Food Control, Vol. 4, Pp. 144-148.
82. Taiwo O., Akanbi et. al, (2011). ***Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic Bacillus subtilis NS 8.*** New Biotechnology, Vol. 00, Pp. 1-8.

83. Sánchez-Moreno, et al. (2009). ***From Kinase to Cyclase: An Unusual Example of Catalytic Promiscuity Modulated by Metal Switching***. *Chem. Bio. Chem.*, Vol. 10. Pp. 225-229.
84. Sroga G. E a& Dordick J.S. (2001). ***Generation of a broad esterolytic subtilisin using combined molecular evolution and periplasmic expression***. *Protein Engineering*. Vol. 14(11) Pp. 929-937.
85. Sue Goo Rhee, Ho Zoon Chae & Kanghwa K. (2005). ***Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling***. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 38. Pp. 1543– 1552.
86. Tingyue Gua, Kuang-Hsin Hsu, Mei-Jywan Syu (2003). ***Scale-up of affinity chromatography for purification of enzymes and other proteins***. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 33, Pp. 430–437.
87. Vázquez-Contreras E. (2003). Bioquímica y biología molecular en línea. <http://bq.unam.mx/~evazquez>. Página visitada el 28 de Febrero de 2011.
88. Vorderwülbecke T., Kieslich K. & Erdmann H. (1992). ***Comparison of lipases by different assays***. *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 14. Pp. 631-639.
89. Wang J. et. al (2009). ***An intracellular esterase from Bacillus cereus catalyzing hydrolysis of 1-chloro-3-(1-naphthyloxy)-2-acetoxipropanol***. *Ann Microbiol*, Vol. 60. Pp. 59-64.
90. Wohlgemuth R. (2010). ***Biocatalysis –key to sustainable industrial chemistry***. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 21. Pp. 713–724.
91. Wong P. (2001). ***Lipasa termoestable de Bacillus pumilus GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades***. Tesis de licenciatura, Facultad de Química. UNAM.
92. Wood Z.A., Schroöder E., Harris J. R. & Poole L.B. (2003). ***Structure, mechanism and regulation of peroredoxins***. *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol.2 ¿8 No.1. Pp. 32-40.

## Capítulo VIII

### Apéndices

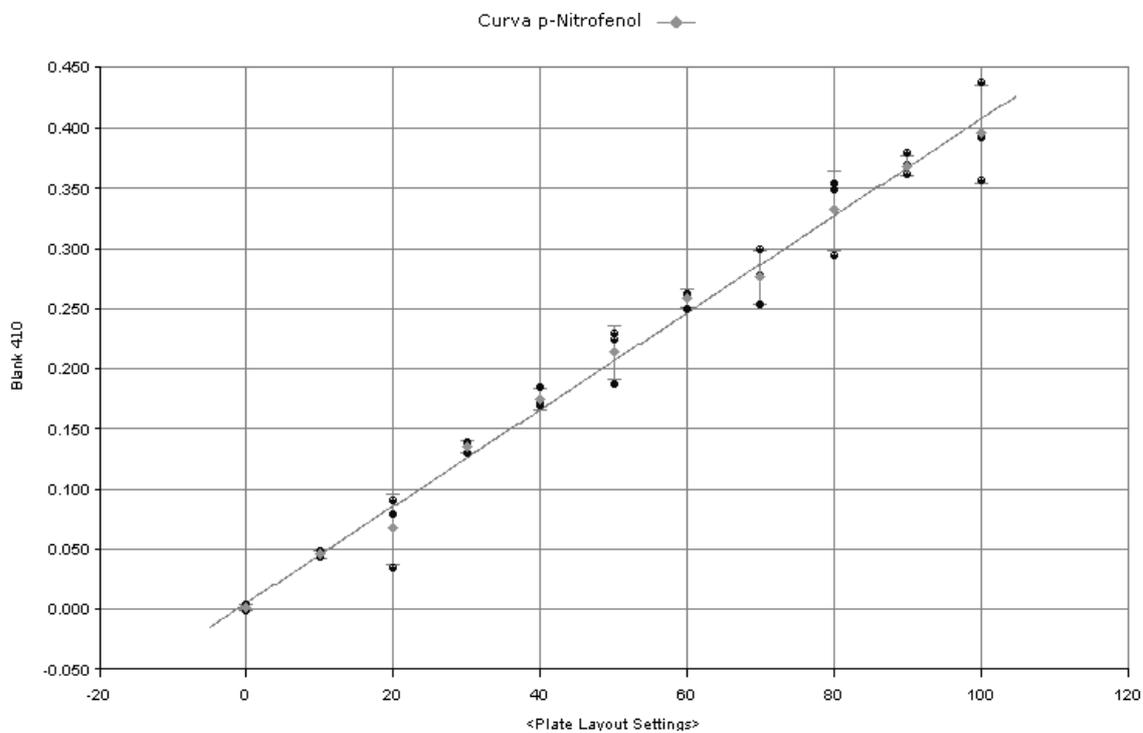
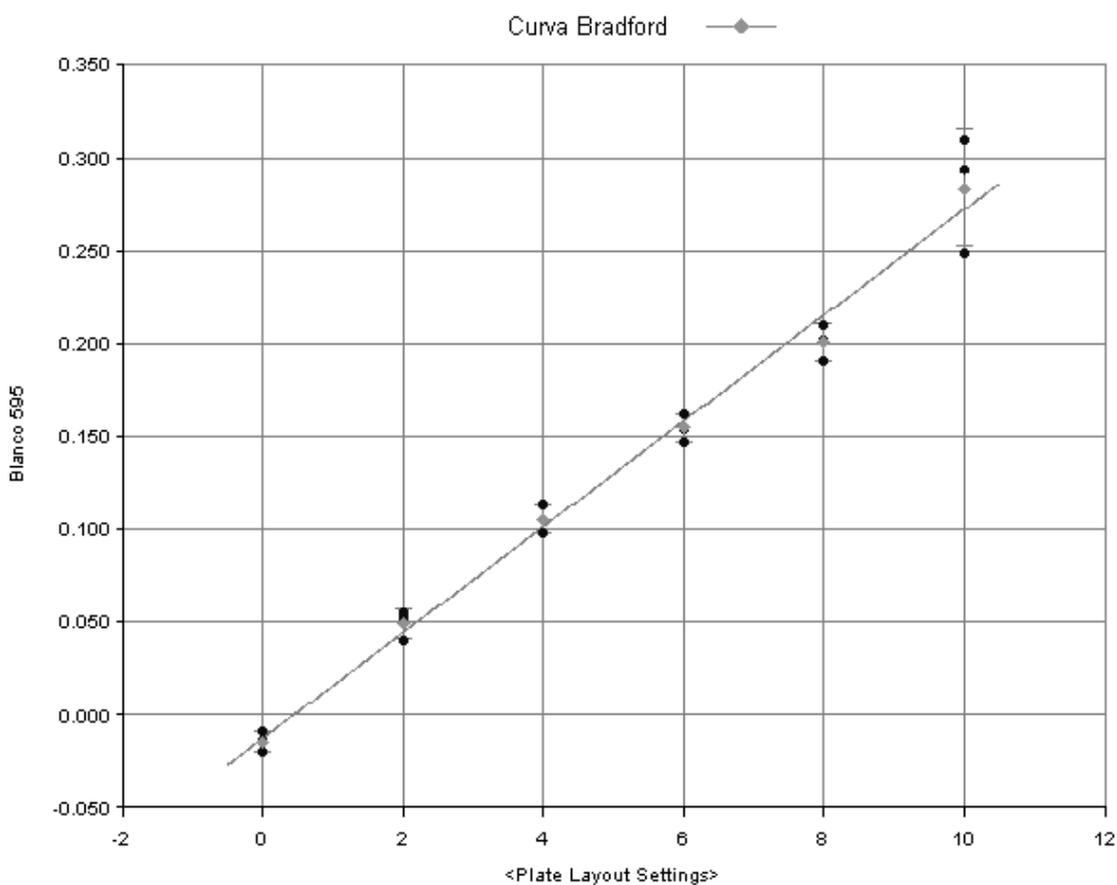
#### 8.1 Curvas de calibración

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford en microplaca. Se utilizó una curva patrón de 0-10  $\mu\text{g}$  de proteína, en este caso se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como sustancia de referencia, las lecturas son registradas a 595 nm.

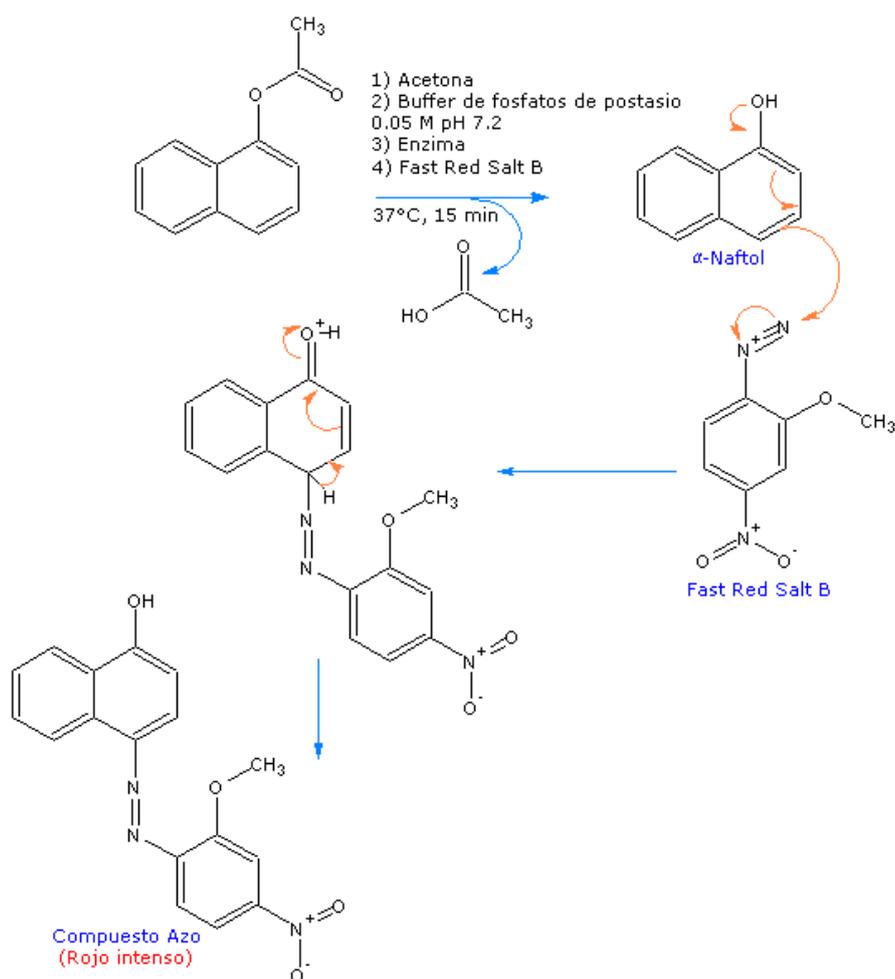
Para la determinación de actividad enzimática, la sustancia de referencia fue *p*-Nitrofenol de 0-100 mM, las lecturas se miden a 410 nm. El ensayo fue estandarizado usando cantidades conocidas de EC para confirmar la reproducibilidad y repetibilidad del método.

Tabla 15. Datos de las curvas de los ensayos base

| Curva                | Formula de la curva | A       | B       | Coefficiente de correlación |
|----------------------|---------------------|---------|---------|-----------------------------|
| Bradford (BSA)       | $Y=A*X+B$           | 0,0285  | -0,0124 | 0,993                       |
| <i>p</i> -Nitrofenol | $Y=A*X+B$           | 0.00402 | 0.00554 | 0.994                       |



## 8.2 Ensayo cualitativo de actividad enzimática. Mecanismo

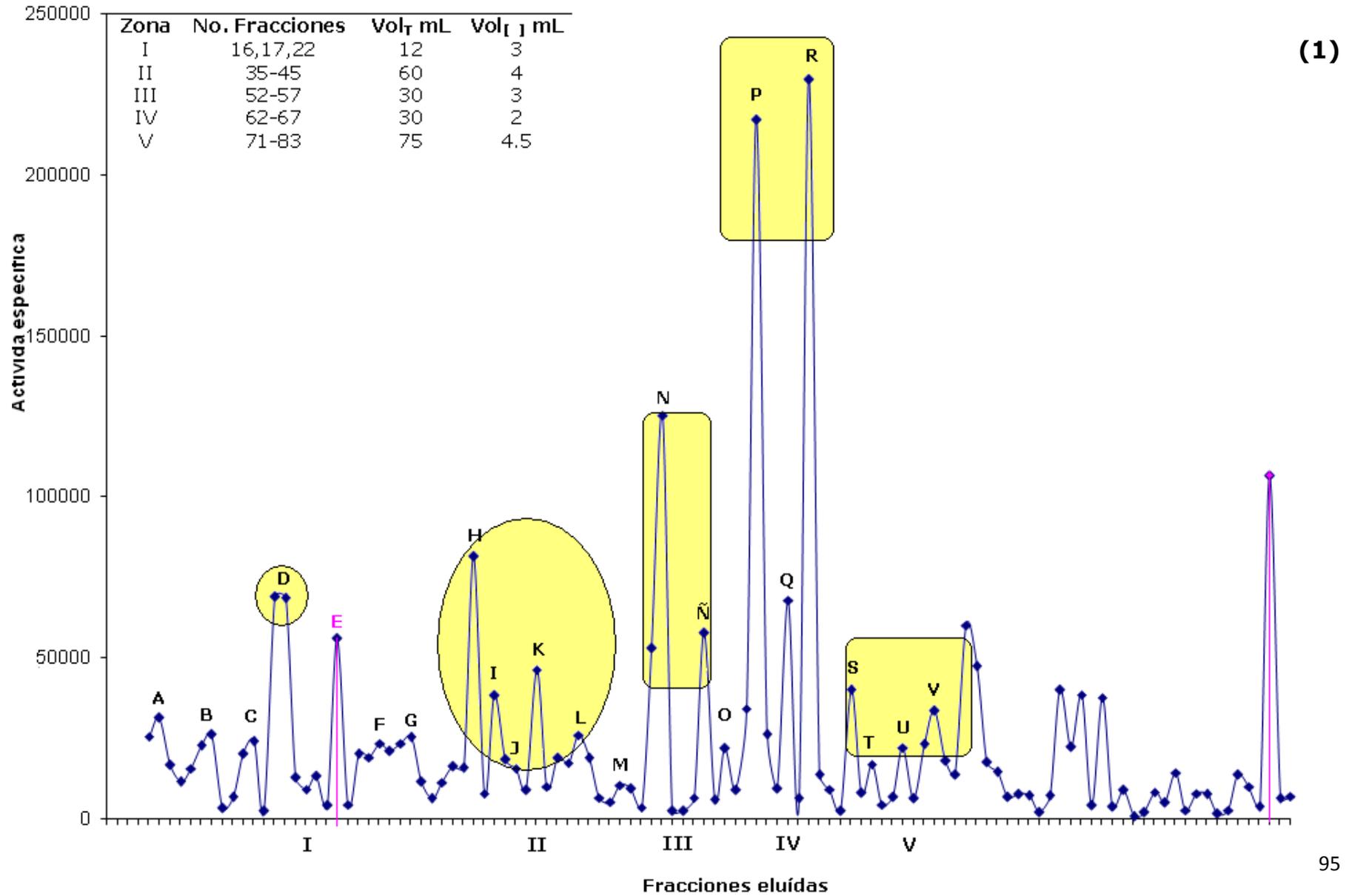


**Figura 36.** Ensayo cualitativo, usando como sustrato y revelador  $\alpha$ -naftilacetato y fast red salt B respectivamente

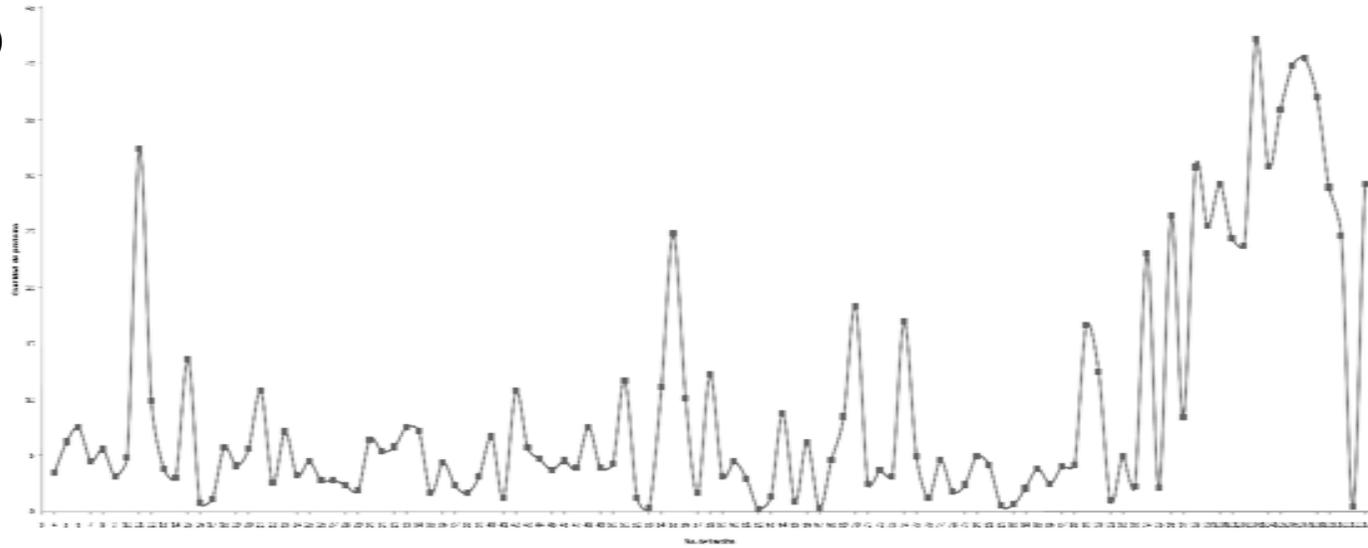
## 8.3 Caracterización de condiciones experimentales en la electroforesis de elución

| Tipo de gel | Condición | Acrilamida % | pH  | Centrifugación 18000 rpm |
|-------------|-----------|--------------|-----|--------------------------|
| Nativo      | A         | 7.5          | 8.2 | Sí                       |
|             | B         | 12           | 7.2 | Sí                       |
|             | C         | 12           | 7.2 | No                       |

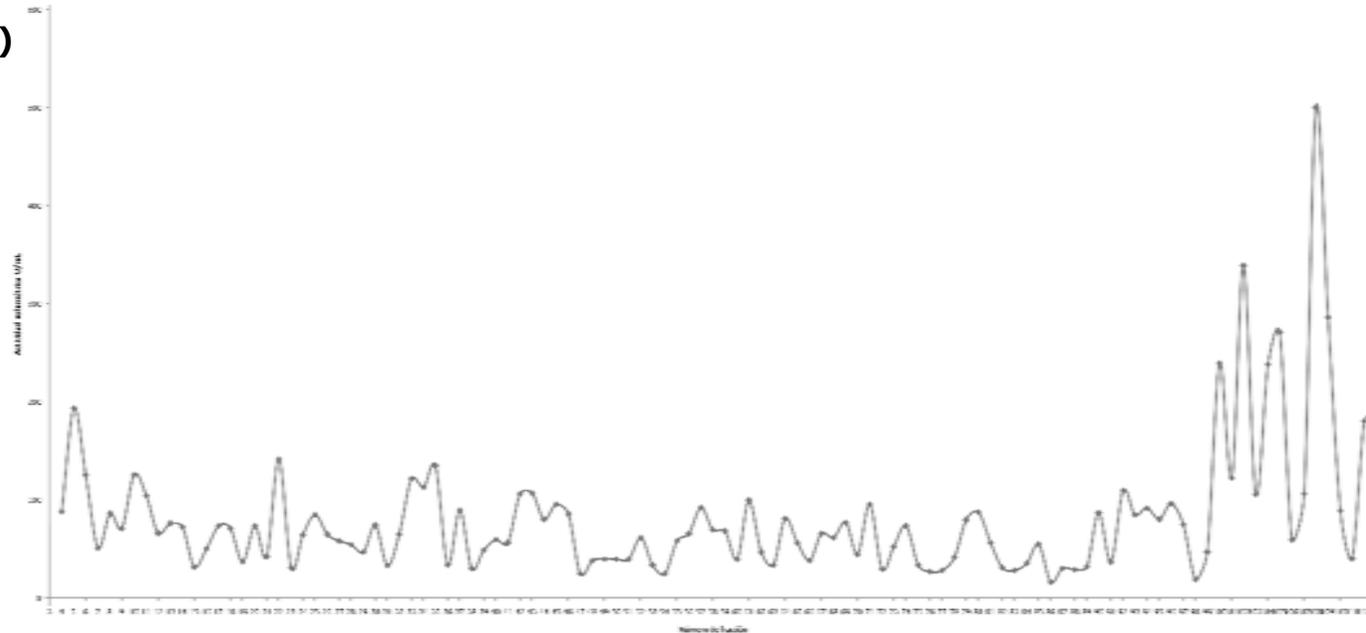
**Condición A. (1) actividad específica-Grupos con fracciones similares; (2) Cromatograma de proteína;  
(3) actividad enzimática sobre *p*-NFA**



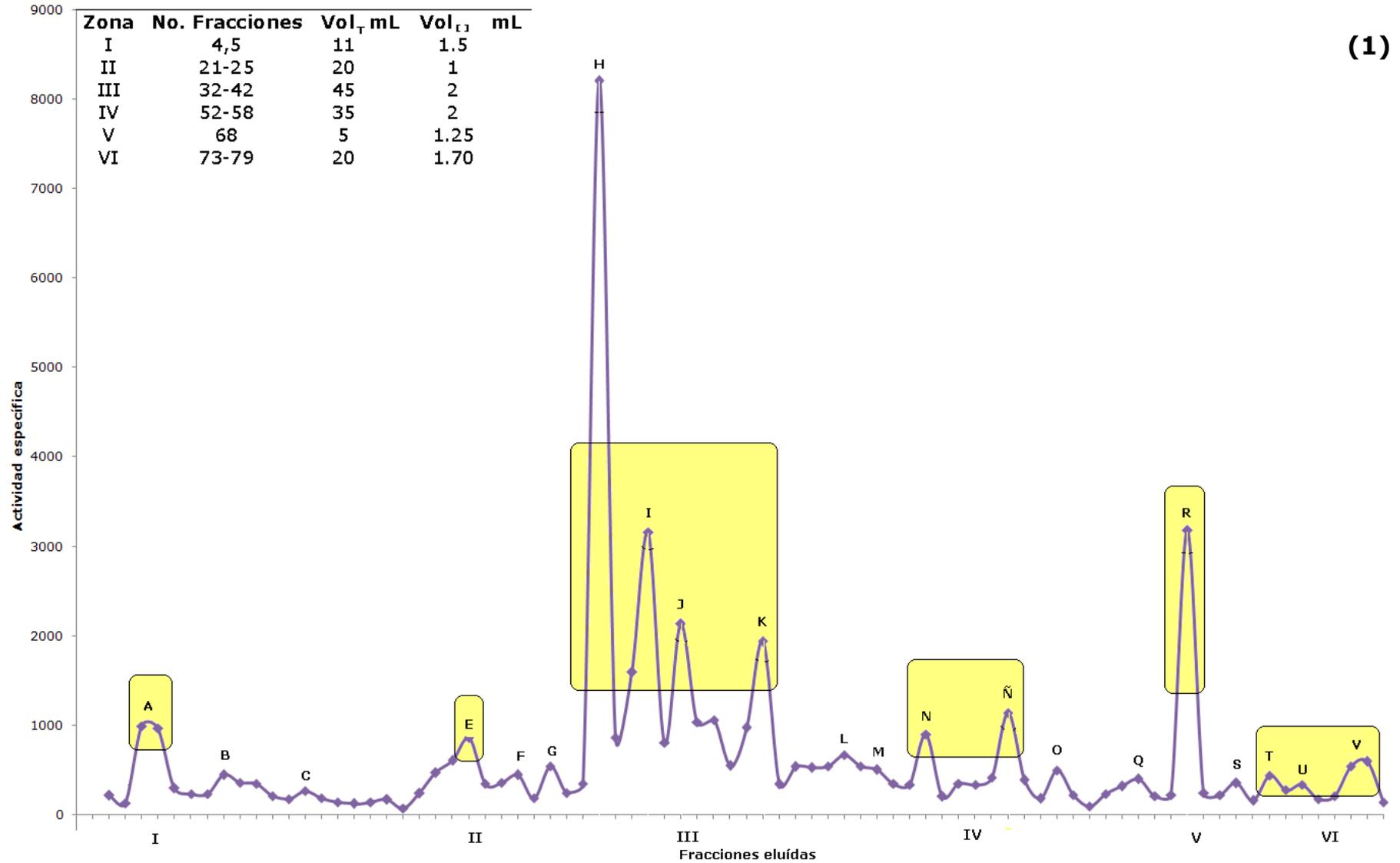
(2)



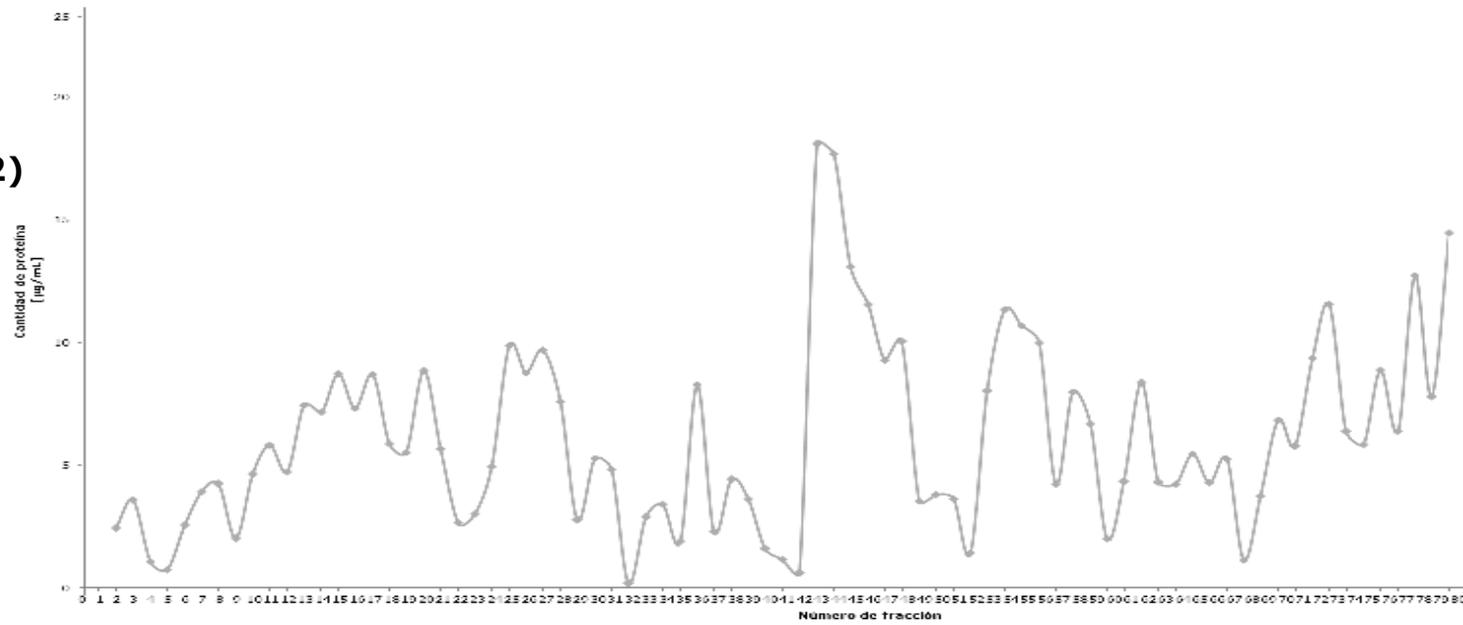
(3)



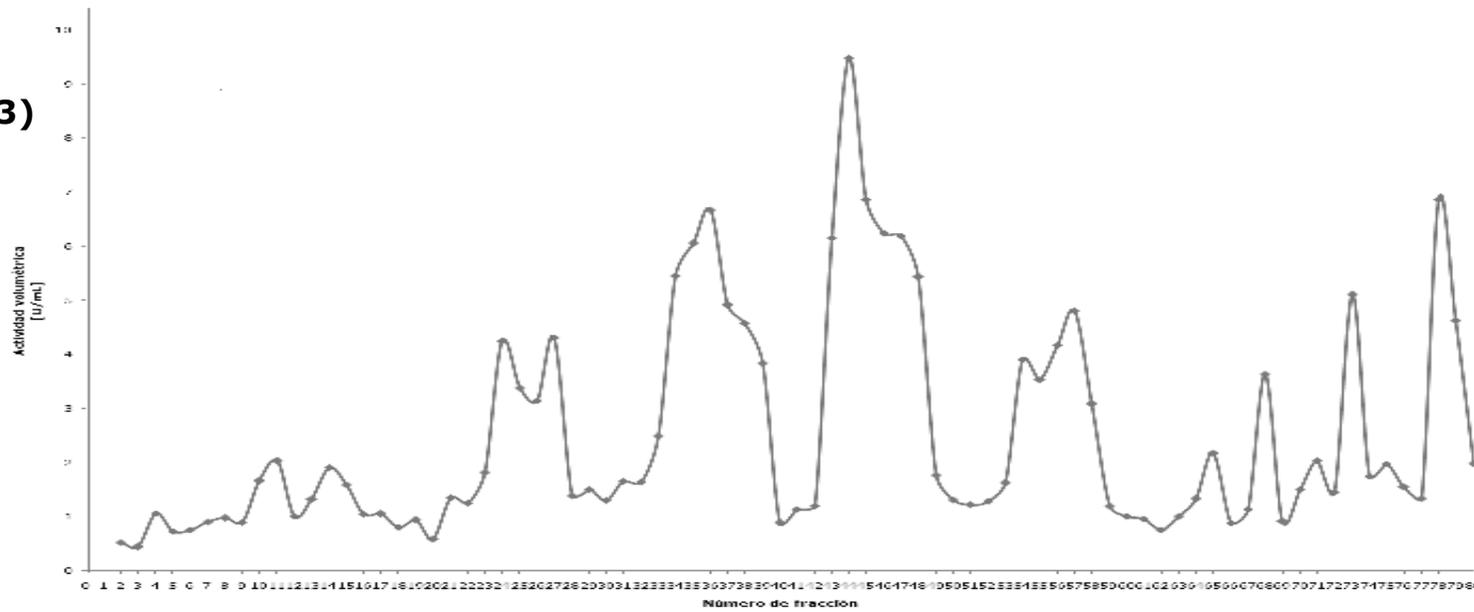
**Condición B. (1) actividad específica-Grupos con fracciones similares; (2) Cromatograma de proteína;  
(3) actividad enzimática sobre *p*-NFA**



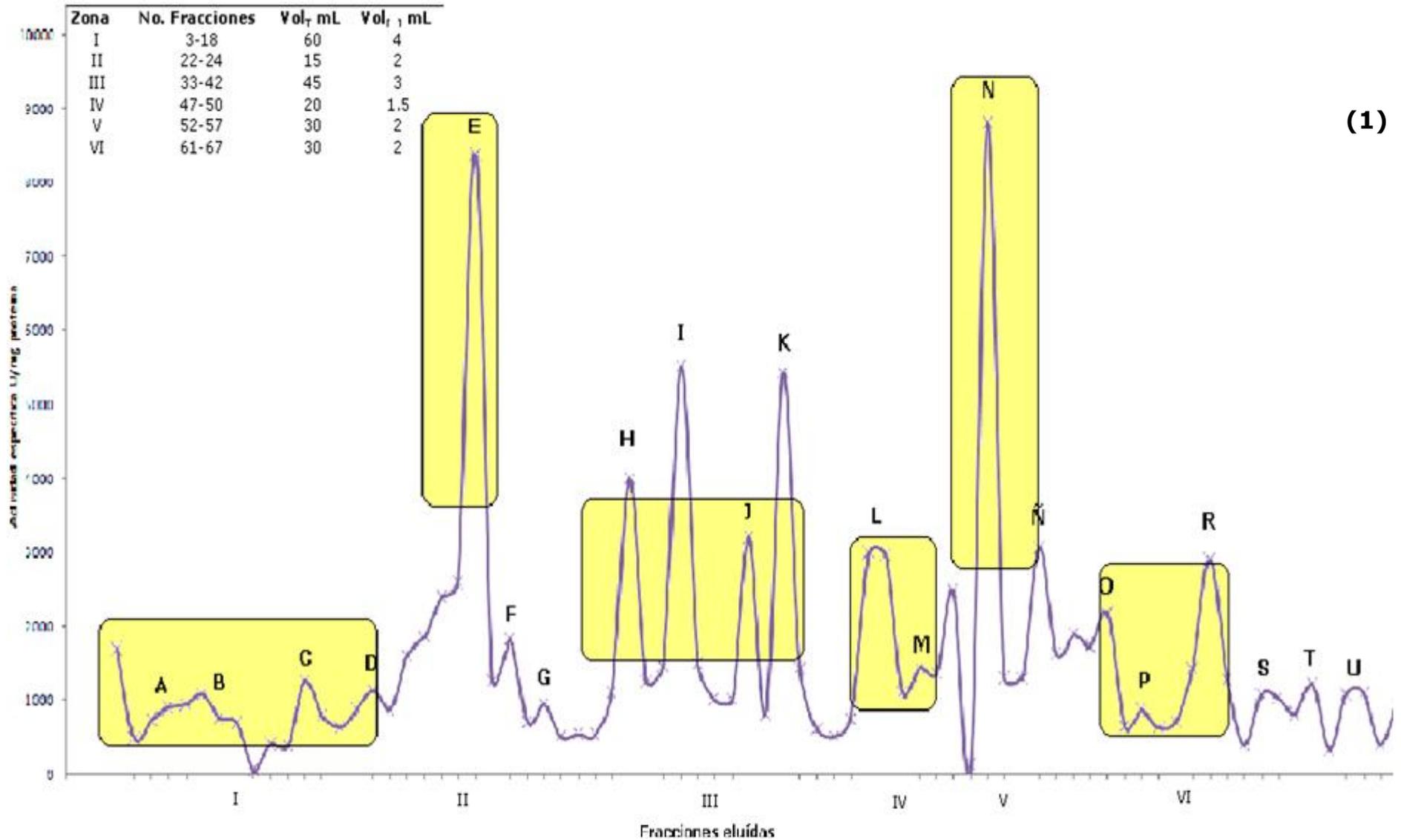
(2)



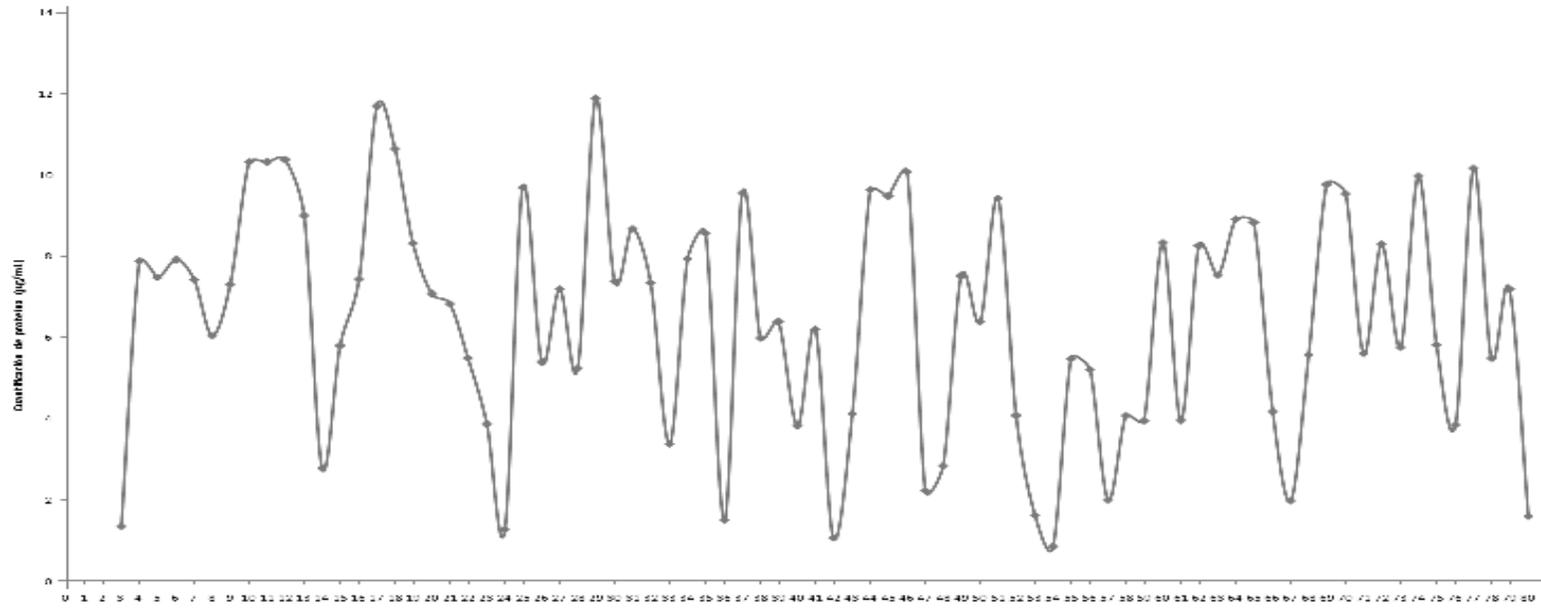
(3)



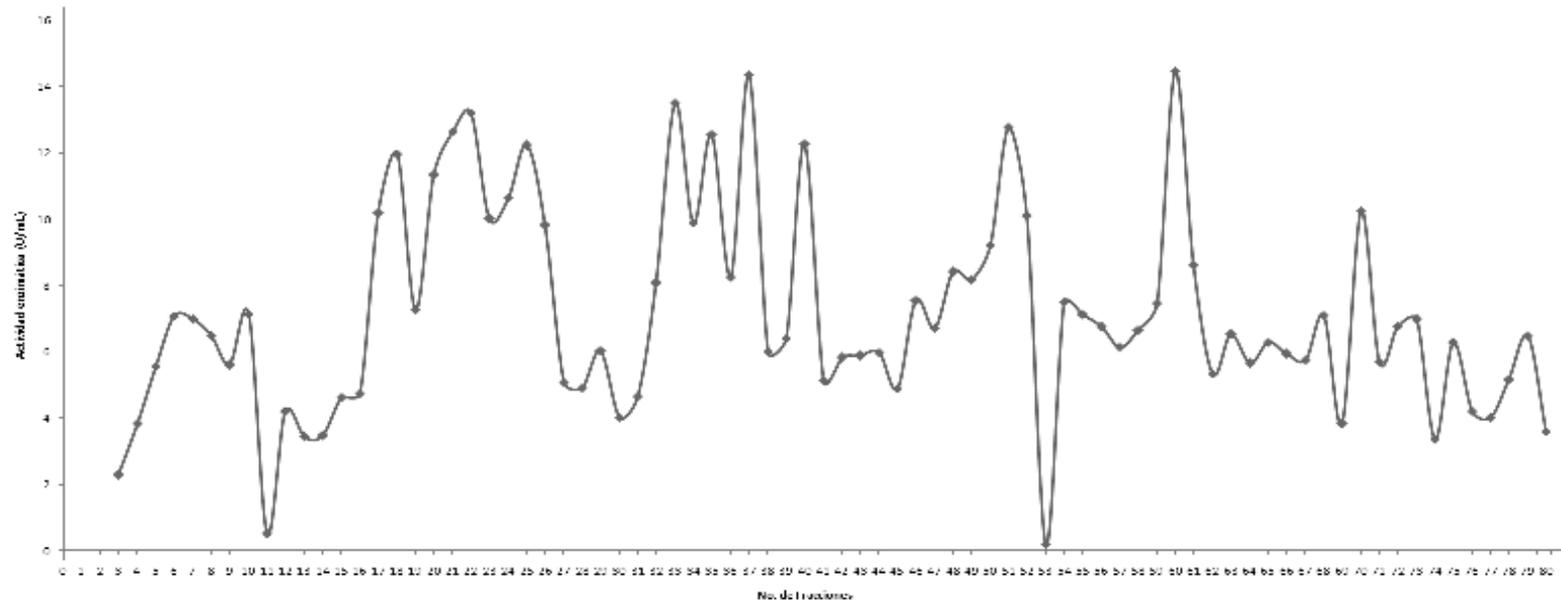
**Condición C. (1) actividad específica-Grupos con fracciones similares; (2) Cromatograma de proteína;  
(3) actividad enzimática sobre *p*-NFA**



(2)



(3)



## 8.4 Secuencias

### Banda de bajo peso molecular

#### Peroxiredoxin YkuU [*Bacillus pumilus* SAFR-032]

Nominal mass (Mr): 20578

Calculated pI value: 4.67

1 MAERFVGKQA PR**FEMEAVLA** **NKEFGKVSLE** **ENMKNDK**WTV LFFYPMDFTF  
51 VCPTEITAMS DRYDEFEDLD AEIIGVSTDT IHTHLAWINT DR**KDNGLGEL**  
101 **KYPLAADTNH** **TVSREYGVLI** **EEEGIALR**GL FIINPEGELQ YQTVFHNNIG  
151 RDVDETLRVL QALQTGGLCP ANWKPGQKTL

### Banda de alto peso molecular

#### Polyribonucleotide nucleotidyltransferase

[*Pseudomonas fluorescens* WH6]

Nominal mass (Mr): 75104

Calculated pI value: 5.20

1 MNPVIKK**FQF** **GQSTVTLETG** **RIARQASGAV** LVTVDDDTV LTVVGAFTA  
51 DPSKGGFFPLS VHYQEKTYAA GK**IPGGFFKR** EGRPSEKETL TSRLIDRPIR  
101 PFPPEGFMNE VQVVCTVVST SKKTDPDIAA MIGTSAALAI SGIPFDGPIG  
151 AARVAFHEST GYLLNPTYEQ LKASSLDMVV AGTSEAVLMV ESEAKELTED  
201 QMLGAVLFAH DEFQSVINAV KELAAEAAKP TWAWAPQAEA TELLGAIR**SE**  
251 **FGAAISDAYT** **ITVKADRYAR** **LGELKEQVVA** **KLSGEEGQPS** ASDVK**AAFGE**  
301 **IEYR**TVRENI VNGKPRIDGR DTRTVRPLNI EVGVLPKTHG SALFTR**GETQ**  
351 **ALVVATLGTA** **RDAQLLDTLE** GEKKDPFMLH YNFPPFSVGE CGRMGGAGRR  
401 EIGHGRLAR **SVQAMPLAAD** **VFPYTIRVVS** EITESNGSSS MASVCGASLA  
451 LMDAGVPMKA **PVAGIAMGLV** **KEGEKFAILT** DILGDEDHLG DMDFKVAGTA  
501 KGV TALQMDI KIKGITEEIM EIALGQALEA **RLNILGQMNQ** **IIGQSR**TELS  
551 ENAPTMIAMK IDTDKIRDVI GKGGATIRAI CEETKASIDI EDDGSIKIFG  
601 ETKEAAEAAR QRVLGITAEA EIGKIYVGKV ERIVDFGAFV NILPGKDGLV  
651 HISMLSDARV EKVTDILKEG QEVEVLVLDV DNRGRIKLSI KDVA AAKASG  
701

## Putative amino acid ABC transporter substrate-binding protein

[*Pseudomonas fluorescens* SBW25]

Nominal mass ( $M_r$ ): 36825

Calculated pI value: 6.47

```
1 MKVLKSTLAI VSAAAVLGVS GFAQAGATLD AVQKKGFVQC GVS DGLPGFS
51 VPDASGKILG IDADV CRAVA AAVFGDATKV KFSQLNAKER FTALQSGEVD
101 ILSRNTTMTS SRDAGMGLKF PGFITYYDGI GFLVNNKLGV KSAKELDGAT
151 ICIQAGTTTE LNVSDYFRGN NLKYTPITFD TSDESAKSLE SGRC DVL TSD
201 KSQ LFAQ RSK LAAPKDYVVL PETISKEPLG PVVRNGDDEW LAIVRWVGYA
251 MLNAEEAGIT SKNVEAEAKS TKNPDVARLL GADGEY GKDL KVKKDWV VQI
301 VKQVGN YGEV FERNLGKSTP LEIDRGLNAL WNNGGIQYAP PVR
```

## Succinyl-CoA synthetase subunit alpha

[*Pseudomonas fluorescens* Pf-5]

Nominal mass ( $M_r$ ): 30324

Calculated pI value: 6.08

```
1 MSVLINKDTK VICQGITGSQ GSFHTQQAIE YGTMVGGVT PGKGGTEHLG
51 LPVFNTVKDA VAATGATASV IYVPAPFKD SILEAAFGGI KLIVCITEGI
101 PTL DMLDAKV KCDELGVTLI GPNC PGVITP GECKIGIMPG HIHLPGKVGI
151 VSRSGTLTYE AVKQTTDAGF GQSTCVGIGG DPIP GSNFID ILKLFQEDPK
201 TEAIVMIGEI GGS AEEEEAAA YIKAHVTKPV VSYIAGVTAP PGKRMGHAGA
251 IISGGKGTAD EKFAALQDAG VKTVRSLADI GKALAE LTGW AVK
```