



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

**“Expresión y caracterización bioquímica de una lipasa y su foldasa  
específica de *Pseudomonas alcaligenes* proveniente del Golfo de México”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**ITZEL ANAHÍ HIDALGO MANZANO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Liliana Pardo López**

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO 2023

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y al Instituto de Biotecnología UNAM (IBt-UNAM) por el vínculo académico que me permitió realizar mis estudios y proyecto de maestría.

A mi directora de tesis, la Dra. Liliana Pardo López, por su apoyo incondicional, por su confianza y por abrirme las puertas de su laboratorio. Infinitamente agradecida por darme la oportunidad no solo de crecer profesionalmente sino también personalmente.

A los doctores José Luis Rodríguez Mejía y Luis Felipe Muriel Millán por todas sus enseñanzas, por ser parte de mi formación y los momentos compartidos.

A mis entrañables amigos de laboratorio, Sofi y Alfredo por su gran apoyo y compañía durante los experimentos largos. A Liber, Jorge y Ari por los lindos momentos y todo el tiempo compartido.

A mis padres, por todo su amor y apoyo.

Para ti abuelita.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 10 |
| 1.1 Enzimas .....  | 10 |
| 1.1.1 Las enzimas como catalizadores biológicos .....                    | 10 |
| 1.1.2 Cómo funcionan las enzimas .....                                   | 10 |
| 1.1.3 Propiedades de las enzimas .....                                   | 12 |
| 1.1.4 Clasificación de las enzimas .....                                 | 13 |
| 1.2 Las enzimas como herramientas biotecnológicas .....                  | 14 |
| 1.2.1 Primeros hallazgos en la aplicación de las enzimas .....           | 14 |
| 1.2.2 Características de la aplicación de las enzimas .....              | 15 |
| 1.2.3 Aplicaciones de las enzimas microbianas .....                      | 17 |
| 1.3 Lipasas .....  | 22 |
| 1.3.1 Generalidades .....  | 22 |
| 1.3.2 Características estructurales.....                                 | 23 |
| 1.3.3 Clasificación basada en la especificidad y selectividad .....      | 24 |
| 1.3.4 Clasificación basada en la secuencia proteica .....                | 27 |
| 1.3.5 Familia I: Triacilglicerol lipasas.....                            | 27 |
| 1.3.5 Mecanismo catalítico .....   | 32 |
| 1.3.6 Aplicaciones biotecnológicas .....                                 | 35 |
| 1.4 Bioprospección del ambiente marino .....                             | 40 |
| 2. ANTECEDENTES .....  | 43 |
| 2.1 Consorcio de Investigación del Golfo de México .....                 | 43 |
| 2.2 Lipasas del género <i>Pseudomonas</i> .....                          | 43 |
| 2.2.1 Plegamiento y secreción de las lipasas de <i>Pseudomonas</i> ..... | 45 |
| 2.2.2 Sobreexpresión de las lipasas de <i>Pseudomonas</i> .....          | 47 |
| 2.3 Sobreexpresión y purificación de la lipasa LipGoM .....              | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 4. HIPÓTESIS.....  | 51 |
| 5. OBJETIVOS .....   | 52 |
| 6. MATERIALES.....   | 53 |
| 6.1 Cepas y plásmidos.....   | 53 |
| 6.2 Medios de cultivo.....   | 54 |
| 6.3 Reactivos.....   | 55 |
| 6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....                         | 56 |
| 6.5 Enzimas .....  | 56 |
| 6.6 Electroforesis de ácidos nucleicos .....                               | 56 |
| 6.7 Electroforesis de proteínas y Western Blot.....                        | 57 |
| 6.8 Cuantificación de proteína .....                                       | 58 |
| 6.9 Caracterización bioquímica.....  | 58 |
| 7. MÉTODOS .....   | 60 |
| 7.1 Diseño de oligonucleótidos.....  | 60 |
| 7.2 Extracción de plásmidos y PCR.....                                     | 61 |
| 7.4 Construcciones moleculares.....  | 63 |
| 7.4.1 Construcción pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa.....                 | 64 |
| 7.4.2 Construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa.....                          | 64 |
| 7.4.3 Construcción pET28a::Foldasa .....                                   | 65 |
| 7.5 Sobreexpresión .....   | 65 |
| 7.6 SDS-PAGE y Western Blot.....   | 66 |
| 7.7 Ensayos de solubilización en presencia de la foldasa.....              | 67 |
| 7.7.1 Pruebas de solubilización a distintas temperaturas de inducción..... | 67 |
| 7.8 Caracterización bioquímica.....  | 68 |
| 7.8.1 Obtención del extracto de proteína.....                              | 68 |
| 7.8.2 Especificidad de sustrato .....                                      | 69 |

|   |     |
|---|-----|
| 7.8.3 pH óptimo .....   | 69  |
| 7.8.4 Temperatura óptima .....  | 70  |
| 7.8.5 Termoestabilidad.....   | 70  |
| 7.9 Análisis bioinformático .....   | 70  |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 72  |
| 8.1 Aislamiento de la cepa <i>Pseudomonas alcaligenes</i> .....   | 72  |
| 8.2 Actividad lipolítica de la cepa P. alcaligenes aislada del Goyo de México.....                          | 72  |
| 8.3 Características estructurales de la lipasa LipGoM y de su foldasa específica .....                      | 73  |
| 8.4 Sobreexpresión previa de la lipasa LipGoM .....   | 73  |
| 8.5 Incremento de la solubilidad de la lipasa LipGoM .....  | 75  |
| 8.6 Clonación y expresión de la lipasa LipGoM sin péptido señal .....                                       | 76  |
| 8.7 Clonación y expresión de la lipasa LipGoM y su foldasa específica en un sistema de expresión dual ..... | 92  |
| 8.8 Ensayos de solubilización con la foldasa.....   | 103 |
| 8.9 Caracterización bioquímica de la lipasa LipGoM .....  | 107 |
| 8.9.1 Especificidad de sustrato .....   | 108 |
| 8.9.2 pH óptimo .....   | 109 |
| 8.9.3 Temperatura óptima .....  | 111 |
| 8.9.4 Termoestabilidad.....   | 112 |
| 8.9.5 Potencial biotecnológico.....   | 114 |
| 9. CONCLUSIONES .....   | 115 |
| 10. PERSPECTIVAS.....   | 116 |
| 11. LITERATURA REVISADA.....  | 117 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Cambios energéticos de una reacción. Figura modificada de Roskoski, 2015.                       | 12 |
| Figura 2. Producción de enzimas industriales a granel.  | 17 |
| Figura 3. Mercado global de enzimas proyectado para el año 2024 en función de los sectores de aplicación. | 22 |
| Figura 4. Catálisis de las lipasas sobre una molécula de triacilglicerol.                                 | 23 |
| Figura 5. Plegamiento $\alpha/\beta$ hidrolasa de las lipasas.  | 24 |
| Figura 6. Árbol filogenético de las enzimas lipolíticas clasificadas en 19 familias.                      | 28 |
| Figura 7. Operón lipasa.  | 31 |
| Figura 8. Mecanismo catalítico de hidrólisis de las lipasas.  | 33 |
| Figura 9. Mecanismo catalítico de esterificación de las lipasas.  | 34 |
| Figura 10. Mecanismo catalítico de transesterificación de las lipasas.                                    | 35 |
| Figura 11. Mecanismo de secreción de las lipasas de <i>P. aeruginosa</i> .                                | 46 |
| Figura 12. Descripción del inserto clonado de 5 Kb en la librería genómica de <i>P. alcaligenes</i> .     | 72 |
| Figura 13. Actividad de LipGoM en medio LB-modificado con tricaprilina al 1%.                             | 74 |
| Figura 14. Análisis de la expresión de la lipasa LipGoM.  | 75 |
| Figura 15. Actividad del extracto de proteína de LipGoM sobre distintos p-nitrofenil ésteres              | 75 |
| Figura 16. Representación esquemática de los genes <i>lipgom</i> y <i>foldasa</i> .                       | 76 |
| Figura 17. Predicción de los aminoácidos del péptido señal de LipGoM.                                     | 77 |
| Figura 18. Amplificación del gen <i>lipgom</i> con y sin péptido señal                                    | 78 |
| Figura 19. Plásmido pET28a linealizado y producto de PCR sin péptido señal                                | 79 |
| Figura 20. Tamizado de clonas con la construcción pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa                      | 79 |
| Figura 21. Tamizado de clonas con la construcción pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa.                     | 80 |
| Figura 22. Expresión de LipGoM a 37 °C.   | 81 |
| Figura 23. Expresión de LipGoM a 18 °C.   | 82 |
| Figura 24. Clonas de <i>E. coli</i> BL21 en LB-modificado con tricaprilina al 1%.                         | 83 |
| Figura 25. Actividad de extractos de proteína sobre p-nitrofenil dodecanoato.                             | 84 |
| Figura 26. Doble digestión enzimática NdeI-EcoRI clonas <i>E. coli</i> SHuffle® T7.                       | 86 |
| Figura 27. Expresión de LipGoM con y sin péptido señal en clonas de <i>E. coli</i> SHuffle® T7.           | 86 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 28. Expresión de LipGoM con y sin péptido señal a 18°C durante 20 h.....                                 | 87  |
| Figura 29. Actividad de extractos de proteína sobre p-nitrofenil dodecanoato.....                               | 88  |
| Figura 30. Comparación de la actividad de LipGoM completa a diferentes condiciones de inducción.....            | 89  |
| Figura 31. Verificación de la expresión soluble de la lipasa .....  | 90  |
| Figura 32. Purificación de LipGoM.....  | 91  |
| Figura 33. Actividad de las lipasas LipGoM y LipGoM $\Delta$ SP purificadas y concentradas.....                 | 91  |
| Figura 34. Digestión enzimática del plásmido pRSFDuet y productos de PCR <i>lipgom</i> y <i>foldasa</i> . ..... | 93  |
| Figura 35. Tamizaje de clonas pRSFDuet::LipGoM para el gen <i>lipgom</i> . .....                                | 93  |
| Figura 36. Plásmido pRSFDuet::LipGoM lineal. ....   | 94  |
| Figura 37. Tamizaje de clonas pRSFDuet::LipGoM para el gen <i>foldasa</i> . .....                               | 95  |
| Figura 38. Doble digestión enzimática del plásmido pRSFDuet::LipGoM::Foldasa. ....                              | 95  |
| Figura 39. Prueba de actividad el en medio LB-modificado con tricaprilina al 1%. ....                           | 96  |
| Figura 40. Expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa. ....                      | 97  |
| Figura 41. Prueba de expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa a.....           | 97  |
| Figura 42. Actividad de LipGoM sobre p-nitrofenil dodecanoato. ....   | 98  |
| Figura 43. Expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa .....                      | 100 |
| Figura 44. Expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM. ....                               | 101 |
| Figura 45. Amplificación del gen LipGoM.....  | 102 |
| Figura 46. Alineamiento de los resultados de la secuenciación .....   | 103 |
| Figura 47. Gen <i>foldasa</i> y plásmido pET28a. ....   | 104 |
| Figura 48. Tamizaje de clonas pET28a::Foldasa. ....   | 105 |
| Figura 49. Expresión de la Foldasa.....   | 106 |
| Figura 50. Pruebas de solubilización in vitro. ....   | 107 |
| Figura 51. Especificidad de sustrato de LipGoM. ....  | 108 |
| Figura 52. pH óptimo de LipGoM. ....  | 110 |
| Figura 53. Temperatura óptima de LipGoM. ....   | 111 |
| Figura 54. Termoestabilidad de LipGoM. ....   | 113 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de las enzimas.....   | 14 |
| Tabla 2. Aplicaciones de las enzimas microbianas. ....   | 18 |
| Tabla 3. Subfamilias de la familia I de enzimas lipolíticas. ....  | 29 |
| Tabla 4. Microorganismos marinos productores de lipasas y sus características.....                       | 41 |
| Tabla 5. Características bioquímicas de lipasas de <i>Pseudomonas</i> .....                              | 44 |
| Tabla 6. Casos de éxito empleando las estrategias de plegamiento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....  | 48 |
| Tabla 7. Características de las cepas utilizadas en este trabajo. ....                                   | 53 |
| Tabla 8. Características de los plásmidos utilizados en este trabajo. ....                               | 54 |
| Tabla 9. Composición del medio de cultivo LB líquido. ....   | 54 |
| Tabla 10. Composición del medio de cultivo LB sólido. ....   | 55 |
| Tabla 11. Composición del medio de cultivo LB-modificado. ....   | 55 |
| Tabla 12. Reactivos para medios de cultivo utilizados en este trabajo.....                               | 56 |
| Tabla 13. Enzimas de restricción utilizadas.....   | 56 |
| Tabla 14. Buffer TAE 50x para electroforesis de ADN.....   | 56 |
| Tabla 15. Buffer de corrida para SDS-PAGE.....   | 57 |
| Tabla 16. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida.....                                      | 57 |
| Tabla 17. Buffer de carga para proteínas. ....   | 57 |
| Tabla 18. Buffer de transferencia para Western Blot.....   | 58 |
| Tabla 19. Buffer TBS-T para Western Blot.....  | 58 |
| Tabla 20. Soluciones para la cuantificación de proteína por el método de Lowry.....                      | 58 |
| Tabla 21. Buffer de lisis (pH 8.0). ....   | 58 |
| Tabla 22. Reactivos para lisis. ....   | 59 |
| Tabla 23. p-Nitrofenil ésteres utilizados como sustratos.....  | 59 |
| Tabla 24. Buffers utilizados para la caracterización bioquímica.....                                     | 59 |
| Tabla 25. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....   | 60 |
| Tabla 26. Condiciones de reacción para la amplificación del gen <i>lipgom</i> sin péptido señal<br>..... | 62 |
| Tabla 27. Condiciones de reacción para la amplificación del gen <i>lipgom</i> con péptido señal<br>..... | 62 |
| Tabla 28. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR del gen <i>foldasa</i> .....             | 62 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 29. Condiciones de reacción para la amplificación del gen <i>lipgom</i> sin péptido señal ..... | 63  |
| Tabla 30. Condiciones de reacción para la amplificación del gen <i>lipgom</i> con péptido seña. ....  | 63  |
| Tabla 31. Condiciones de reacción para la amplificación del gen .....                                 | 63  |
| Tabla 32. Condiciones de inducción.....   | 66  |
| Tabla 33. pH óptimo de lipasas alcalinas de <i>Pseudomonas</i> .....                                  | 110 |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enzimas

### 1.1.1 Las enzimas como catalizadores biológicos

La célula es la unidad estructural y funcional de la vida, está compuesta por diversos tipos de moléculas que experimentan continuas reacciones químicas, que por tratarse de reacciones que ocurren en los seres vivos, se denominan reacciones bioquímicas. Para el correcto funcionamiento celular se requiere que estas reacciones se lleven a cabo de manera eficiente y selectiva; para ello, las células son capaces de sintetizar catalizadores biológicos, también llamados biocatalizadores (Peña *et al.*, 2004; Bhatia, 2018).

Un catalizador es una sustancia que incrementa la velocidad de una reacción química sin que su propia naturaleza química cambie durante el proceso (Roskoski, 2015). Dentro de las células se pueden encontrar dos tipos de biocatalizadores: los de naturaleza proteica (enzimas) que se requieren esencialmente para todas las reacciones bioquímicas, y algunas moléculas de ácido ribonucleico (RNA, ribozimas) que tienen un papel importante en la expresión génica (Buchholz *et al.*, 2012).

Las enzimas son proteínas altamente especializadas, y es su conformación la que les otorga un elevado poder catalítico y un alto grado de especificidad. Las moléculas sobre las que éstas actúan se denominan sustratos, mientras que las moléculas que resultan de su acción se denominan productos (Roskoski, 2015).

### 1.1.2 Cómo funcionan las enzimas

La parte de una enzima que se une al sustrato y lo convierte en producto se llama sitio activo, una región relativamente pequeña pero que constituye una entidad tridimensional formada por residuos de aminoácidos que pueden estar alejados en la cadena polipeptídica lineal. Las propiedades y el reordenamiento espacial estos residuos de aminoácidos determinan qué moléculas pueden unirse y ser sustratos específicos de una enzima (Hames & Hooper, 2014). La función del resto de la proteína, es decir, de los aminoácidos que no forman el sitio activo, es la estabilización de la misma y, por lo tanto, del sitio activo, así como proporcionar un ambiente químico apropiado para la interacción de la enzima con el sustrato (Robinson, 2015).

Las enzimas catalizan reacciones específicas, por lo que la especificidad es una de sus características más importantes. Sin embargo, en su mayoría las enzimas son capaces de unirse a más de un tipo de sustrato y catalizar reacciones que difieren de su reacción fisiológica (Kapoor *et al.*, 2012). Esta función secundaria que presentan las enzimas se denomina como promiscuidad enzimática o función promiscua (Gupta, 2016). La promiscuidad enzimática se presenta en formas diferentes que a continuación se describen brevemente.

- Promiscuidad de condición.

Esta propiedad la presentan enzimas con actividad catalítica en diversas condiciones de reacción diferentes a las naturales, como en medios no acuosos, temperatura o pH extremos (Hult & Berglund, 2007).

- Promiscuidad de sustrato.

Esta propiedad la presentan enzimas con amplia especificidad de sustrato, es decir, son enzimas que utilizan sustratos de naturaleza diferente (Kapoor *et al.*, 2012).

- Promiscuidad catalítica.

Esta propiedad la presentan enzimas que catalizan reacciones químicas diferentes, estas transformaciones pueden diferir en el tipo de formación/ruptura de enlaces o en el mecanismo catalítico que permite la formación/ruptura de enlaces (Hult & Berglund, 2007).

Durante el curso de una reacción bioquímica se generan los cambios de energía esquematizados en la Figura 1. En todas las reacciones existe una barrera de energía, entre el sustrato (reactivos) y el producto, que representa la energía requerida para el alineamiento de los grupos reactivos, la formación de cargas, el reordenamiento de enlaces y otras transformaciones para que la reacción ocurra en cualquiera de las dos direcciones: de sustrato a producto o de producto a sustrato. Esta barrera energética se llama energía de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ). Para superarla es necesario que las moléculas se lleven a un nivel de energía superior conocido como el estado de transición, una forma química parcialmente inestable que es intermedia entre el sustrato y el producto. La energía de activación es, por

lo tanto, igual a la diferencia en energía entre el sustrato y el estado de transición. Una energía de activación muy alta corresponde a una reacción muy lenta (Nelson & Cox, 2005).

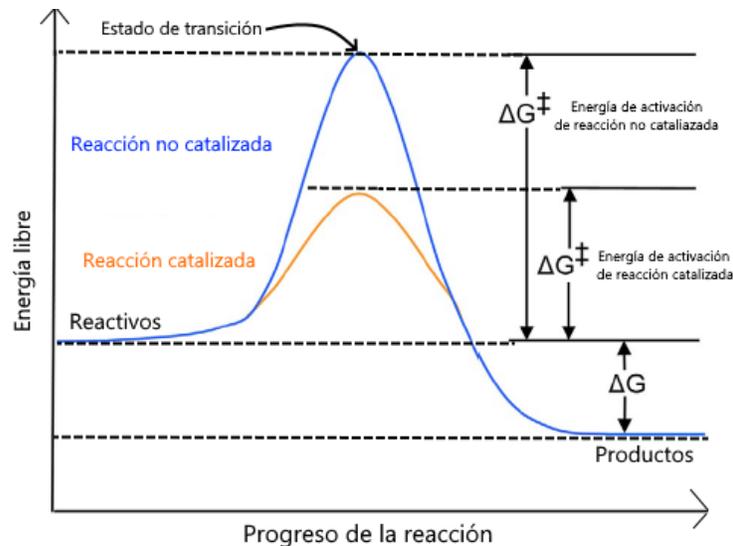


Figura 1. Cambios energéticos de una reacción. Figura modificada de Roskoski, 2015.

Durante una reacción catalizada por una enzima aumenta en gran medida la posibilidad de acercamiento de los grupos químicos reaccionantes. Los grupos funcionales de una enzima pueden formar un enlace covalente transitorio con el sustrato y activarlo para la reacción, o un grupo químico puede transferirse transitoriamente del sustrato a la enzima. Así mismo, se pueden formar múltiples interacciones débiles, como fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, entre el sustrato y la enzima (Peña *et al.*, 2004). El conjunto de las interacciones entre una enzima y su sustrato proporcionan una ruta de reacción alternativa de menor energía que permite que la reacción química ocurra considerablemente más rápido, ya que se incrementa la velocidad de la reacción (Nelson & Cox, 2005). La velocidad de una reacción catalizada por una enzima puede incrementar desde  $10^3$  hasta  $10^{17}$  veces (Roskoski, 2015).

### 1.1.3 Propiedades de las enzimas

Un gran número de enzimas está constituido únicamente de cadenas polipeptídicas, es decir, solo de los grupos químicos de los residuos de aminoácidos, sin embargo, hay enzimas que además contienen un componente no proteico llamado cofactor que es

necesario para su actividad catalítica (Robinson, 2015). Los cofactores pueden ser moléculas inorgánicas que normalmente son iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ ; o pueden ser moléculas orgánicas complejas llamadas coenzimas (Hames & Hooper, 2014). El cofactor o la coenzima se unen a la proteína de forma covalente o no covalente, es decir, se unen de manera débil y transitoria o se pueden unir de manera permanente (Bathia, 2018). Cuando una coenzima se une permanentemente a la proteína, entonces se le denomina grupo prostético (Robinson, 2015).

Desde el punto de vista catalítico, una enzima activa y completa junto a su ion metálico o coenzima se denomina holoenzima, mientras que la parte proteica se denomina apoenzima (Hames & Hooper, 2014).

#### 1.1.4 Clasificación de las enzimas

Las enzimas suelen nombrarse añadiendo el sufijo “asa” al nombre del sustrato sobre el que actúan y en algunos casos al tipo de reacción que catalizan, por ejemplo, ureasa es el nombre de la enzima que cataliza la hidrólisis de la urea. Por otro lado, hay enzimas cuyo nombre puede ser considerado ambiguo como pepsina, lisozima, catalasa, papaína y tripsina (Hames & Hooper, 2014; Peña *et al.*, 2004).

La Unión Internacional de Bioquímica creó la Comisión de Enzimas, que a su vez propuso un enfoque sistemático para la nomenclatura y clasificación de las enzimas (Nelson & Cox, 2005). Este sistema coloca a las enzimas en una de seis clases principales según el tipo de reacción catalizada (Tabla 1). Cada enzima se identifica de manera exclusiva con un número de clasificación de cuatro partes (número EC, por Enzyme Commission). El primer dígito del número EC se refiere a la reacción que cataliza la enzima, el segundo indica la subclase, el tercero indica la sub-sub-clase y el cuarto indica el número de enzima que fue asignada a esa sub-sub-clase (Robinson, 2015).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.

| Primer dígito del número EC | Clase de enzima | Tipo de reacción catalizada  |
|-----------------------------|-----------------|--|
| 1                           | Oxidoreductasa  | Sustracción o adición de hidrógenos o de oxígeno                                     |
| 2                           | Transferasa     | Transferencia de grupos funcionales  |
| 3                           | Hidrolasa       | Ruptura de uniones mediante la introducción de los elementos de una molécula de agua |
| 4                           | Liasa           | Adición o remoción de un grupo funcional por mecanismos no hidrolíticos              |
| 5                           | Isomerasa       | Transferencia de grupos funcionales dentro de la misma molécula                      |
| 6                           | Ligasa          | Formación de enlaces acoplada a la hidrólisis de ATP                                 |

## 1.2 Las enzimas como herramientas biotecnológicas

### 1.2.1 Primeros hallazgos en la aplicación de las enzimas

La aplicación de los biocatalizadores en la historia de la humanidad se remonta a las civilizaciones antiguas que, sin saberlo, elaboraban y conservaban alimentos y bebidas alcohólicas utilizando preparaciones enzimáticas (Buchholz & Bornscheuer, 2017).

Con el desarrollo de las ciencias naturales modernas durante los siglos XVIII y XIX, el número de estudios enfocados en la biocatálisis aplicada aumentó. Por mucho tiempo se consideró que la catálisis enzimática solo estaba relacionada con procesos en los sistemas vivos (Buchholz *et al.*, 2012). Entre 1897 y 1898 Eduard Buchner publicó una serie de artículos que marcaron un gran avance en los campos de la fermentación y la enzimología. Buchner presentó detalles experimentales de la fermentación alcohólica sin la presencia de levadura. A partir de la preparación de un jugo prensado libre de células obtenido a partir de la levadura encontró que un agente soluble, que denominó zimasa, era el responsable de la transformación del azúcar en alcohol y dióxido de carbono. Con tales experimentos afirmó que la catálisis enzimática, incluidos los fenómenos complejos como el de la fermentación alcohólica, eran procesos químicos no necesariamente ligados a la presencia y acción de células vivas (Buchner, 1897).

Las investigaciones de Buchner sentaron las bases para que en la actualidad las enzimas se puedan obtener a partir de diferentes tipos de células y posteriormente se utilicen en una amplia gama de procesos biotecnológicos comercialmente importantes inclusive a nivel industrial (Robinson, 2015).

### 1.2.2 Características de la aplicación de las enzimas

La biotecnología se define como la aplicación tecnológica que utiliza organismos vivos o sus derivados para modificar o crear productos, procesos o bienes para un uso específico (Buchholz *et al.*, 2012). La tecnología enzimática, considerada un subcampo de la biotecnología, se entiende como la aplicación de enzimas libres o sistemas enzimáticos en células completas para la producción de bienes y servicios (van Beilen & Li, 2002).

Los procesos catalizados por enzimas son más eficientes que los procesos químicos convencionales ya que involucran menos pasos y rara vez se forman productos secundarios (Li *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2019). Por otro lado, las enzimas no representan una amenaza para el ambiente al ser moléculas biodegradables y dado que funcionan en condiciones moderadas de temperatura, pH y presión, permiten llevar a cabo reacciones químicas complejas en condiciones suaves (Bathia, 2018; Saha *et al.*, 2009).

Hasta la década de 1970 la mayor parte de las enzimas que se usaban eran de origen animal y vegetal, sin embargo, a medida que creció la demanda de enzimas fue necesaria su producción en tiempos más cortos, por lo que las enzimas microbianas se comenzaron a usar ampliamente (Robinson, 2015).

Los microorganismos son fuentes preferidas de enzimas debido a su rápida tasa de crecimiento, su fácil cultivo y fácil manipulación genética para producir grandes cantidades de una enzima de interés en poco tiempo comparados con las plantas y animales, además, el uso de microorganismos para la obtención de enzimas no presenta los problemas éticos del uso de animales (Singh *et al.*, 2016; Thapa *et al.*, 2019). Las enzimas microbianas pueden ser extracelulares o intracelulares siendo más fácil su obtención que las enzimas animales o vegetales equivalentes, ya que se requiere de menos pasos de extracción y purificación. Por otro lado, las enzimas de origen animal y vegetal muestran una amplia variación de rendimiento y pueden estar disponibles solo en determinadas épocas del año (Robinson, 2015).

En la actualidad cientos de enzimas se utilizan industrialmente y la mayoría de ellas se producen de forma recombinante. Esta tecnología ha avanzado notablemente en el desarrollo de sistemas de expresión eficientes para producir enzimas con características deseables según las necesidades de aplicación y para aumentar sus niveles de producción (Saha *et al.*, 2009; Adrio & Demain, 2014; Singh *et al.*, 2016).

Alrededor de un 50% de las enzimas industriales se produce en levaduras y hongos filamentosos, mientras que el 30 % se produce en bacterias y el 8% y el 4% en animales y plantas, respectivamente (Thapa *et al.*, 2019).

Una vez que se lleva a cabo la producción de una enzima, los procesos posteriores que incluyen el aislamiento, la purificación y la formulación de la preparación enzimática, dependen en gran medida de su aplicación final. Los productos enzimáticos pueden variar desde preparaciones de extractos crudos, con purificación parcial o nula, hasta formas altamente purificadas (Bansal *et al.*, 2014).

De manera general, las enzimas con fines de aplicación se pueden categorizar de la siguiente manera:

- Enzimas industriales a granel.
- Enzimas utilizadas con fines de diagnóstico.
- Enzimas utilizadas con fines terapéuticos.

Después de su producción, las enzimas industriales a granel están sujetas a pocos procesos, por lo que el producto enzimático final es esencialmente una preparación enzimática cruda que contiene muchas actividades catalíticas y otras sustancias además de la enzima deseada (Headon & Walsh 1994). La Figura 2 representa la estrategia general utilizada en el procesamiento de las enzimas industriales a granel.

Las enzimas utilizadas con fines de diagnóstico y terapéuticos son enzimas que después de su producción se someten a varios procesos de purificación para asegurar el funcionamiento del producto final (Headon & Walsh 1994; Bansal *et al.*, 2014).

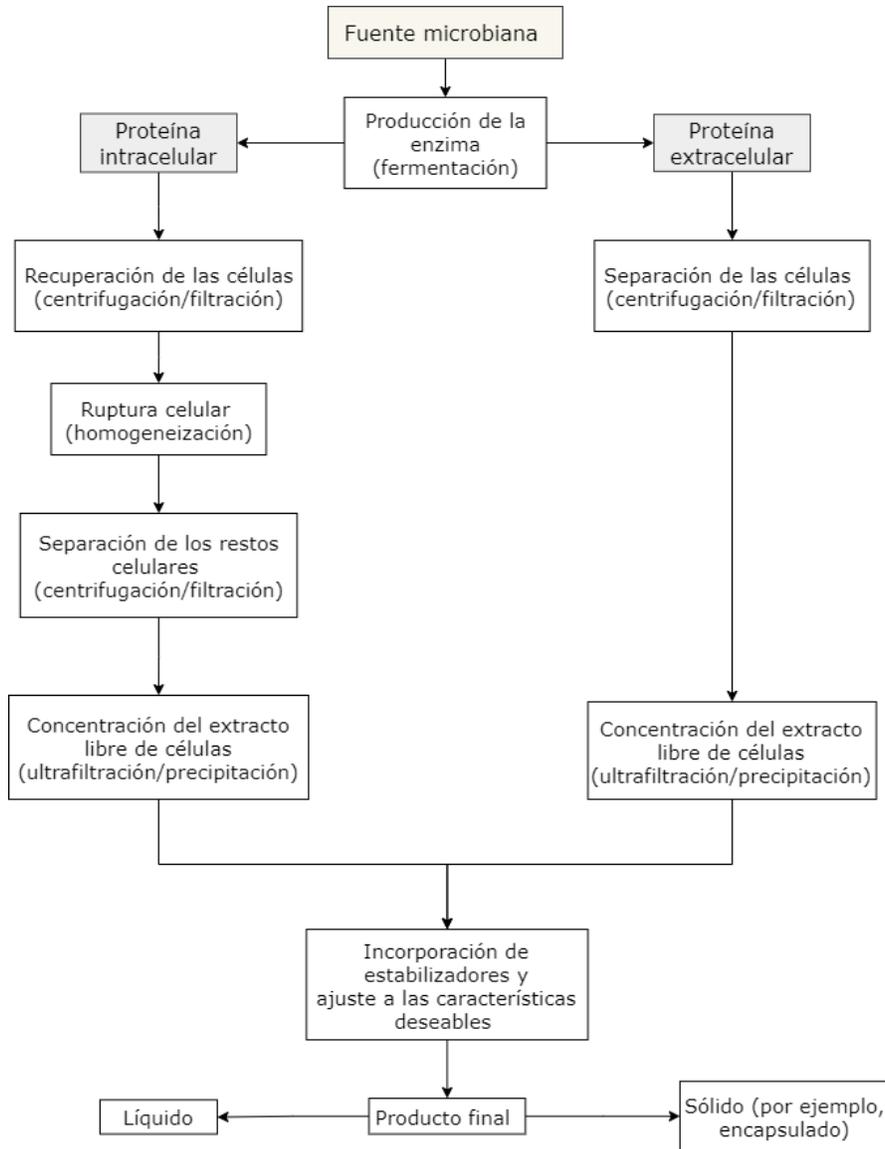


Figura 2. Producción de enzimas industriales a granel.  
 Figura adaptada de Headon & Walsh 1994.

### 1.2.3 Aplicaciones de las enzimas microbianas

Entre las enzimas a granel de origen microbiano que se utilizan en una amplia gama de procesos como la elaboración de alimentos, la producción de detergentes y biocombustibles, en el procesamiento del papel, el cuero, los textiles, los medicamentos y los cosméticos se encuentran las proteasas, las amilasas, las pectinasas, las celulasas, las

xilanasas, y las lipasas, solo mencionar algunas, y son producidas principalmente por hongos filamentosos y bacterias (Li *et al.*, 2012).

En la Tabla 2 se muestran ejemplos de la amplia aplicación de las enzimas microbianas siendo en su mayoría enzimas hidrolíticas.

Tabla 2. Aplicaciones de las enzimas microbianas.

| Campo de aplicación          | Enzimas                             | Aplicación  | Fuente microbiana  |
|------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| Industria láctea             | Quimosina, lipasa, lisozima, renina | Elaboración de queso  | <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>B. stearothermophilus</i>   |
|                              | Proteasa                            | Coagulación de la leche   | <i>Aspergillus niger</i>   |
|                              | $\beta$ -galactosidasa, lactasa     | Descomposición de la lactosa en glucosa   | <i>A. niger</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Streptomyces spp.</i> , <i>Saccharomyces spp.</i> |
| Industria de la panificación | $\alpha$ -amilasa                   | Degradación del almidón en las harinas y control del volumen y estructura del migajón del pan | <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. stearothermophilus</i>  |
|                              | $\beta$ -xilanasas                  | Mejoramiento del manejo y la estabilidad de la masa   | <i>A. niger</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>   |
|                              | Lipasa                              | Mejoramiento de la estabilidad de la masa   | <i>A. niger</i>  |
|                              | Proteasa                            | Reducción del contenido de proteína en la harina  | <i>B. subtilis</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i>  |
| Industria del jugo           | Amilasas y glucoamilasas            | Descomposición del almidón en glucosa<br>Clarificación del jugo                               | <i>Bacillus sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i>   |
|                              | Pectinasa                           | Degradación de pectinas   | <i>A. niger</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium funiculosum</i>  |
|                              | Celulasas y hemicelulasas           | Licuefacción de la fruta. Reducción de la viscosidad y mantenimiento de la textura            | <i>A. niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>  |

|   |                    |  |   |
|---|--------------------|--|---|
|   | Aminopeptidasa     | Rompimiento de proteínas durante la maceración de la fruta   | <i>Lactobacillus brevis, L. plantarum</i>   |
| Procesamiento del almidón en la industria alimenticia | $\alpha$ -amilasa  | Disminución del peso molecular y viscosidad  | <i>B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. subtilis, A. oryzae</i>                     |
|   | $\beta$ -amilasa   | Producción de carbohidratos de bajo peso molecular   | <i>Bacillus polymyxa, Bacillus circulans, B. subtilis, Streptomyces sp., Rhizopus sp.</i> |
|   | Glucoamilasa       | Liberación de $\beta$ -D-glucosa   | <i>A. niger, Rhizopus spp.</i>  |
|   | Isoamilasa         | Hidrólisis del glucógeno y la amilopectina   | <i>Pseudomonas amyloclavata</i>   |
|   | Glucosa isomerasa  | Isomerización de la glucosa a fructosa   | <i>B. coagulans, Actinoplanes missouriensis, Streptomyces olivochromogenes</i>            |
| Industria cervecera                                   | $\alpha$ -amilasa  | Hidrólisis del almidón para reducir viscosidad Incremento del contenido de maltosa y glucosa                 | <i>Bacillus sp., Aspergillus sp.</i>  |
|   | $\beta$ -glucanasa | Hidrólisis de glucanos para obtener una menor viscosidad y una mejor filtración para la separación del mosto | <i>B. subtilis, Aspergillus sp.</i>   |
|   | Pululanasa         | Hidrólisis del almidón para asegurar la máxima fermentación del mosto  | <i>Bacillus sp., Klebsiella sp.</i>   |
|   | Aminopeptidasa     | Disminución de la turbidez de la cerveza   | <i>Lactococcus lactis</i>   |
|   | Proteasa           | Mejoramiento de la malta. Promover el crecimiento de la levadura   | <i>B. subtilis, A. niger</i>  |
| Alimentación animal                                   | Fitasa             | Degradación del ácido fítico para la liberación de fósforo   | <i>Aspergillus ficuum, A. niger</i>   |
|   | $\alpha$ -amilasa  | Degradación del almidón  | <i>B. subtilis, A. niger</i>  |
|   | Proteasa           | Degradación de proteína en péptidos y aminoácidos  | <i>Bacillus subtilis, B. lentus, B. licheniformis, Aspergillus sp., Streptomyces sp.</i>  |
|   | Xilanasas          | Degradación de fibra   | <i>Bacillus sp., Aspergillus sp.</i>  |

|  |  |  |   |
|--|--|--|---|
| Industria farmacéutica                   | Nitrilo hidratasa, transaminasa, monoamino oxidasa, lipasa                           | Síntesis de intermediarios para la producción de ingredientes farmacéuticos activos        | <i>Rhodococcus rhodochrous</i>  |
|  | Penicilina acilasa   | Producción de antibióticos   | <i>Penicillium sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i>  |
| Industria de síntesis orgánica           | Lipasa, nitrilasa, nitrilo hidratasa, esterasa, amidasa, amino oxidasa, aminoacilasa | Acilación, desacilación, enantioseparación   | <i>Candida rugosa</i> , <i>C. antarctica</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>R. miehei</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>R. rhodochrous</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> |
| Detergentes                              | Proteasa   | Hidrolisis de las manchas a base de proteínas en aminoácidos solubles                      | <i>A. oryzae</i> , <i>B. subtilis</i>   |
|  | Lipasa   | Remoción de manchas de grasa, aceite, mantequilla y salsas                                 | <i>A. oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Pseudomonas alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Thermomyces lanuginosa</i>   |
|  | Amilasa  | Remoción de residuos resistentes de almidón  | <i>Aspergillus sp.</i> , <i>B. subtilis</i>   |
|  | Celulasa   | Incremento del brillo y la retención del color. Suavizar el algodón                        | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus sp.</i>  |
| Industria textil                         | Amilasa  | Eliminación de impurezas (desencolado) sin efectos nocivos sobre las telas                 | <i>B. subtilis</i> , <i>A. niger</i>  |
|  | Celulasa   | Remoción de pelusa y microfibras para dar una apariencia más suave y brillante a las telas | <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Trichoderma sp.</i> , <i>Sporotrichum cellulophilum</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Aeromonas sp.</i> , <i>A. niger</i>   |
|  | Lipasa   | Desengrasado de las fibras   | <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>   |
|  | Catalasa   | Degradación del peróxido de hidrógeno residual después del blanqueamiento de fibras        | <i>A. niger</i>   |
| Industria del papel y la pulpa del papel | $\alpha$ -amilasa  | Rompimiento del almidón para reducir la viscosidad   | <i>B. licheniformis</i>   |

|                      |                            |   |   |
|----------------------|----------------------------|---|---|
|                      | Lipasa                     | Control del pitch, material de la madera que normalmente contiene resinas   | <i>C. antarctica, C. rugosa</i>   |
|                      | Celulasa                   | Mejoramiento de la suavidad. Mejoramiento de las propiedades de la fibra. Eliminación de la lignina para mejorar el procesamiento de blanqueo | <i>Bacillus sp., A. niger</i>   |
|                      | Lacasa                     | Blanqueamiento para aumentar el brillo  | <i>B. subtilis</i>  |
|                      | Xilanasa                   | Mejoramiento del procesamiento de blanqueo  | <i>Bacillus sp, A. niger, Trichoderma reesei, Thermomyces lanuginosus, Aureobasidium pullulans</i>                      |
| Industria cosmética  | Lacasa                     | Teñido del cabello  | <i>B. subtilis, Trametes versicolor</i>   |
|                      | Proteasa                   | Cuidado de la piel  | <i>A. niger, A. flavus, B. subtilis</i>   |
|                      | Lipasa                     | Síntesis de ingredientes activos, degradación de grasas y aceites   | <i>A. oryzae, A. flavus</i>   |
| Industria del cuero  | Proteasa                   | Procesamiento del cuero   | <i>Alcaligenes faecalis, A. niger, A. flavus, B. subtilis</i>   |
|                      | Lipasa                     | Degradación de la grasa en el procesamiento del cuero   | <i>A. oryzae, A. flavus, Rhizopus nodosus, B. subtilis</i>  |
| Biocombustibles      | Lipasa, celulasa, xilanasa | Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos para la producción de biodiésel. Descomposición de lignina para la producción de bioetanol   | <i>A. niger, Phanerochaete chrysosporium, Pseudomonas fluorescens, Bacillus sp. C. rugosa, C. lipolytica, R. miehei</i> |
| Agentes terapéuticos | L-asparaginasa             | Quimioterapia   | <i>E. coli, Erwinia chrysanthemii</i>   |
|                      | L-glutaminasa              | Agente antitumoral  | <i>Beauveria bassiana, Vibrio costicola</i>   |
| Reactivos analíticos | Glucosa oxidasa            | Detección de glucosa en la sangre   | <i>A. niger</i>   |
|                      | Glicerol cinasa            | Determinación de triglicéridos en la sangre   | <i>Candida mycoderma</i>  |

|                    |                |  |                            |
|--------------------|----------------|--|----------------------------|
| Biología molecular | ADN polimerasa | Amplificación del ADN en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) | <i>Thermus aquaticus</i>   |
|                    | Nucleasa       | Hidrólisis de enlaces fosfodiéster del ADN para su manipulación genética                       | Varios géneros bacterianos |

\*La información para la elaboración de esta tabla fue adaptada de Singh *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2009; Walsh, 2014; Bansal *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012; Prasad & Roy, 2018; Chapman *et al.*, 2018.

Actualmente el mercado global de enzimas está dominado por las proteasas y las lipasas, seguidas de las carbohidrasas, principalmente amilasas y celulasas (Zhu *et al.*, 2019). Considerando los campos de aplicación de las enzimas, el sector de alimentos y bebidas es el principal consumidor de enzimas industriales, con una participación total de más del 30%. En la Figura 3 se muestra la estimación del mercado global de enzimas para el año 2024 de acuerdo con estudios de mercado y en función de los sectores de aplicación.

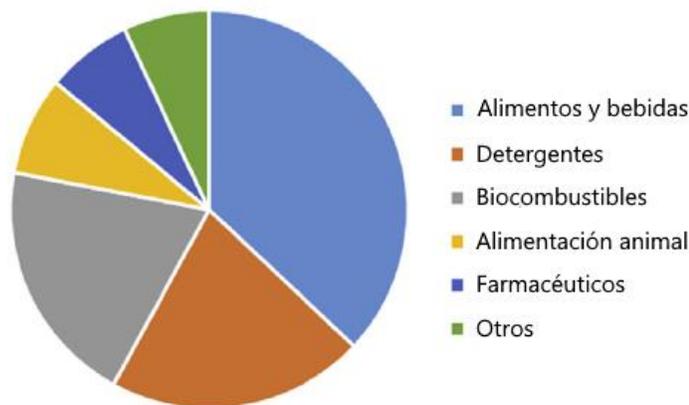


Figura 3. Mercado global de enzimas proyectado para el año 2024 en función de los sectores de aplicación. Figura adaptada de Zhu *et al.*, 2019.

## 1.3 Lipasas

### 1.3.1 Generalidades

Las lipasas (EC 3.1.1.3) como se ha mencionado anteriormente son enzimas pertenecientes a la clase de las hidrolasas que se encuentran en organismos animales, vegetales y microorganismos (Filhi *et al.*, 2019).

Los sustratos naturales de las lipasas son triacilglicerol de cadena larga ( $\geq 10$  átomos de carbono), considerados compuestos lipídicos insolubles (Lotti & Alberghina, 2007). Hidrolizan los enlaces éster presentes en la molécula de triacilglicerol liberando ácidos grasos y glicerol (Figura 4) (Jaeger y Reetz, 1998; Verma *et al.*, 2021).

En condiciones no acuosas, generalmente estando en presencia de disolventes orgánicos, las lipasas también son capaces de catalizar reacciones de esterificación, transesterificación y aminólisis (Verma *et al.*, 2021).

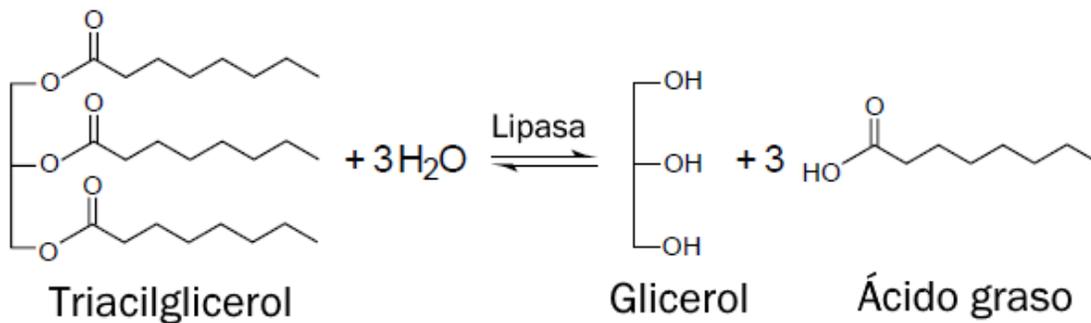


Figura 4. Catálisis de las lipasas sobre una molécula de triacilglicerol.

### 1.3.2 Características estructurales

Las lipasas presentan pesos moleculares variables entre 20 kDa y 60 kDa, sin embargo, casi todas comparten aspectos de una estructura tridimensional común (Walsh, 2014). La mayoría de las lipasas comparten un mismo plegamiento altamente conservado entre las hidrolasas denominado plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasa, comparten el pentapéptido G-X-S-X-G (donde X es cualquier aminoácido) en el que se encuentra la serina catalítica, y comparten los residuos de aminoácidos que son clave para la actividad catalítica: serina, aspartato (o glutamato) e histidina (Yao *et al.*, 2021; Kovacic *et al.*, 2019).

El plegamiento  $\alpha/\beta$ -hidrolasa se caracteriza por ser una lámina- $\beta$  central compuesta por ocho hebras- $\beta$ , siendo la segunda ( $\beta$ -2) antiparalela, las hebras ( $\beta$ 3- $\beta$ 8) están conectadas por seis hélices- $\alpha$  organizadas a ambos lados de la lámina (Figura 5). Existen algunas diferencias entre lipasas en la cantidad y el arreglo de las láminas- $\beta$ , las hélices- $\alpha$  y los bucles (Walsh, 2014; Kovacic *et al.*, 2019; Jaeger & Reetz, 1998).

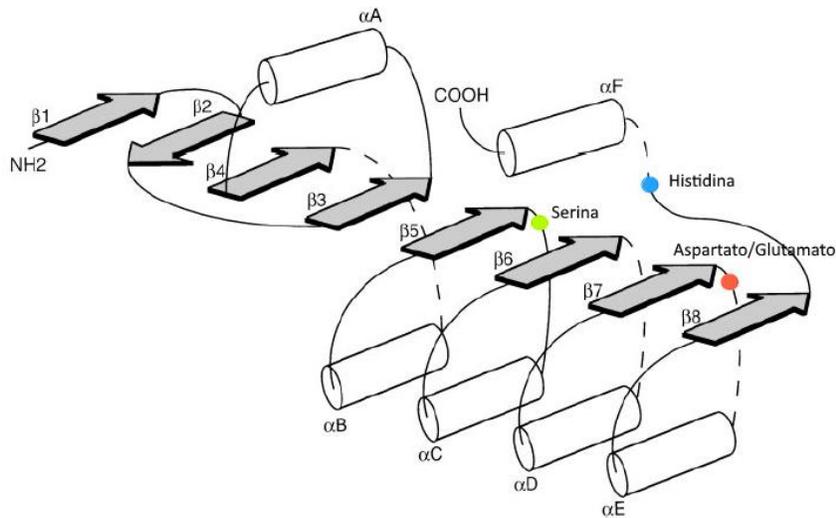


Figura 5. Plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa de las lipasas. Figura adaptada de Jaeger *et al.*, 1999. Las flechas representan las lámina- $\beta$  y los cilindros las hélice- $\alpha$ . En colores se representan los aminoácidos de la triada catalítica serina (verde), aspartato/glutamato (anaranjado e histidina (azul)).

### 1.3.3 Clasificación basada en la especificidad y selectividad

Entre las propiedades de las lipasas destacan su selectividad y especificidad, propiedades importantes para la amplia aplicabilidad que tienen estas enzimas. Considerando estas propiedades, las lipasas se agrupan en tres categorías: lipasas regioselectivas, lipasas específicas de sustrato y lipasas enantioselectivas (Sarmah *et al.*, 2017). Una lipasa puede presentar más de una de las propiedades mencionadas. Hay lipasas regio- y estereoselectivas; y hay lipasas que presentan especificidad de sustrato y regioselectividad (Bencze *et al.*, 2011; Stránský *et al.*, 2007), por lo que una categoría no excluye a otra para clasificar a una lipasa.

#### Lipasas regioselectivas

Considerando la estructura de los triacilglicérols, sustratos naturales de las lipasas, la regioselectividad hace referencia a la posición de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol (Lotti & Alberghina, 2007). De esta manera las lipasas se pueden clasificar en lipasas regioespecíficas y lipasas no específicas (Ebrahimpour *et al.*, 2011).

El grupo de lipasas regioespecíficas incluye lipasas 1,3-regioespecíficas y lipasas 2-regioespecíficas, sin embargo, la mayoría de las lipasas identificadas son 1,3-regioespecíficas (Lai *et al.*, 2019). Estas últimas hidrolizan/esterifican preferentemente los ácidos grasos en las posiciones sn-1 (por sus siglas en inglés stereospecific numbering) y sn-3 del esqueleto de glicerol. Cuando ocurre una reacción de hidrólisis se producen ácidos grasos libres, 2-monoacilglicérol y 1,2 o 2,3-diacilglicérol (Bornscheuer, 2018). Estos intermediarios experimentan la migración espontánea del grupo acilo de la posición sn-2 y forman 1-monoacilglicérol y 1,3-diacilglicérol. El fenómeno de migración del grupo acilo permite la descomposición completa de los triacilglicérol presentes en grasas y aceites cuando se lleva a cabo una incubación prolongada con lipasas 1,3-regioespecíficas (Adlercreutz, 1994; Macrae & Hammond, 1985).

Entre las lipasas 1,3-regioespecíficas destacan la lipasa pancreática humana, las lipasas de origen fúngico de *R. miehei*, *R. arrizus*, *R. delemar*, *R. oryzae*, *P. camembertii*, *P. roquefortii*, *A. niger*, *A. oryzae*, *T. lanuginosa*, y lipasas de los géneros bacterianos *Bacillus* y *Pseudomonas* (Diks & Bosley, 2000; Meghwanshi, 2006; Wei *et al.*, 2020). Algunas de estas lipasas se comercializan en formas granuladas o inmovilizadas para diversas aplicaciones.

Las lipasas 2-regioespecíficas catalizan selectivamente la hidrólisis del enlace éster de los ácidos grasos de posición sn-2 del esqueleto de glicerol y producen específicamente 1,3-diacilglicérol (Verma *et al.*, 2021). Se ha encontrado poca evidencia experimental de este tipo de enzimas, sin embargo, las lipasas de *G. candidum* y la lipasa A de *C. antarctica* han mostrado una clara preferencia por la posición sn-2 de triacilglicérol (Park & Park, 2022).

Las lipasas no específicas hidrolizan/esterifican ácidos grasos independientemente de su posición en el esqueleto de glicerol. Catalizan la descomposición completa de los triacilglicérol en ácidos grasos libres y glicerol ya que hidrolizan más rápidamente los intermediarios, mono y diacilglicérol que los propios triacilglicérol (Kapoor & Gupta, 2012; Macrae & Hammond, 1985). Entre las lipasas que pertenecen a este grupo se encuentran las lipasas microbianas de *C. rugosa*, *C. cylindracea*, *C. acnes* y *S. aureus*. Particularmente destaca la lipasa B de *C. antarctica*, denominada comercialmente como

Lipozyme® CALB, y su versión inmovilizada denominada Novozym® 435, ambas ampliamente utilizadas en la industria.

### **Lipasas sustrato-específicas**

Las lipasas sustrato-específicas se utilizan generalmente en mezclas de diferentes compuestos ya que actúan selectivamente sobre un tipo de sustrato, ya sea sobre moléculas de ácidos grasos o moléculas de alcohol. Por lo anterior se dividen en lipasas ácido graso-específicas y lipasas alcohol-específicas (Lotti & Alberghina, 2007).

La especificidad de las lipasas ácido graso-específicas depende de la longitud o la insaturación de la cadena carbonada de ácido graso. Algunas lipasas actúan preferentemente sobre triacilgliceroles de ácidos grasos de cadena corta, sobre los de cadena mediana o sobre los de cadena larga (Verma *et al.*, 2021).

La especificidad de sustrato de varias lipasas se ha reportado ampliamente. Una lipasa de *A. flavus* muestra mayor preferencia sobre la tricaprilina que por la trioleína, mientras que lipasas de *P. roquefortii* hidrolizan ácidos grasos de cadena corta pero no de cadena mediana y larga (Kapoor & Gupta, 2012). En cuanto a lipasas bacterianas, una lipasa de *Burkholderia sp.* tiene preferencia por triacilgliceroles de cadenas largas mayores a 12 carbonos, una lipasa de *Pseudomonas sp.* KWI-56 presenta actividad sobre triacilgliceroles de cadenas carbonadas de 10 a 14 carbonos, y una lipasa de *P. aeruginosa* EF2 tiene preferencia por ácidos grasos de 18 carbonos (Gupta *et al.*, 2004).

Las lipasas alcohol-específicas se caracterizan por catalizar la síntesis de ésteres. La presencia y la disposición del grupo funcional hidroxilo en una molécula es determinante para la afinidad de la lipasa por el sustrato (Verma *et al.*, 2021). La reacción de esterificación de las lipasas de *C. antarctica*, *C. rugosa*, *R. delmar*, *R. miehei*, *A. niger*, *G. candidum*, *C. viscosum*, *Pseudomonas sp.*, *B. cepacia* y *Serratia marcescens* ha sido ampliamente reportada (Gandhi *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2022)

### **Lipasas enantioselectivas**

La enantioselectividad se refiere a la preferencia de algunas lipasas por un enantiómero particular en una mezcla racémica (Sarmah *et al.*, 2017). Entre las lipasas que destacan

por esta propiedad se encuentran la lipasa B de *C. antarctica* y las lipasas de *R. oryzae*, *R. miehei*, *C. rugosa*, *T. lanuginosa*, *G. candidum*, las cuales se comercializan ampliamente, así mismo, destacan las lipasas bacterianas de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *B. cepacia* (Berglund, 2001; Casas-Godoy *et al.*, 2018).

#### 1.3.4 Clasificación basada en la secuencia proteica

En 1999 Arpigny y Jaeger propusieron la clasificación de las enzimas lipolíticas bacterianas en ocho familias (I-VIII) en función de la similitud entre su secuencia de aminoácidos y sus propiedades fisiológicas (Arpigny & Jaeger, 1999). Posteriormente, en el año 2010 Hausmann y Jaeger actualizaron la clasificación e incluyeron nuevas enzimas lipolíticas e incluyeron propiedades bioquímicas novedosas para algunas enzimas (Hausmann & Jaeger, 2010).

Actualmente Kovacic y colaboradores clasifican a las enzimas lipolíticas bacterianas en 19 familias. En esta nueva clasificación se describen las secuencias, los datos bioquímicos y estructurales de nuevas familias (IX-XIX), y se han agregado nuevos miembros a las familias I-VIII (Kovacic *et al.*, 2019). Para identificar la relación filogenética entre las familias de las enzimas lipolíticas bacterianas, Kovacic y colaboradores construyeron un árbol filogenético basado en la alineación de las secuencias de 64 enzimas lipolíticas que representan a las 19 familias (Figura 6).

#### 1.3.5 Familia I: Triacilglicerol lipasas

Esta familia está compuesta de ocho subfamilias (Tabla 3) cada una con características particulares (Arpigny & Jaeger, 1999; Hausmann & Jaeger, 2010; Kovacic *et al.*, 2019).

A continuación, se describen brevemente las características de cada subfamilia.

##### **Subfamilias I.1 y I.2**

Las lipasas pertenecientes a la subfamilia I.1 muestran gran similitud de secuencia con la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* y sus pesos moleculares oscilan entre 30-32 kDa. Por otro lado, las lipasas de la subfamilia I.2 presentan gran similitud con la lipasa de *Burkholderia glumae* y tienen un peso molecular ligeramente mayor ya que poseen dos hebras- $\beta$  antiparalelas adicionales.

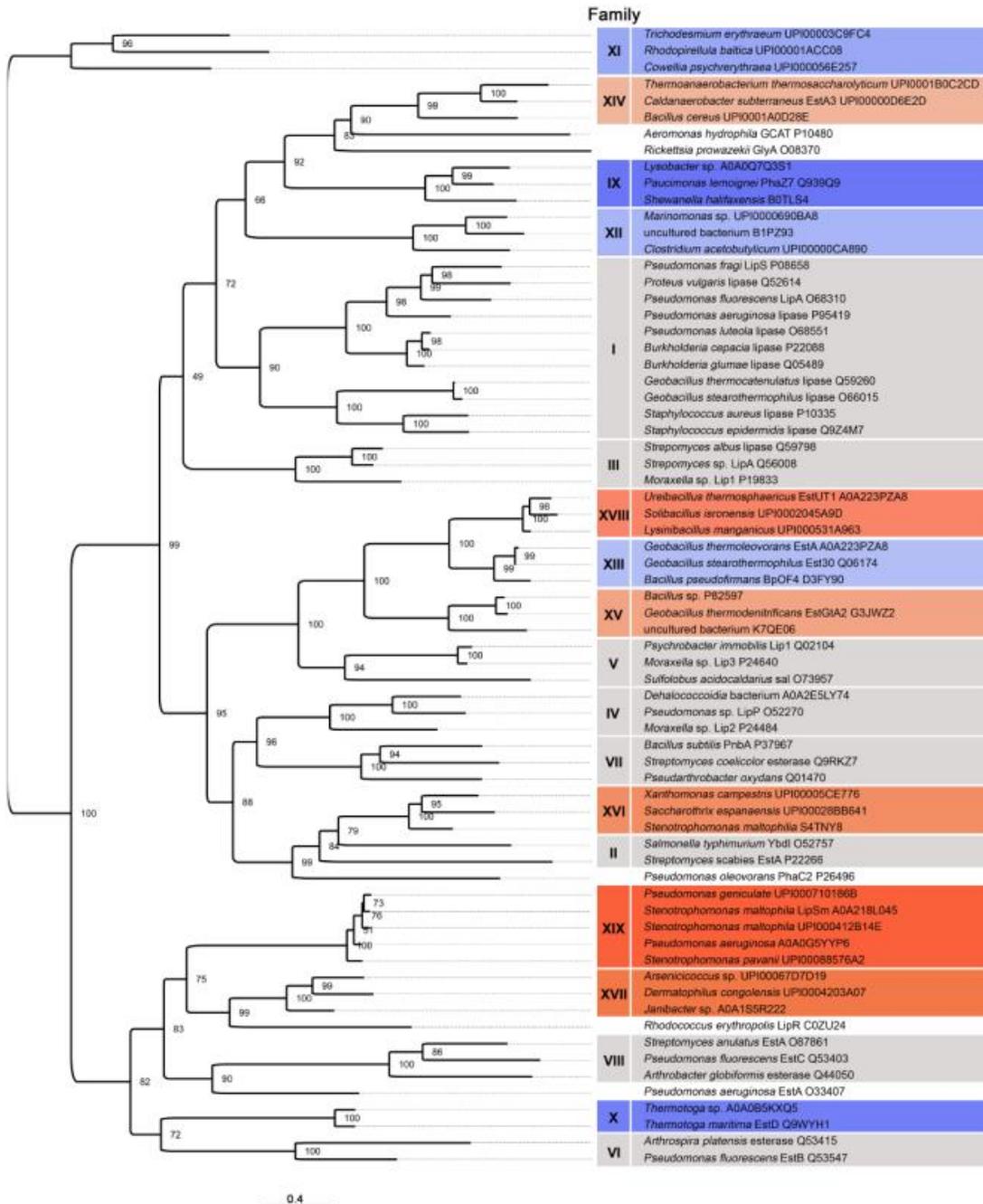


Figura 6. Árbol filogenético de las enzimas lipolíticas clasificadas en 19 familias (Kovacic et al., 2019). En color gris se representan algunos de los miembros de las ocho familias de la primera clasificación realizada por Arpigny y Jaeger en 1999, en color azul se presentan algunos de los miembros de la familia IX a la familia XII y en color anaranjado se representan algunos de los miembros de la familia XIII a la familia XIX, de la clasificación extendida realizada por Kovacic y colaboradores en 2019.

Tabla 3. Subfamilias de la familia I de enzimas lipolíticas.

| Subfamilia                   | Origen                               | Número de acceso (UniProt o PDB)   |
|------------------------------|--------------------------------------|--|
| I.1                          | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>        | P26876   |
|                              | <i>Pseudomonas mendocina</i>         | Q8RKT7   |
|                              | <i>Rhodofera ferrireducens</i>       | Q21T36   |
|                              | <i>Virbio cholerae</i>               | P15493, A6A105, A5EYU1, A1F3S2, A3H0H8, A2PI47, A3EDG4, A3GSF6, A1EMR8, A2P8X1, A6AE39, A6XWR7, A2PS04, A3EIQ3 |
|                              | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>       | A6B1H2   |
|                              | <i>Vibrio harveyi</i>                | A6AS17   |
|                              | <i>Aeromonas hydrophila</i>          | A0KFL9   |
|                              | <i>Dehalococcoides sp.</i>           | A8CY80   |
|                              | <i>Chromobacterium violaceum</i>     | Q7NUI4   |
|                              | <i>Proteus mirabilis</i>             | AGXN   |
| I.2                          | <i>Burkholderia glumae</i>           | Q05489   |
|                              | <i>Burkholderia cenocepacia</i>      | Q1BM22, A0AZ26, B1K3P3   |
|                              | <i>Burkholderia multivorans</i>      | Q45VN4, A9AMF2   |
|                              | <i>Burkholderia thailandensis</i>    | Q2T7L1   |
|                              | <i>Pseudomonas KWI-56</i>            | P25275   |
|                              | <i>Burkholderia cepacia</i>          | P22088, Q4JL88, Q6B4I1, Q0BAH5   |
|                              | <i>Pseudomonas luteola</i>           | O68551   |
| I.3                          | <i>Pseudomonas fluorescens Pf01</i>  | Q3KCS9   |
|                              | <i>Pseudomonas fluorescens</i>       | P26504, P41773, Q76D26, Q76D27, Q76D28, Q76D29, Q76D31, Q76D32   |
|                              | <i>Pseudomonas sp. 7323</i>          | Q2KTB3   |
|                              | <i>Pseudomonas entomophila</i>       | Q1IBE9   |
|                              | <i>Serratia proteamaculans</i>       | A8GDX0   |
|                              | <i>Serratia marcescens</i>           | Q09KJ5, Q0MVP2, Q59932, Q59933   |
|                              | Bacteria no cultivable               | A7J993   |
|                              | <i>Psychrobacter sp. PR-Wf-1</i>     | A5WGV1   |
|                              | Bacteria no cultivable               | A0A0F7IH45   |
| <i>Pseudomonas sp. MIS38</i> | 2Z8X                                 |  |
| I.4                          | <i>Bacillus subtilis</i>             | P37957   |
|                              | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>    | A7Z124   |
|                              | <i>Bacillus pumilus</i>              | A1E152, A8FGA4   |
|                              | <i>Bacillus licheniformis</i>        | Q9K5F4   |
|                              | <i>Bacillus sp. NK13</i>             | B0LW76   |
|                              | <i>Bacillus megaterium</i>           | Q8RJP5   |
|                              | <i>Bacillus clausii</i>              | Q5WDN0   |
| I.5                          | <i>Bacillus thermocatenulatus</i>    | Q59260   |
|                              | <i>Geobacillus zalihae</i>           | Q842J9   |
|                              | <i>Bacillus sp. L2</i>               | Q5I4I3   |
|                              | <i>Geobacillus sp. SF1</i>           | Q1L776   |
|                              | <i>Bacillus stearothermophilus</i>   | A0MTM1, O66015, Q93A71, Q9L6D3   |
|                              | <i>Geobacillus kaustophilus</i>      | Q5KYG5   |
|                              | <i>Geobacillus thermocatenulatus</i> | 2W22   |
| <i>Geobacillus zalihae</i>   | 2DSN                                 |  |

|     |                                       |  |
|-----|---------------------------------------|--|
| I.6 | <i>Staphylococcus hyicus</i>          | P04635   |
|     | <i>Staphylococcus simulans</i>        | Q84EK3   |
|     | <i>Staphylococcus xylosus</i>         | Q2TPV1   |
|     | <i>Staphylococcus epidermis</i>       | POC0R3, Q9Z4M7, POC0R4, Q5HKF8, Q5HKP6   |
|     | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>    | Q9RGZ6   |
|     | <i>Staphylococcus warneri</i>         | Q5DWE2   |
|     | <i>Staphylococcus aureus</i>          | P10335, Q59811, Q79SZ7, Q2YVD0, Q2YZ74, Q5HCM7, Q5HJ48, A6TYA4, A6U555, A5IPI7, A5IW97, Q6GDD3, Q6GJZ6, Q6G604, Q6GCF1, P65288, Q99WQ6, Q8NUI5, Q8NYC2, P65289, Q7A7P2, Q2FUU5, Q2G155, A8YZE4, A8Z5H0, Q2FDJ1, Q2FJU4 |
| I.7 | <i>Streptomyces cinnamoneus</i>       | O33969   |
|     | <i>Propionibacterium acnes</i>        | Q59644, Q6A6T8   |
|     | <i>Corynebacterium glutamicum</i>     | Q8NU60, Q8NU59   |
|     | <i>Janibacter sp. HTCC2649</i>        | EAP97825   |
| I.8 | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | Q3IF07   |
|     | <i>Hahella chejuensis</i>             | Q2SGZ8   |
|     | <i>Colwellia psychrerythraea</i>      | Q48AN1   |
|     | <i>Pseudoalteromonas tunicata</i>     | A4CF12   |

Ambas subfamilias comprenden lipasas de bacterias Gram (-) que son secretadas por la vía de secreción tipo II, un proceso de dos pasos. En primer lugar, las proteínas se expresan con un péptido señal N-terminal que las dirige a la maquinaria Sec o Tat para su translocación a través de la membrana interna hacia el periplasma. Posteriormente el péptido señal es eliminado y las proteínas completamente plegadas son translocadas al exterior a través de la membrana externa (Cianciotto, 2005; Johnson *et al.*, 2006).

Entre otras características de estas lipasas destacan el pentapéptido G-X-S-X-G en el que se encuentra la serina catalítica. A pesar de compartir la triada catalítica Ser-Asp-His con otras familias de lipasas, el pentapéptido no está presente en las lipasas de las demás familias, cada familia de enzimas lipolíticas presenta una distinta secuencia de aminoácidos altamente conservada.

Para que estas lipasas adquieran su forma activa dependen del plegamiento asistido por otra proteína denominada foldasa específica de lipasa o "proteína Lif" por sus siglas en inglés (lipase-specific foldase). Las proteínas Lif se han identificado en una variedad de

cepas diferentes, incluidas algunas de los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Vibrio*. Ambas proteínas se encuentran codificadas en un operón como se esquematiza en la Figura 7 (Hausmann & Jaeger, 2010; Rosenau & Jaeger, 2000).



Figura 7. Operón lipasa. La lipasa está codificada por el gen *lip* y la foldasa específica de lipasa por el gen *lif*. Figura adaptada de Rosenau & Jaeger, 2000.

### Subfamilia I.3

Estas lipasas tienen un peso molecular entre 50 kDa y 65 kDa, se exportan mediante la vía de secreción de tipo I y poseen un péptido señal C-terminal. Esta vía de secreción también se encuentra ampliamente en bacterias Gram (-) y, a diferencia de la vía de secreción tipo II, incluye un solo paso. Mediante esta vía las proteínas desplegadas se translocan a través del periplasma por un canal de proteínas directamente al medio extracelular sin intermediarios periplásmicos. Las proteínas que se secretan por esta vía se caracterizan por tener una secuencia de secreción C-terminal que no se escinde durante o después de la translocación. Finalmente, en el medio extracelular se desencadena el plegamiento de la proteína (Kanonenberg et al., 2018; Spitz et al., 2019).

Esta subfamilia contiene enzimas descritas a partir de cepas de al menos dos especies distintas: *Pseudomonas fluorescens* y *Serratia marcescens*.

### Subfamilia I.4

Son las lipasas más pequeñas que se han identificado con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa. En esta subfamilia se pueden encontrar varias lipasas del género *Bacillus*. El pentapéptido conservado de estas lipasas es A-X-S-X-G, en el que hay una alanina en la primera posición a diferencia de la glicina en el pentapéptido canónico G-X-S-X-G.

### **Subfamilia I.5**

Las lipasas de esta subfamilia pertenecen a diferentes bacterias Gram (+) de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus* y *Clostridium*.

### **Subfamilia I.6**

Esta subfamilia comprende varias lipasas del género *Staphylococcus*. Tienen un peso molecular de aproximadamente 75 kDa y se expresan como preproteínas.

### **Subfamilia I.7**

Son lipasas que muestran una similitud significativa con las lipasas de la subfamilia I.2 aunque con pesos moleculares menores.

### **Subfamilia I.8**

Es una nueva subfamilia de lipasas propuesta a partir de la identificación y caracterización de una lipasa de la bacteria psicrófila *Pseudoalteromonas haloplanktis*, por lo que en esta subfamilia se encuentran lipasas de cepas psicrófilas.

#### **1.3.5 Mecanismo catalítico**

##### **Mecanismo de hidrólisis**

La acción catalítica de las lipasas se debe a los aminoácidos ya mencionados serina, aspartato e histidina. Este mecanismo se puede dividir en cuatro pasos representados en la Figura 8 (Castillo *et al.*, 2015; Jaeger *et al.*, 1999; Lotti & Alberghina, 2007).

1. El mecanismo comienza con un paso de acilación el que se transfiere un protón entre los residuos de la triada catalítica serina, histidina y aspartato. Esta activación aumenta la nucleofilia del grupo hidroxilo de la serina y facilita el ataque al grupo carbonilo del sustrato.
2. Se forma un intermediario tetraédrico con una carga negativa en el oxígeno del grupo carbonilo que es estabilizado por la región de la proteína conocida como agujero oxianión. Esta región generalmente está formada por residuos de glutamina y treonina, y estabilizan el intermediario tetraédrico mediante la formación de al menos dos puentes de hidrógeno. La histidina de la triada catalítica dona un protón al componente alcohol saliente del sustrato.



El mecanismo de la esterificación catalizada por lipasas también involucra dos intermediarios tetraédricos. El primer intermediario se forma por el ataque nucleofílico del residuo de serina de la triada catalítica sobre el ácido graso, el intermediario pierde una molécula de agua y da lugar al complejo acil-enzima. Posteriormente una molécula de alcohol realiza un ataque nucleofílico para dar lugar al otro intermediario, el cual, finalmente, se libera como un éster y la enzima se regenera. Al igual que en la reacción de hidrólisis los intermediarios se estabilizan por el agujero oxianión mediante puentes de hidrógeno (Figura 9).

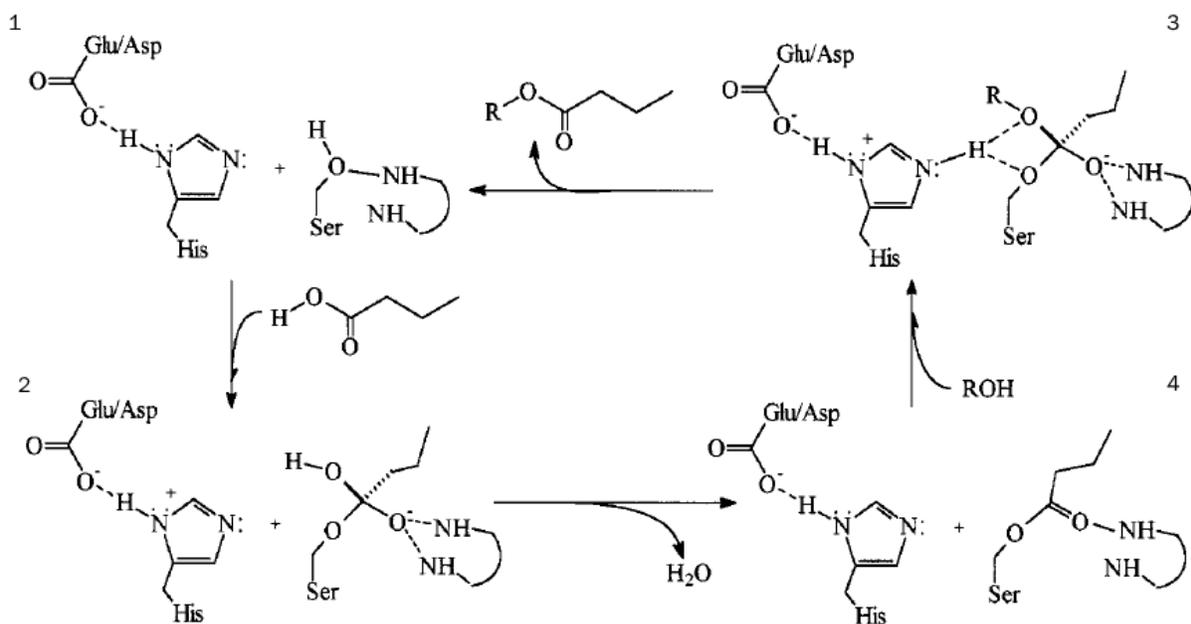


Figura 9. Mecanismo catalítico de esterificación de las lipasas. Figura adaptada de Gandhi *et al.*, 2000.

### Mecanismo de transesterificación

Las lipasas también llevan a cabo la transesterificación de ácidos grasos libres. El mecanismo de transesterificación se ha reportado desde dos puntos de vista. Por un lado, las lipasas sintetizan ésteres mediante el ataque nucleofílico de un alcohol sobre un triacilglicerol liberando ésteres y el resto de alcohol (Figura 10). Por otro lado, los ácidos grasos resultantes se pueden esterificar a un segundo sustrato (Bajaj *et al.*, 2010; Canet *et al.*, 2016).

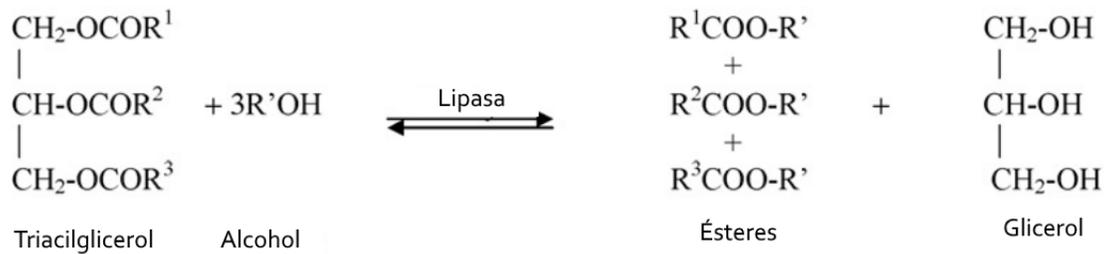


Figura 10. Mecanismo catalítico de transesterificación de las lipasas.  
 Figura adaptada de Bajaj *et al.*, 2010.

### Otras reacciones catalizadas por lipasas

Entre otras reacciones que catalizan las lipasas se encuentran las reacciones de interesterificación, que se caracterizan por el intercambio entre los sustituyentes de dos triacilgliceroles diferentes, y las reacciones de acidólisis y aminólisis, que hacen referencia a la descomposición por carboxilatos y aminas como agentes nucleofílicos, respectivamente (Chandra *et al.*, 2020; Salgado *et al.*, 2021).

#### 1.3.6 Aplicaciones biotecnológicas

Las lipasas son consideradas biocatalizadores versátiles por su capacidad de catalizar una amplia gama de reacciones. La versatilidad de las lipasas se debe a su regio-selectividad, quimio-selectividad, enantio-selectividad y a su función catalizadora tanto en medios acuosos como no acuosos (Sarmah *et al.*, 2017).

A continuación, se presenta una breve descripción de la aplicación de las lipasas en diferentes campos destacando su importancia.

#### Detergentes

Una de las aplicaciones más importantes de las lipasas es su uso como aditivo en detergentes siendo el segundo aditivo enzimático detergente más importante después de las proteasas. Se estima que cada año se añaden 1000 toneladas de lipasas en alrededor de trece mil millones de toneladas de detergente (Yao *et al.*, 2021).

Las lipasas actúan sobre manchas que contienen grasas provenientes de aceites, mantequilla, salsas, sopa, sebo humano o cosméticos. La enzima hidroliza los triacilgliceroles en compuestos más solubles (Hasan *et al.*, 2006).

La primera lipasa producida para su uso como aditivo en detergentes fue aislada del hongo *T. lanuginosus*, conocida comercialmente como Lipolase™. Posteriormente se aislaron lipasas bacterianas de *P. mendocina* y *P. alcaligenes*, conocidas comercialmente como Lumafast™ y Lipomax™, respectivamente (Jaeger & Reetz, 1998).

La aplicación de enzimas en la formulación de detergentes generalmente requiere el uso de una preparación enzimática cruda o de una enzima parcialmente purificada (Robinson, 2015). Cherif y colaboradores, Sarawat y colaboradores, y Alabdall y colaboradores han descrito el uso de algunas lipasas microbianas en la formulación de detergentes. Este uso comprende el poner en contacto la enzima o el extracto enzimático con el medio que contiene los lípidos a degradar en condiciones compatibles con el rango de pH y temperatura en los que la lipasa es funcional (Cherif *et al.*, 2011; Sarawat *et al.*, 2017; Alabdall *et al.*, 2021).

### **Industria de alimentos**

Este sector es un importante consumidor de lipasas y otros biocatalizadores en el mercado mundial de enzimas (Melani *et al.*, 2020).

La modificación de grasas y aceites es una de las principales áreas de la industria del procesamiento de alimentos. Las lipasas se utilizan para llevar a cabo reacciones de interesterificación para dar lugar a lípidos estructurados, los cuales, son triacilgliceroles modificados con cambios en su composición de ácidos grasos y/o en la posición de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol. Estos lípidos poseen propiedades nutricionales y fisicoquímicas importantes. La síntesis de lípidos estructurados requiere reacciones posicionalmente específicas para las cuales, el uso de lipasas regioespecíficas han demostrado ser efectivas (Iwasaki & Yamane, 2000; Wei *et al.*, 2015; Salgado *et al.*, 2022).

La síntesis de los equivalentes de manteca de cacao, sustituyentes de la grasa de la leche humana para la producción de alimento para bebé y los aceites enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son solo algunos ejemplos de lípidos estructurados que se

sintetizan mediante el uso de diversas lipasas microbianas entre las que se encuentran la lipasa B de *C. antarctica*, la lipasa inmovilizada de *R. miehei* y las lipasas de *T. lanuginosa*, *C. lipolytica*, *R. oryzae* y *Alcaligenes sp.* (Casas-Godoy et al., 2018; Hasibuan et al., 2021).

En la industria láctea las lipasas se utilizan ampliamente para la hidrólisis de la grasa de la leche, el mejoramiento del sabor de los quesos y la aceleración de la maduración del queso. Los ácidos grasos libres generados por acción de las lipasas sobre la grasa de la leche dotan a muchos productos lácteos de su sabor característico. Los ácidos grasos de cadenas cortas (C4 y C6) se relacionan con el desarrollo de un sabor fuerte y ácido en el queso. El sabor del queso azul se debe a los ácidos grasos producidos por las lipasas de *P. roqueforti*, mientras que las lipasas de *P. camemberti* se utilizan para la maduración de los quesos Camembert, Brie y Neufchatel. Entre otras lipasas utilizadas destacan las de *C. rugosa*, *R. mehei*, *A. niger* y *A. oryzae* (Hasan et al., 2006; Salgado et al., 2022).

Otra de las aplicaciones de las lipasas en la industria de los alimentos es en la síntesis de ésteres a partir de reacciones de esterificación y transesterificación. Estos ésteres se utilizan para dar sabor y aroma a los alimentos (Javed et al., 2018). Los ésteres sintetizados por lipasas, al ser productos naturales, son una alternativa a la extracción de los compuestos directamente de sus fuentes naturales. Los ésteres que se extraen de las plantas generalmente se extraen con bajo rendimiento o con bajas concentraciones aumentando los costos de producción (Ghandi et al., 2000; Cong et al., 2019).

A partir del uso de lipasas bacterianas y fúngicas se ha llevado a cabo la síntesis de diferentes ésteres. Las lipasas de *A. niger* F0215 y *Acinetobacter sp.* se utilizan en la síntesis de caproato de etilo para dar los sabores frutales de manzana, plátano y piña. Las lipasas de *Staphylococcus* se utilizan para la síntesis de acetato de isoamilo y acetato de butilo para dar los sabores de plátano y piña, respectivamente. Una lipasa inmovilizada de *P. fluorescens* se utiliza para la síntesis de acetato de bencilo para dar los sabores de fresa y plátano (Javed et al., 2018; Cong et al., 2019; Gomes-Almeida et al., 2017). Así mismo, la lipasa B de *C. antarctica* ha sido útil en la síntesis de varios ésteres de cadena corta como el butirato de bencilo para dar los sabores a manzana, uva, cereza, piña y durazno (Larios et al., 2004; Gomes-Almeida et al., 2017).

## **Industria farmacéutica**

Las lipasas también tienen aplicaciones importantes en la industria farmacéutica (Melani et al., 2020).

Un ejemplo clave es el aprovechamiento de la estereo-selectividad de las lipasas para la producción de productos e intermediarios farmacéuticos. La esterificación selectiva de las lipasas facilita el aislamiento de un único enantiómero activo de una mezcla racémica. Por lo general, solo un isómero promueve el efecto biológico deseado, siendo el otro biológicamente inactivo, sin embargo, este último puede ejercer una actividad biológica negativa y debe eliminarse del producto final (Yao et al., 2021). La separación de isómeros de ibuprofeno es un caso exitoso de la aplicación de las lipasas en este campo (Walsh, 2014).

## **Industria del papel**

Durante el procesamiento del papel las resinas y los aceites provenientes de la madera representan obstáculos para que el proceso se lleve a cabo de manera eficiente. Las lipasas se utilizan para eliminar estos compuestos lipídicos, mejorando así la calidad, la capacidad de producción y la blancura del papel (Yao et al., 2021; Hasan et al., 2006).

Nippon Paper Industries en Japón desarrolló un método para hidrolizar hasta el 90% de los triacilgliceroles para la producción de papel con el uso de la lipasa de *C. rugosa* (Jaeger & Reetz 1998).

## **Procesamiento del cuero**

Tradicionalmente se utilizan compuestos químicos para la eliminación de las grasas durante la fabricación del cuero, sin embargo, actualmente las lipasas se emplean en el proceso de desengrasado del cuero, siendo este un proceso amigable con el ambiente que permite obtener cuero de mejor calidad con color más uniforme y una apariencia más limpia (Hasan et al., 2006; Saran et al., 2019). La lipasa alcalina y termoestable de *G. thermoleovorans* se ha utilizado para mejorar la calidad del cuero (Javed et al., 2018). Así mismo, preparaciones enzimáticas comerciales como NovoCor® AD L se han utilizado exitosamente en este campo (Hasan et al., 2006).

## **Producción de biodiesel**

Los biocombustibles como el biodiésel son una alternativa al uso de combustibles fósiles. La producción de biodiésel por acción de las lipasas se debe a la transesterificación de varios aceites/grasas con alcohol. La transesterificación enzimática tiene muchas ventajas sobre la química entre las que destacan la fácil recuperación del producto y de subproductos, la mínima producción de residuos y un menor consumo de energía (Sarmah *et al.*, 2018).

Entre las lipasas utilizadas en este campo se encuentran las lipasas de *A. venetianus*, *B. cepacia*, *Ralstonia sp.* *P. fluorescens*, *T. lanuginosus* y *C. antarctica* (Hasan *et al.*, 2006; Chapman *et al.*, 2018).

## **Biorremediación**

La creciente preocupación por la presencia de desechos orgánicos como grasas y aceites en efluentes de las industrias, de restaurantes, mataderos, hospitales y aguas residuales domésticas, ha llevado a la búsqueda e implementación de procesos que permitan la degradación parcial o total de estos compuestos (Melani *et al.*, 2020). Actualmente las lipasas se han llegado utilizar para el tratamiento de aguas con alto contenido de lípidos ya sea directamente como enzimas libres de células o como enzimas extracelulares que secretan microorganismos productores de lipasas (Chapman *et al.*, 2018).

Se han realizado estudios con preparaciones de lipasas crudas o parcialmente purificadas para el tratamiento de aguas residuales. La lipasa cruda de *P. aeruginosa* LP602 se añadió a aguas residuales de restaurantes ricas en lípidos lográndose una reducción del contenido lipídico en un 70% durante las primeras 24 h y no siendo detectables los lípidos después de 48 h, demostrando así el potencial de las lipasas en este campo (Dharmsthiti & Kuhasuntisuk, 1998).

Debido a las diversas aplicaciones de las lipasas, existe un interés tanto académico como industrial en la caracterización de estos biocatalizadores. A pesar de los esfuerzos que se han realizado para el estudio molecular y la aplicación industrial de las lipasas y otras enzimas, su uso en los procesos industriales sigue estando limitado por sus características intrínsecas (Lotti & Alberghina, 2007).

El grado de actividad catalítica depende de la integridad de la enzima como proteína (Bhatia, 2018). Al ser las enzimas de naturaleza proteica, someterlas a temperaturas extremas, pH extremo, o en contacto con otros agentes desnaturizantes, resulta en la pérdida de su actividad que en muchas ocasiones puede ser total e irreversible. Dadas las condiciones operacionales de algunos procesos industriales, la catálisis enzimática está limitada por la baja estabilidad y actividad de las enzimas a altas temperaturas, pH en extremo ácido o alcalino y la presencia de disolventes orgánicos (Chapman *et al.*, 2018).

En el intento por ampliar el poder catalítico de las lipasas y otros biocatalizadores, se han establecido enfoques de investigación como la búsqueda de enzimas con actividades catalíticas novedosas a partir de organismos adaptados a condiciones ambientales extremas en temperatura, pH o concentración de sal, con la capacidad de producir proteínas con propiedades interesantes. También se han establecido técnicas de ingeniería de proteínas para el mejoramiento de las enzimas que ya se conocen (Madhavan *et al.*, 2017; Lotti & Alberghina, 2007).

En lo que respecta a la búsqueda de enzimas con características prometedoras para su uso industrial, alrededor del mundo se realiza una intensa investigación sobre los organismos y microorganismos de hábitats con condiciones ambientales extremas, desde selvas y bosques tropicales hasta regiones áridas y el fondo del mar (Patel *et al.*, 2017).

#### 1.4 Bioprospección del ambiente marino

La bioprospección es la búsqueda sistemática en hábitats naturales de productos y actividades biológicas novedosas con aplicaciones biotecnológicas (Lozada & Dionisi, 2015).

El ambiente marino cubre más del 70% de la superficie del planeta y es el ecosistema más diversificado albergando organismos, como plantas y animales, y microorganismos, como bacterias, hongos filamentosos, levaduras, arqueas y microalgas. Los microorganismos son los más abundantes y pueden estar presentes en columna de agua, sedimentos o en asociación con otros organismos (Rao *et al.*, 2017; Hosseini *et al.*, 2022).

Por su excepcional diversidad microbiana, la bioprospección del ambiente marino es un campo de investigación con un gran potencial para explorar las enzimas que éstos producen, ya que pueden presentar actividades catalíticas únicas para su aplicación en

diversos campos biotecnológicos (Dalmaso *et al.*, 2015). Entre las condiciones extremas del ambiente marino destacan una alta presión, alta salinidad, altas y bajas temperaturas, condiciones especiales de iluminación, pH, radiación y la presencia de metales (Dalmaso *et al.*, 2015; Kennedy *et al.*, 2008).

Las enzimas marinas poseen propiedades notables como termoestabilidad (estabilidad a altas temperaturas), hipertermoestabilidad (estabilidad a muy altas temperaturas), halotolerancia (tolerancia a la sal), barofilia (estabilidad a altas presiones por encima de 1 atm), adaptabilidad a bajas temperaturas, quimio-selectividad, regio-selectividad y estereo-selectividad (Zhang *et al.*, 2021).

Entre las estrategias de bioprospección microbiana las metodologías basadas en el cultivo mediante técnicas microbiológicas convencionales siguen siendo válidas a pesar del gran desarrollo que han tenido las ciencias ómicas. En general, la bioprospección comienza con la recolección de la muestra ambiental, después la muestra se enriquece con nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos y, finalmente, se lleva a cabo el aislamiento de los microorganismos cultivados, sobre los que se pueden emplear otras estrategias para explorar su potencial bioquímico (Hosseini *et al.*, 2022).

A partir de microorganismos marinos se han aislado y caracterizado diferentes enzimas, entre las que se encuentran las lipasas, tanto de bacterias como de hongos filamentosos y levaduras. En la Tabla 4 se enlistan algunos microorganismos marinos productores de lipasas y las características de estas enzimas.

Tabla 4. Microorganismos marinos productores de lipasas y sus características.

| Microorganismo                               | Características  |
|--|--|
| <i>Halobacillus trueperi</i><br>RSK CAS 9    | Bacteria productora de una lipasa de 44 kDa con actividad óptima a pH 9.0 y 45 °C.   |
| <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125 | Bacteria aislada de agua del océano antártico.<br>Se identificó la producción de una lipasa con actividad a pH 8.5-9.5 y temperatura óptima a 40 °C. |
| <i>Pseudoalteromonas</i><br><i>sp. wp37</i>  | Bacteria aislada de sedimentos de aguas profundas.<br>Se identificó una lipasa de 85 kDa con actividad a pH 7.0-8.0 y a 20-30 °C.                    |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <i>Pseudomonas otitidis</i>          | Bacteria productora de una lipasa de 39 kDa con estabilidad en un amplio rango de pH (5.0–9.0) y temperatura (30–80 °C).   |
| <i>Salinivibrio sp. SA-2</i>         | Bacteria productora de una lipasa termoestable y halotolerante.  |
| <i>Psychrobacter sp. wp37</i>        | Bacteria aislada de sedimentos de aguas profundas. Se identificó la producción de una lipasa de 85 kDa con actividad a pH 7.0-8.0 y a 20-30 °C.  |
| <i>Bacillus sonorensis</i> 4 R       | Bacteria productora de una lipasa alcalina hipertermoestable de 21.87 kDa con una actividad óptima a pH 9.0 y 80 °C.   |
| <i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H | Bacteria aislada de un hábitat marino frío. Se identificó la producción de una lipasa de 34.5 kDa con actividad óptima a pH 7.0 y 25 °C.   |
| <i>Photobacterium lipolyticum</i>    | Bacteria aislada de una planicie intermareal. Se identificó la producción de una lipasa con actividad entre 5-25 °C.   |
| <i>Streptomyces sp. MAS1</i>         | Bacteria productora de una lipasa termoestable con una actividad óptima a pH 6.0 y 22 °C.  |
| <i>Enterococcus faecium</i> MTCC5695 | Bacteria productora de una lipasa alcalina de 19 kDa con actividad óptima a pH 10.8 y 40 °C.   |
| <i>Cystobasidium oligophagum</i>     | Levadura productora de una lipasa con actividad óptima a pH 6.0 y 28 °C.   |
| <i>Candida antarctica</i>            | Levadura aislada de sedimentos del fondo de un lago antártico hipersalino cubierto por una capa de hielo. Las lipasas que produce esta levadura actualmente son comercializadas y utilizadas principalmente para la producción de fármacos y la síntesis de ésteres. |
| <i>Candida parapsilosis</i>          | Levadura productora de la lipasa con actividad óptima a pH 8.0 y 37 °C.  |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>       | Hongo filamentoso productor de una lipasa con actividad óptima a pH 6.0 y 20 °C.   |
| <i>Aspergillus awamori</i> BTMFW032  | Hongo filamentoso productor de una lipasa de 90 kDa con actividad óptima a pH 7.0 y 40 °C.   |
| <i>Rhizopus homothal</i>             | Hongo filamentoso productor de una lipasa con actividad óptima a pH 7.5 y 40 °C.   |

\*La información para la elaboración de esta tabla fue adaptada de Kennedy, *et al* 2008; Beygmoradia & Homaeib, 2017 y Dalmaso *et al.*, 2015.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Consorcio de Investigación del Golfo de México

El Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM) fue fundado en el año 2015 como un consorcio de investigación científica para el desarrollo de proyectos multidisciplinarios para contender los posibles impactos ambientales de la industria del petróleo en los ecosistemas marinos del Golfo de México, así como para la exploración y el estudio de su diversidad microbiana.

Para el estudio de la diversidad y de las capacidades metabólicas microbianas del Golfo de México, el laboratorio de la Dra. Liliana Pardo López en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt UNAM), ha realizado proyectos entre los que se encuentran la caracterización de aislados y consorcios bacterianos con capacidad de degradar hidrocarburos y la búsqueda y caracterización de enzimas microbianas con potenciales aplicaciones biotecnológicas como las oxigenasas, las enzimas lipolíticas y las enzimas involucradas en la degradación de plásticos.

### 2.2 Lipasas del género *Pseudomonas*

Las lipasas de origen microbiano, principalmente bacterianas y fúngicas, son las más utilizadas en aplicaciones biotecnológicas. Existen una gran cantidad de bacterias productoras de lipasas entre las que destacan bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Gupta et al., 2004).

Las lipasas del género *Pseudomonas* resultan de gran interés debido a las aplicaciones que se les ha dado en las industrias de detergentes, alimentos, textiles y en la producción de biodiesel. La aplicación tan versátil de estas enzimas se debe a que presentan actividad en un amplio rango de condiciones como a temperaturas que oscilan entre 25 y 70 °C, a pH desde 4.0 a 11.0, en presencia de detergentes y estabilidad en disolventes orgánicos (Rios et al., 2018). En la Tabla 5 se presentan las características bioquímicas de lipasas de algunas cepas de *Pseudomonas*.

Tabla 5. Características bioquímicas de lipasas de *Pseudomonas*

| Cepa productora de lipasa                         | Características de la lipasa |           |   |   |
|---|------------------------------|-----------|---|---|
|   | Temperatura óptima (°C)      | pH óptimo | Estabilidad en pH                                     | Termoestabilidad  |
| <i>P. aeruginosa</i>                              | 50                           | 8.8-9.1   | NR  | NR  |
| <i>P. aeruginosa</i> YS7                          | 30                           | 6.5-7.5   | NR  | NR  |
| <i>P. aeruginosa</i> EF2                          | 50                           | 9         | NR  | NR  |
| <i>P. aeruginosa</i> 10145                        | 40                           | 8.8-9.1   | NR  | Mantiene el 50% de actividad después de 50 min a 50°C y después de 3 min a 60°C.                            |
| <i>P. aeruginosa</i> LP 602                       | 55                           | 8         | Mantiene el 90% de actividad después de 5 h a pH 8.0. | Mantiene el 50 % después de 2 h a 55°C.   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ES3                 | 40                           | 9.0-10.0  | NR  | NR  |
| <i>P. fluorescens</i>                             | 55                           | 8         | 7.0-10.0  | NR  |
| <i>P. fluorescens</i> SIK W1                      | NR                           | 4.8       | NR  | NR  |
| <i>P. fluorescens</i> NS2W                        | 55                           | 9         | 3.0-11.0  | Mantiene el 70% de actividad después de 2 h a 60 °C.  |
| <i>P. fluorescens</i> MC50                        | 30-40                        | 8.0-9.9   | 6.0-9.0   | Estable a 40°C.   |
| <i>P. fluorescens</i> AFT29                       | 22                           | 7         | 6.2-7.6   | Estable a 10-30°C.  |
| <i>P. fluorescens</i> AFT36                       | 35                           | 8         | 6.0-9.0   | NR  |
| <i>P. fluorescens</i> AK 102                      | 55                           | 8.0-10.0  | 4.0-10.0  | Estable por debajo de 50°C durante 1 h.   |
| <i>P. fragi</i> 22.39B                            | 65                           | 9         | 4.0-11.0  | Estable hasta 51°C a pH 9.0 durante 24 h. Estable a pH 6.5–10.5 a 30°C durante 24 h.                        |
| <i>P. mephitica</i> var. lipolytica               | 70                           | 7         | 3.4-11.2  | Mantiene 95% de actividad después de 14 h a 52°C, 50% después de 9 h a 70°C y 95% después de 20 min a 70°C. |
| <i>P. nitroreducens</i> var. thermotolerans 26.1B | 75-80                        | 9.5       | 5.0-11.0  | NR  |
| <i>P. mendocina</i> 3121-1                        | 50-65                        | 7.2-9.5   | NR  | NR  |

|                                    |       |          |          |  |
|------------------------------------|-------|----------|----------|--|
| <i>P. pseudo-alcaligenes</i> F-111 | 40    | 6.0-10.0 | 6.0-10.0 | NR   |
| <i>Pseudomonas</i> sp.             | 65    | 9.6      | 5.0-9.0  | NR   |
| <i>P. sp.</i> KWI-56               | 60    | 5.5-7.0  | 4.0-10.0 | Estable a 60 °C a pH 7.0 durante 24 h.               |
| <i>P. sp.</i> (PSL)                | 45-60 | 7.0-9.0  | 6.0-12.0 | Estable a 25-50 °C durante 30 min.                   |
| <i>P. sp.</i> f-B-24               | 60    | 7        | 9.0-10.0 | Mantiene 76% de actividad después de 30 min a 40 °C. |
| <i>P. gessardi</i>                 | NR    | 3.5      | 1.0-5.5  | NR   |
| <i>P. otitidis</i>                 | 30-80 | 5.0-9.0  | NR       | NR   |
| <i>P. sp.</i> VITSDVM1             | 40    | NR       | NR       | NR   |
| <i>P. sp.</i> R0-14                | 60    | 8.5      | NR       | NR   |
| <i>P. sp.</i> KB 700A              | 35    | NR       | 8.0-8.5  | La actividad disminuye 70% después de 5 min a 60 °C. |
| <i>P. moraviensis</i> M9           | 65    | 8.0      | NR       | NR   |
| <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5  | 55    | 9.5      | NR       | NR   |
| <i>P. luteola</i>                  | 55    | NR       | NR       | NR   |

\*La información para la elaboración de esta tabla fue adaptada de Ríos *et al.*, 2018; Beygmoradia & Homaeib, 2017; Yao *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2004; Gilbert, 1993.

NR: no reportado.

Para cubrir la creciente demanda de producción de biocatalizadores con propiedades novedosas es necesario contar con sistemas eficientes para su sobreexpresión y producción. La producción de las lipasas de *Pseudomonas* requiere no solo de la sobreexpresión eficiente de los genes correspondientes, sino también de una comprensión detallada de los mecanismos moleculares involucrados en el plegamiento y, según el caso, secreción, para finalmente obtener una lipasa activa (Rosenau & Jaeger, 2004).

### 2.2.1 Plegamiento y secreción de las lipasas de *Pseudomonas*

Las lipasas de *Pseudomonas* pertenecen mayormente a las subfamilias I.1 y I.2 de la clasificación de enzimas lipolíticas, por lo que, poseen dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro y necesitan una proteína llamada foldasa (Lif) para su correcto plegamiento y posterior secreción (Rios *et al.*, 2018).

El proceso de plegamiento y secreción de las lipasas de *Pseudomonas* se ha estudiado con *P. aeruginosa* como organismo modelo. El proceso de plegamiento involucra a la proteína Lif, a las proteínas disulfuro oxidorreductasas (Dsb) para la formación de enlaces disulfuro y proteasas periplásmicas. La secreción se da a través del sistema de secreción tipo II (Rosenau & Jaeger, 2000).

El mecanismo de secreción se muestra en la Figura 11. Primero la pre-lipasa citoplasmática, que tiene un péptido señal en el extremo N-terminal, es translocada a través de la membrana interna hacia el periplasma por el sistema Sec. En el periplasma, el plegamiento es facilitado por la proteína Lif, la proteína disulfuro oxidorreductasa DsbA y algunas proteasas. Finalmente, la lipasa madura es translocada a través de la membrana externa hacia el medio extracelular por el sistema Xcp (El Khattabi *et al.*, 1999).

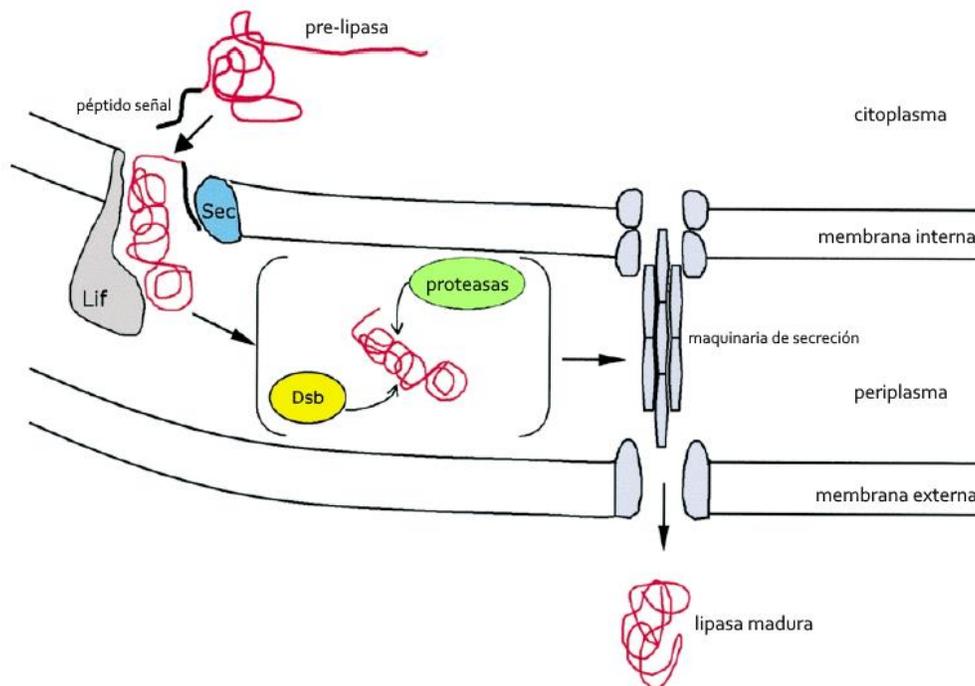


Figura 11. Mecanismo de secreción de las lipasas de *P. aeruginosa*.  
Figura adaptada de Jaeger & Rosenau, 2004.

### 2.2.2 Sobreexpresión de las lipasas de *Pseudomonas*

El primer paso necesario para aislar una enzima y explorar su potencial biotecnológico es la sobreexpresión del gen correspondiente. Cuando una enzima se expresa de forma activa se puede estudiar y caracterizar (Jaeger y Eggert, 2002).

A pesar de que las lipasas de *Pseudomonas* se pueden producir por expresión homóloga, muchas cepas de este género son potenciales patógenos y se requieren normas de seguridad especiales para controlar su cultivo. Por lo anterior, se ha recurrido al uso de sistemas de expresión heteróloga (Rios *et al.*, 2018).

Existe un número considerable de lipasas microbianas que se han clonado y caracterizado bioquímicamente con aplicaciones o potenciales aplicaciones biotecnológicas, sin embargo, en lo que respecta a las lipasas de las subfamilias I.1 y I.2, la necesidad de la foldasa para su correcto plegamiento es un factor limitante para lograr una expresión heteróloga funcional (Rios *et al.*, 2018). Por otro lado, la presencia de secuencias péptido señal puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión, afectando la expresión soluble de la proteína (Singh *et al.*, 2016).

Por lo anterior, son pocos los reportes sobre la expresión y caracterización de lipasas que requieren sus foldasas específicas. Se han desarrollado diversas metodologías para lograr la expresión heteróloga y funcional de las lipasas cuyo plegamiento depende de su foldasa específica, tanto del género *Pseudomonas* como de otros géneros bacterianos, para llevar a cabo su caracterización bioquímica. Estas estrategias se dividen en estrategias de plegamiento *in vitro* y estrategias de plegamiento *in vivo*, denominados así por la manera en la que ocurre el plegamiento de la lipasa (Alnoch *et al.*, 2018).

En el plegamiento *in vitro* la lipasa y su foldasa son clonadas por separado y la expresión ocurre en dos hospederos. La foldasa puede añadirse a un extracto crudo o purificado donde se encuentre la lipasa para crear una mezcla en la que ocurra el plegamiento y finalmente obtener a la lipasa en su conformación activa (Martini *et al.*, 2014).

En el plegamiento *in vivo* la lipasa y su foldasa son co-expresadas en el mismo hospedero, y en él ocurre el plegamiento de la lipasa (Martini *et al.*, 2014). Esta estrategia se puede abordar a través de metodologías variadas de clonación y expresión, pueden emplearse vectores de expresión simple o vectores de expresión dual para la co-expresión de las dos

proteínas en el mismo hospedero (Rios *et al.*, 2018). También se ha optado por remover el péptido señal de la lipasa mediante estrategias de clonación para evitar la formación de cuerpos de inclusión (Rosenau & Jaeger, 2000; Alnoch *et al.*, 2018).

Las dos estrategias de plegamiento mencionadas han permitido la producción soluble y funcional de las lipasas enlistadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Casos de éxito empleando las estrategias de plegamiento *in vitro* e *in vivo* para la expresión y caracterización de lipasas cuyo plegamiento depende de su foldasa específica.

| Estrategia                  | Autores                       | Fuente de la enzima                    | Características del sistema de expresión   |
|-----------------------------|-------------------------------|--|--|
| Plegamiento <i>in vitro</i> | Akbari y colaboradores, 2009  | <i>Pseudomonas spp.</i>                | Clonaron por separado los genes de la lipasa y su foldasa específica en vectores de expresión simple, purificaron las proteínas y se mezclaron. Hospedero: <i>E. coli</i> .  |
| Plegamiento <i>in vivo</i>  | Wu y colaboradores, 2012      | <i>P. aeruginosa</i>                   | Clonaron los genes de la lipasa y su foldasa específica en el mismo vector, creando tres sistemas de expresión: Uno de expresión simple y dos de expresión dual. Hospedero: <i>E. coli</i> .                             |
| Plegamiento <i>in vivo</i>  | Madan y Mishra, 2010          | <i>P. aeruginosa</i>                   | Clonaron por separado los genes de la lipasa y su foldasa específica en vectores de expresión simple y los co-transformaron en el mismo hospedero ( <i>E. coli</i> ).  |
| Plegamiento <i>in vivo</i>  | Martini y colaboradores, 2014 | <i>Aeromonas veronii B565</i>          | Al gen de la lipasa le removieron el péptido señal, y clonaron por separado los genes la lipasa y su foldasa específica en vectores de expresión simple y los co-transformaron en el mismo hospedero ( <i>E. coli</i> ). |
| Plegamiento <i>in vivo</i>  | Alnoch y colaboradores, 2018  | <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB11 | Al gen de la lipasa le removieron el péptido señal, y clonaron por separado los genes la lipasa y su foldasa específica en vectores de expresión simple y los co-transformaron en el mismo hospedero ( <i>E. coli</i> ). |
| Plegamiento <i>in vivo</i>  | Quyen y colaboradores, 2012   | <i>Ralstonia sp. M1</i>                | Clonaron los genes de la lipasa y su foldasa específica en vectores de expresión simple y de expresión dual, creando en total ocho sistemas de expresión. Hospedero: <i>E. coli</i> .                                    |

### 2.3 Sobreexpresión y purificación de la lipasa LipGoM

Para explorar el potencial biotecnológico de la lipasa LipGoM de *P. alcaligenes*, se llevó a la clonación y sobreexpresión de los genes *lipgom* y *foldasa* que codifican para la lipasa LipGoM y su foldasa específica, respectivamente, en el plásmido pET28a(+) en células de *E.coli* BL21 (DE3).

Así mismo, se realizaron pruebas de solubilización y purificación, sin embargo, la forma pura que se obtuvo de la enzima era inactiva. Esta forma pura de la lipasa había sido separada de su foldasa y dado que la pérdida de la actividad de una enzima está relacionada con la pérdida de su estructura, se relacionó la pérdida de la conformación activa con la separación de su foldasa específica durante la purificación.

Por lo anterior, para el desarrollo de este trabajo se propuso cambiar las condiciones de clonación y expresión de la lipasa LipGoM y su foldasa específica siguiendo las estrategias metodológicas reportadas para el plegamiento *in vivo* esperando lograr la expresión heteróloga soluble y funcional de la lipasa para caracterizarla bioquímicamente.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios sobre la expresión y caracterización bioquímica de lipasas cuyo plegamiento depende de una foldasa específica son limitados, por lo que incursionar en este campo de investigación es relevante por el alto potencial que tienen las lipasas, especialmente las del género *Pseudomonas*, para ser utilizadas en diversas aplicaciones biotecnológicas. En este estudio se trabajó con una lipasa aislada de *P. alcaligenes* (LipGoM) proveniente de un ambiente marino, ya que se consideró buena candidata para presentar características catalíticas novedosas.

#### 4. HIPÓTESIS

Utilizando las técnicas moleculares de la estrategia de plegamiento in vivo se logrará la expresión heteróloga soluble y funcional de la lipasa LipGoM de *P. alcaligenes* permitiendo así realizar su caracterización bioquímica.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Expresar heterológamente el gen codificante de la lipasa LipGoM y el de su foldasa específica para llevar a cabo la caracterización bioquímica de la lipasa.

### Objetivos particulares

- 1.- Clonar y expresar el gen *lipgom* con péptido señal, sin péptido señal y el gen silvestre *foldasa*.
- 2.- Caracterizar bioquímicamente la actividad enzimática de LipGoM sobre distintos sustratos, y a diferentes temperaturas y valores de pH.
- 3.- Comparar la actividad enzimática con una versión de la enzima replegada con agentes químicos.

## 6. MATERIALES

### 6.1 Cepas y plásmidos

Se utilizó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  para transformar los plásmidos recombinantes y las cepas *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* SHuffle® T7 como hospederos para la expresión génica.

A continuación, se presentan las características de las cepas y los plásmidos utilizados.

Tabla 7. Características de las cepas utilizadas en este trabajo.

| Cepa         | Genotipo  | Características relevantes  |
|--------------|---|---|
| DH5 $\alpha$ | F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 <math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(<i>rK-mK+</i>), <math>\lambda</math>-</i>   | Permite la propagación de plásmidos.<br>Alta estabilidad del inserto debido a la mutación <i>recA1</i> .<br>Alto rendimiento y calidad del ADN debido a la mutación <i>endA</i> .   |
| BL21 DE3     | F- <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(<i>r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub></i><sup>-</sup>) <math>\lambda</math>(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i><sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(<math>\lambda</math><sup>S</sup>) pLysS[<i>T7p20 ori<sub>p15A</sub></i>](Cm<sup>R</sup>)</i>                             | Permite la expresión de alto nivel de proteínas recombinantes.<br>Contiene el profago $\lambda$ DE3 que porta el gen de la ARN polimerasa T7 y <i>lacI<sup>q</sup></i> bajo control de un promotor de <i>lacUV5</i> , que permite que la expresión de la ARN polimerasa T7 sea inducida con IPTG.<br>No contiene la proteasa Lon y es deficiente en la proteasa de la membrana externa OmpT, reduciendo así la degradación de las proteínas heterólogas expresadas. |
| SHuffle® T7  | <i>fhuA2 [lon] ompT ahpC gal <math>\lambda</math>att::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, <i>lacI<sup>q</sup></i>) <math>\Delta</math>trxB sulA11 R(<i>mcr-73::miniTn10-Tet<sup>S</sup></i>)2 [<i>dcm</i>] R(<i>zgb-210::Tn10 - Tet<sup>S</sup></i>) <i>endA1 <math>\Delta</math>gor <math>\Delta</math>(<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10</i></i> | Promueve la formación de puentes disulfuro en el citoplasma.<br>Expresa constitutivamente una copia cromosómica de la isomerasa de enlace disulfuro DsbC. La DsbC citoplasmática también puede ayudar en el plegamiento de proteínas que no requieren enlaces disulfuro.<br>Deficiente en proteasas Lon y OmpT.   |

Tabla 8. Características de los plásmidos utilizados en este trabajo.

| Plásmido    | Características  |
|-------------|--|
| pET28a(+)   | Vector de expresión de <i>E. coli</i> , promotor T7.<br>Contiene el gen <i>lacI</i> y el gen de resistencia a kanamicina (K <sup>r</sup> ).<br>Contiene una etiqueta de seis histidinas en la región N-terminal.<br>Novagen.   |
| pRSFDuet™-1 | Vector de expresión de <i>E. coli</i> , diseñado para la co-expresión de dos proteínas por lo que contiene dos sitios de clonación múltiple (MCS), cada uno precedido por un promotor T7.<br>Contiene el gen <i>lacI</i> y el gen de resistencia a kanamicina (K <sup>r</sup> ).<br>Contiene una etiqueta de seis histidinas en la región N-terminal del MCS-1 y una etiqueta GST (glutathione S-transferase, por sus siglas en inglés) en la región C-terminal del MCS-2.<br>Novagen. |

## 6.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo en el que se cultivaron las clonas para la extracción de los plásmidos y para la inducción de la expresión de las proteínas fue el Luria Bertani (LB) líquido.

Tabla 9. Composición del medio de cultivo LB líquido.

| Componentes          | Especificaciones  | Cantidad g/L |
|----------------------|---|--------------|
| Triptona             | Triptona Bacto digerido pancreático de caseína. BD Becton, Dickinson and Company.                   | 10           |
| Extracto de levadura | Extracto de levadura extracto autolisado de células de levaduras. BD Becton, Dickinson and Company. | 5            |
| NaCl                 | Cloruro de sodio cristal. J.T. Baker  | 10           |

Se utilizó el medio LB sólido adicionado con kanamicina (30 µg/mL) para el crecimiento de las clonas tras las transformaciones realizadas.

Tabla 10. Composición del medio de cultivo LB sólido.

| Componentes          | Especificaciones  | Cantidad g/L |
|----------------------|---|--------------|
| Triptona             | Triptona Bacto digerido pancreático de caseína. BD Becton, Dickinson and Company.                   | 10           |
| Extracto de levadura | Extracto de levadura extracto autolisado de células de levaduras. BD Becton, Dickinson and Company. | 5            |
| NaCl                 | Cloruro de sodio cristal. J.T. Baker  | 10           |
| Agar bacteriológico  | Agar Bacto. BD Becton, Dickinson and Company.   | 13           |

Para determinar la actividad lipasa de las clonas obtenidas se utilizó medio sólido LB-modificado, adicionado con tricaprilina (Sigma-Aldrich) al 1%.

Tabla 11. Composición del medio de cultivo LB-modificado (Glogauer et al., 2011).

| Componentes          | Especificaciones  | Cantidad g/L |
|----------------------|---|--------------|
| Triptona             | Triptona Bacto digerido pancreático de caseína. BD Becton, Dickinson and Company.                   | 5            |
| Extracto de levadura | Extracto de levadura extracto autolisado de células de levaduras. BD Becton, Dickinson and Company. | 3            |
| NaCl (1.5%)          | Cloruro de sodio cristal. J.T. Baker  | 15           |
| Agar bacteriológico  | Agar Bacto. BD Becton, Dickinson and Company.   | 13           |
| Goma arábica         | Goma arábica, Sigma-Aldrich   | 10           |

Todos los medios de cultivo y el material utilizados fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### 6.3 Reactivos

A continuación, se enlistan los reactivos utilizados. Cuando fue necesario, los reactivos se esterilizaron por filtración con microfiltros de membrana de 0.22 µm Millex.

Tabla 12. Reactivos para medios de cultivo utilizados en este trabajo.

| Reactivo   | Especificaciones  |
|------------|---|
| IPTG       | Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido, Thermo Scientific |
| Kanamicina | Kanamicina, Sigma-Aldrich                                       |

#### 6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la ADN polimerasa NZYtaq II DNA polymerase y la Supreme NZYProof DNA polymerase, ambas de NZYTech.

#### 6.5 Enzimas

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 13.

Tabla 13. Enzimas de restricción utilizadas.

| Enzima | Especificaciones   |
|--------|--|
| EcoRI  | Enzima de <i>E. coli</i> , Thermo Scientific                 |
| NdeI   | Enzima de <i>Neisseria denitrificans</i> , Thermo Scientific |
| BamHI  | Enzima de <i>B. amyloliquefaciens</i> , Thermo Scientific    |
| Sall   | Enzima <i>Streptomyces albus</i> , Thermo Scientific         |
| XhoI   | Enzima de <i>Xanthomonas vasicola</i> , Thermo Scientific    |

Para llevar a cabo reacciones de ligación se utilizó la enzima T4 ADN ligasa de Thermo Scientific.

#### 6.6 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para visualizar los productos de PCR y los plásmidos se empleó electroforesis en geles de agarosa. A continuación, se presenta la composición del buffer TAE utilizado para la preparación de los geles y para la electroforesis. El buffer 50x se diluyó a 1x para su uso.

Tabla 14. Buffer TAE 50x para electroforesis de ADN.

| Reactivo      | 50x (500 mL) |
|---------------|--------------|
| Tris-Base     | 121 g        |
| Ácido acético | 28.55 mL     |
| EDTA          | 9.31 g       |

## 6.7 Electroforesis de proteínas y Western Blot

A continuación, se enlistan los buffers utilizados para realizar electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y para los ensayos de Western Blot.

Tabla 15. Buffer de corrida para SDS-PAGE.

| Reactivo                      | g/L  | Especificaciones                |
|-------------------------------|------|---------------------------------|
| Tris-Base                     | 3    | Merck                           |
| Glicina                       | 14.4 | Grado biología molecular, Merck |
| SDS (Dodecilsulfato de sodio) | 1    | J.T Baker                       |

Tabla 16. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida.

| Reactivo               | Especificaciones                                    |
|------------------------|---|
| Acrilamida             | Biorad  |
| Buffer Tris-HCl pH 6.5 | Biorad  |
| Buffer Tris-HCl pH 8.8 | Biorad  |
| SDS                    | Dodecilsulfato de sodio, J.T Baker                  |
| Persulfato de amonio   | Sigma-Aldrich                                       |
| TEMED                  | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma-Aldrich |

Tabla 17. Buffer de carga para proteínas.

| Reactivo                | Cantidad |
|-------------------------|----------|
| Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8  | 2.5 mL   |
| SDS                     | 0.4 g    |
| Glicerol                | 2 mL     |
| $\beta$ -mercaptoetanol | 0.4 mL   |
| Azul de bromofenol 0.1% | 0.1 mL   |

Tabla 18. Buffer de transferencia para Western Blot.

| Reactivo  | g/L  |
|-----------|------|
| Tris-Base | 5.8  |
| Glicina   | 2.9  |
| SDS       | 0.37 |
| Metanol   | 20%  |

Tabla 19. Buffer TBS-T para Western Blot.

| Reactivo  | g/L  |
|-----------|------|
| Tris-Base | 6.05 |
| NaCl      | 8.76 |
| Tween 20  | 0.1% |

El pH se ajustó a 7.5

Para el bloqueo se utilizó leche Svelty® descremada de Nestlé.

### 6.8 Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteína se siguió el método de Lowry. Se utilizó Albúmina de Suero Bovino (BSA) de Sigma-Aldrich para la curva patrón. En la Tabla 20 se enlistan las soluciones utilizadas.

Tabla 20. Soluciones para la cuantificación de proteína por el método de Lowry.

| Solución | Especificaciones                                       |
|----------|--|
| A        | 2% de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en 0.1 N de NaOH |
| B        | 2% de Tartrato de Sodio y Potasio                      |
| C        | 1% de CuSO <sub>4</sub>                                |

### 6.9 Caracterización bioquímica

La composición del buffer de lisis fue la siguiente:

Tabla 21. Buffer de lisis (pH 8.0).

| Reactivo | Concentración (mM) |
|----------|--------------------|
| Tris-HCl | 50                 |
| NaCl     | 300                |

Para realizar la lisis celular se añadió al buffer de lisis inhibidor de proteasas y lisozima.

Tabla 22. Reactivos para lisis.

| Reactivo               | Especificaciones                                     |
|------------------------|--|
| Inhibidor de proteasas | cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche         |
| Lisozima               | Lisozima de clara de huevo de gallina, Sigma-Aldrich |

Los sustratos utilizados para los ensayos de caracterización de enlistan en la tabla 23.

Tabla 23. p-Nitrofenil ésteres utilizados como sustratos para la caracterización bioquímica.

| p-Nitrofenil éster             | Especificaciones                                   |
|--------------------------------|--|
| p-Nitrofenil Butirato (C4)     | 4-Nitrophenyl butyrate, Sigma-Aldrich              |
| p-Nitrofenil Valerato (C5)     | 4-Nitrophenyl valerate, Sigma-Aldrich              |
| p-Nitrofenil Octanoato (C8)    | 4-Nitrophenyl octanoate (caprilato), Sigma-Aldrich |
| p-Nitrofenil Decanoato (C10)   | 4-Nitrophenyl decanoate (caprate), Sigma-Aldrich   |
| p-Nitrofenil Dodecanoato (C12) | 4-Nitrophenyl dodecanoate (laurate), Sigma-Aldrich |
| p-Nitrofenil Miristato (C14)   | 4-Nitrophenyl myristate, Sigma-Aldrich             |
| p-Nitrofenil Palmitato (C16)   | 4-Nitrophenyl palmitate, Sigma-Aldrich             |
| p-Nitrofenil Esterato (C18)    | 4-Nitrophenyl esterate, Sigma-Aldrich              |

Se utilizó el p-Nitrofenol de Sigma-Aldrich para las curvas de calibración.

Para la determinación del pH óptimo de la enzima se utilizaron distintos buffers dependiendo del pH deseado. A continuación, se enlistan los buffers utilizados, su pH y composición.

Tabla 24. Buffers utilizados para la caracterización bioquímica.

| Buffer          | pH                       | Composición  |
|-----------------|--------------------------|--|
| Citrato-Fosfato | 3.0, 4.0, 5.0, 6.0       | Fosfato de sodio dibásico 0.2 M<br>Ácido cítrico 0.1 M |
| Tris-HCl        | 7.0, 8.0                 | Tris-HCl 50 mM   |
| Glicina-NaOH    | 9.0, 10.0, 11.0,<br>12.0 | Glicina 0.2 M<br>NaOH 0.2 M                            |

## 7. MÉTODOS

### 7.1 Diseño de oligonucleótidos

Para la amplificación del gen *lipgom* sin péptido señal, se realizó una predicción de la secuencia de aminoácidos correspondiente con el servidor SignalP 5.0 que predice la presencia de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas de Archaea, bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y Eukarya (Almagro-Armenteros *et al.*, 2019).

Se utilizó el software SnapGene para el diseño de todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Para la clonación de los productos de PCR se añadió a cada oligonucleótido la secuencia de reconocimiento y corte de una enzima de restricción determinada.

A continuación, se enlistan los oligonucleótidos utilizados y sus características.

Tabla 25. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Nombre del oligonucleótido        | Secuencia 5'→3'                               | Características  |
|-----------------------------------|---|--|
| FWLip2deISP<br>(oligo 4103)       | ATAAT <u>CATATG</u> TTCATCCCAGG<br>CTGGC      | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>lipgom</i> sin péptido señal.<br><u>CATATG</u> : sitio de reconocimiento y corte de la enzima NdeI<br>26 amero<br>Tm: 59 °C<br>Contenido GC: 46%  |
| RVLip2EcoRI<br>(oligo 4155)       | TATAAT <u>GAATTC</u> AGAGTTTCG<br>GCATCCAGTGC | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>lipgom</i> sin péptido señal.<br><u>GAATTC</u> : sitio de reconocimiento y corte de la enzima EcoRI<br>31 amero<br>Tm: 61 °C<br>Contenido GC: 42% |
| FW2lip2BamHI<br>(oligo 2021-1751) | ATCAAG <u>GGATCC</u> AAAAAAGCT<br>GCTGACTCCG  | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>lipgom</i> con péptido señal.<br><u>GGATCC</u> : sitio de reconocimiento y corte de la enzima BamHI<br>30 amero Tm: 70 °C Contenido GC: 47%       |

|  |                                      |  |
|--|--------------------------------------|--|
| RVlip2Sall<br>(oligo 2021-1752)                | ATATAGTCGACTTACAGGCC<br>GAGGTTTTTCAG | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>lipgom</i> con péptido señal.<br><u>GTCGAC</u> : sitio de reconocimiento y corte de la enzima Sall<br>32 amero<br>Tm: 70 °C Contenido GC: 44% |
| FWfoldNdel<br>(oligo 2021-1753)                | ACTGATACTCATATGTCCAAG<br>CGAATCATC   | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>foldasa</i> .<br><u>CATATG</u> : sitio de reconocimiento y corte de la enzima Ndel<br>30 amero<br>Tm: 67 °C Contenido GC: 40%                 |
| RVfoldXhoI<br>(oligo 2021-1754)                | TATAATCTCGAGTCAGAGTT<br>CGGCATC      | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>foldasa</i> .<br><u>CTCGAG</u> : sitio de reconocimiento y corte de la enzima XhoI<br>27 amero<br>Tm: 67 °C<br>Contenido GC: 44%              |
| OLip1319FW<br>(oligo 8410)<br>(Sahonero, 2016) | ACTGCAATGGATGAAAAAGC<br>TGCTGACTCCG  | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>lipgom</i> .<br>31 mero<br>Tm: 71 °C<br>Contenido GC: 48%   |
| OLip1319RV<br>(oligo 8411)<br>(Sahonero, 2016) | ACTGGGATCCTTACAGGCCG<br>AGGTTTTTCAG  | Oligonucleótido para la amplificación del gen <i>lipgom</i> .<br>31 mero<br>Tm: 72 °C<br>Contenido GC: 52%   |

## 7.2 Extracción de plásmidos y PCR

Todas las extracciones de plásmido para este trabajo se realizaron con el kit ZR Plasmid Miniprep-Classic de ZYMO RESEARCH.

Para la clonación de los genes de interés se realizó la amplificación por PCR con la enzima Supreme NZYProof DNA polymerase (NZYTech). Se utilizó como templado la construcción pET28a::LipGoM-Foldasa que contiene los genes codificantes para la lipasa y su foldasa específica. Se utilizó el termociclador Thermal Cycler C1000 Touch (Bio-rad).

A continuación, se describen las condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación de los genes de interés para este trabajo.

Tabla 26. Condiciones de reacción para la amplificación del gen lipgom sin péptido señal con la enzima Supreme NZYProof DNA polymerase.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 96 °C       | 4 min  | 1           |
| Desnaturalización         | 96 °C       | 30 s   | 30          |
| Alineamiento              | 60 °C       | 30 s   |             |
| Extensión                 | 72 °C       | 1 min  |             |
| Extensión final           | 72 °C       | 5 min  | 1           |

Tabla 27. Condiciones de reacción para la amplificación del gen lipgom con péptido señal con la enzima Supreme NZYProof DNA polymerase.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 96 °C       | 4 min  | 1           |
| Desnaturalización         | 96 °C       | 30 s   | 30          |
| Alineamiento              | 70 °C       | 30 s   |             |
| Extensión                 | 72 °C       | 45 s   |             |
| Extensión final           | 72 °C       | 5 min  | 1           |

Tabla 28. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR del gen foldasa con la enzima Supreme NZYProof DNA polymerase.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 96 °C       | 4 min  | 1           |
| Desnaturalización         | 96 °C       | 30 s   | 30          |
| Alineamiento              | 67 °C       | 30 s   |             |
| Extensión                 | 72 °C       | 45 s   |             |
| Extensión final           | 72 °C       | 5 min  | 1           |

Para verificar la clonación de los genes de interés se realizó la amplificación por PCR con la enzima NZYtaq II DNA polymerase (NZYTech). A continuación, se describen las condiciones en las que se llevó a cabo la amplificación de los genes con este enzima.

Tabla 29. Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lipgom* sin péptido señal con la enzima NZYTaQ II DNA polymerase.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C       | 3 min  | 1           |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 30 s   | 30          |
| Alineamiento              | 60 °C       | 30 s   |             |
| Extensión                 | 72 °C       | 1 min  |             |
| Extensión final           | 72 °C       | 5 min  | 1           |

Tabla 30. Condiciones de reacción para la amplificación del gen *lipgom* con péptido señal con la enzima NZYTaQ II DNA polymerase.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C       | 3 min  | 1           |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 30 s   | 30          |
| Alineamiento              | 70 °C       | 30 s   |             |
| Extensión                 | 72 °C       | 1 min  |             |
| Extensión final           | 72 °C       | 10 min | 1           |

Tabla 31. Condiciones de reacción para la amplificación del gen *foldasa* con la enzima NZYTaQ II DNA polymerase.

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | # de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|-------------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C       | 3 min  | 1           |
| Desnaturalización         | 94 °C       | 30 s   | 30          |
| Alineamiento              | 67 °C       | 30 s   |             |
| Extensión                 | 72 °C       | 1 min  |             |
| Extensión final           | 72 °C       | 10 min | 1           |

#### 7.4 Construcciones moleculares

El producto de PCR obtenido del gen *lipgom* sin péptido señal se ligó al vector de expresión simple pET28a(+).

Tanto el producto de PCR del gen *lipgom* con péptido señal como el producto de PCR obtenido del gen *foldasa* se ligaron al vector de expresión dual pRSFDuet-1.

Para clonar los genes de interés al vector correspondiente se realizaron digestiones enzimáticas tanto de los productos de PCR como de los plásmidos siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Previo a la digestión, los productos de PCR se purificaron con el kit DNA Clean & Concentrator de ZYMO RESEARCH para eliminar los reactivos de las reacciones de PCR.

Las digestiones de los productos de PCR y de los plásmidos se visualizaron y se purificaron de geles de agarosa (purificación de banda) con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de ZYMO RESEARCH.

#### 7.4.1 Construcción pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa

El producto de PCR del gen *lipgom* sin péptido señal y el plásmido pET28a se digirieron con las enzimas NdeI y EcoRI.

Posteriormente se ligó el producto de PCR digerido con el plásmido lineal considerando una relación 1:3 (vector:inserto). Con la construcción obtenida, nombrada pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

La verificación de la clonación del inserto de interés se seleccionó al alzar varias clonas a las que se les extrajo plásmido que sirvió como templado para realizar unas pruebas de PCR utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos:

- OLip1319FW y RVLip2EcoRI
- FWLip2deISP y RVLip2EcoRI

Cuando se verificó la clonación del inserto correcto, con la construcción obtenida se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21.

#### 7.4.2 Construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa

Para la construcción en el vector pRSFDuet-1 primeramente se digirió tanto el plásmido como el producto de PCR del gen *lipgom* (con péptido señal) con las enzimas BamHI y Sall.

Posteriormente se ligó el producto de PCR digerido con el plásmido lineal considerando una relación 1:3 (vector:inserto). Con la construcción obtenida (pRSFDuet::LipGoM), se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se verificó la clonación del gen *lipgom* seleccionando al azar clonas a las que se les extrajo plásmido que sirvió como templado para realizar pruebas de PCR utilizando el par de oligonucleótidos FW2lip2BamHI y RVlip2Sall.

Posteriormente el producto de PCR del gen *foldasa* y el plásmido pRSFDuet::LipGoM se digirieron con las enzimas NdeI y XhoI.

Se ligó el producto de PCR digerido con el plásmido lineal considerando una relación 1:3 (vector:inserto). Con la construcción obtenida, pRSFDuet::LipGoM::Foldasa, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se verificó la clonación del gen *foldasa* seleccionando al azar clonas a las que se les extrajo plásmido que sirvió como templado para realizar pruebas de PCR utilizando el par de oligonucleótidos FWfoldNdeI y RVfoldXhoI.

Cuando se verificó la clonación tanto de la lipasa como de la foldasa, con la construcción obtenida se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21.

#### 7.4.3 Construcción pET28a::Foldasa

A partir de la amplificación por PCR del gen *foldasa*, se llevó a cabo la clonación de éste en el plásmido pET28a. Tanto el producto de PCR foldasa como el plásmido pET28a se digirieron con las enzimas NdeI y XhoI.

El producto de PCR digerido se ligó al plásmido lineal considerando una relación 1:3 (vector:inserto). Con la construcción obtenida, pET28a::Foldasa, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Se verificó la clonación del inserto de interés a partir de la selección al azar de clonas a las que se les extrajo plásmido que sirvió como templado para realizar pruebas de PCR. Se utilizó el par de oligonucleótidos FWfoldNdeI y RVfoldXhoI.

Una vez verificada la clonación de la foldasa, con la construcción obtenida se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21.

#### 7.5 Sobreexpresión

Las clonas se cultivaron en medio LB líquido a 37 °C y 200 rpm durante toda noche para utilizarse como pre-inóculo para inducir la sobreexpresión de las proteínas de interés.

En la Tabla 32 se resumen las condiciones de inducción establecidas para la expresión de la lipasa y la foldasa a partir de las construcciones realizadas.

Tabla 32. Condiciones de inducción.

| Construcción              | Crecimiento                                   | Inducción                     |
|---------------------------|---|-------------------------------|
| pET28a::LipGoM-Foldasa    | A 30 °C hasta una D.O <sub>600nm</sub> de 1.5 | A 18 °C, 0.1 mM de IPTG, 20 h |
| pET28a::LipGoMΔSP-Foldasa | A 30 °C hasta una D.O <sub>600nm</sub> de 1.5 | A 18 °C, 0.1 mM de IPTG, 20 h |
| pET28a::Foldasa           | A 37 °C hasta una D.O <sub>600nm</sub> de 0.6 | A 30 °C, 0.5 mM de IPTG, 3 h  |
| pRSFDuet::LipGoM::Foldasa | A 30 °C hasta una D.O <sub>600nm</sub> de 1.5 | A 30 °C, 0.5 mM de IPTG, 3 h  |

## 7.6 SDS-PAGE y Western Blot

Para verificar la expresión de las proteínas de interés se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Sambrook y Russell (Sambrook & Russell, 2001).

Se cuantificó la cantidad de proteína de cada muestra a analizar, se tomó el volumen necesario y se mezcló con 5 µL de buffer de carga. Posteriormente las muestras se hirvieron durante 10 min a 95 °C.

Al finalizar la electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul de coomassie para visualizar las proteínas.

Para analizar la expresión de la lipasa se realizaron ensayos de Western Blot. Primeramente, se realizó un SDS-PAGE tal y como se describió previamente. Posteriormente se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia sumergida, en presencia de Buffer de transferencia para Western Blot, durante 1 h y 30 min a 200 mA y 120 V.

Una vez completada la transferencia se prosiguió a bloquear la membrana con una solución recién preparada de leche descremada Svelty® al 1% en buffer TBS-T. La membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras pasar el tiempo de incubación se retiró la solución de leche descremada y se realizaron tres lavados de la membrana con buffer TBS-T incubando durante 10 min a temperatura ambiente por cada lavado.

Después de los lavados se retiró el buffer y se añadió a la membrana el anticuerpo comercial Anticuerpo anti 6x-His Tag conjugado a la Peroxidasa de Rábano HRP por sus siglas en inglés (Horse Radish Peroxidase), previamente diluido (1:10,000) en buffer TBS-T. La membrana se incubó en presencia del anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente.

Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo, se retiró la solución y se hicieron tres lavados más con buffer TBS-T incubando durante 10 min a temperatura ambiente por cada lavado.

Al finalizar los lavados se retiró el buffer TBS-T y se incubó la membrana con la solución del sustrato quimioluminiscente Thermo Scientific SuperSignal West Pico PLUS, sustrato de la enzima HRP, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la incubación con el sustrato se retiró la solución.

Finalmente, se analizaron las membranas con el software Image Studio de LI-COR.

## 7.7 Ensayos de solubilización en presencia de la foldasa

Para estas pruebas se utilizaron las clonas con las construcciones pET28a::LipGoM-Foldasa, pET28a::Foldasa y el plásmido pET28a vacío.

### 7.7.1 Pruebas de solubilización a distintas temperaturas de inducción

La primera prueba de solubilización consistió en cultivar cada clona en 25 mL de medio LB a 37 °C hasta una D.O<sub>600nm</sub> de 0.6 para posteriormente realizar la inducción a 30 °C con 0.5 mM de IPTG durante 3 h.

La segunda prueba consistió en cultivar cada clona en 25 mL de medio LB a 30 °C hasta una D.O<sub>600nm</sub> de 1.5 y para posteriormente realizar la inducción se realizó a 18 °C durante toda la noche con 0.1 mM de IPTG.

Pasado el tiempo de inducción las células se recuperaron por centrifugación. Cada pastilla celular proveniente de 25 mL de cultivo se resuspendió en 3 mL de buffer de lisis adicionado con lisozima e inhibidor de proteasas. Un mililitro de la clona pET28a::LipGoM-

Foldasa se mezcló con un mililitro de la clona pET28a::Foldasa, tanto de la inducción realizada a 30 °C como de la realizada a 18 °C. La lisis celular se llevó a cabo por sonicación y las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 4 °C. Los dos mililitros restantes de cada clona se utilizaron para SDS-PAGE.

Una tercer prueba de solubilización consistió en cultivar juntas las clonas pET28a::LipGoM-Foldasa y pET28a::Foldasa en 25 mL de medio LB a 30 °C hasta una D.O<sub>600nm</sub> de 1.5 para posteriormente realizar la inducción a 18 °C durante toda la noche con 0.1 mM de IPTG.

La pastilla celular proveniente de 25 mL de cultivo se resuspendió en 3 mL de buffer de lisis adicionado con lisozima e inhibidor de proteasas, la lisis celular se llevó a cabo por sonicación y las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 4 °C. Los dos mililitros restantes se utilizaron para SDS-PAGE.

## 7.8 Caracterización bioquímica

Los ensayos de caracterización bioquímica de la lipasa LipGoM se llevaron a cabo con extracto de proteína recién obtenido. La condición estándar utilizada fue a una concentración de 0.5 mM de sustrato, 30 °C a pH 8.0.

Se utilizaron microplacas de poliestireno transparente de 96 pozos. La actividad enzimática se determinó a partir de la liberación de p-nitrofenol monitoreada a 400 nm utilizando p-Nitrofenil ésteres como sustrato y posteriormente se calculó la actividad relativa de la enzima (Jaeger & Kovacic, 2014).

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un lector de placas Synergy™ H1 de BioTek equipado con el software Gene5.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se consideró la autohidrólisis del sustrato durante el seguimiento de la reacción. En cada ensayo se realizó una curva de calibración del p-nitrofenol para calcular la actividad enzimática volumétrica (U/mL).

Una unidad de actividad lipasa (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol en 1 min en las condiciones de ensayo (Jaeger & Kovacic, 2014).

### 7.8.1 Obtención del extracto de proteína

Para la obtención del extracto de proteína se utilizó la construcción pET28a::LipGoM-Foldasa.

Se realizó la inducción de 100 mL de cultivo en las condiciones establecidas en el apartado 7.5 Sobreexpresión. Pasado el tiempo de inducción, se separaron las células del medio de cultivo por centrifugación durante 15 min a 5,000 rpm en una centrífuga Eppendorf refrigerada a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células se congelaron hasta su uso.

Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 1 mL de buffer de lisis adicionado con inhibidor de proteasas y lisozima a concentración final de 1X y 1 mg/mL, respectivamente. Se incubó durante 30 min en hielo.

Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular por ultrasonido en un sonicador Virtis Virsonic 60 Ultrasonic Cell Disrupter. La sonicación se hizo en seis ciclos de 10 segundos a 8 watts con descansos intermedios de 1 min.

Después de la sonicación, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 5,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf refrigerada a 4 °C. Se separó el sobrenadante de los restos celulares. El sobrenadante se consideró como el extracto crudo de proteína para llevar a cabo los ensayos de caracterización bioquímica.

#### 7.8.2 Especificidad de sustrato

Los ensayos para determinar la especificidad de sustrato de la lipasa LipGoM se realizaron con extracto crudo de proteína recién obtenido, en un volumen de reacción de 200 µL, con 0.5 mM de sustrato, en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 a 30 °C. Se monitoreó la formación de p-nitrofenol a 400 nm durante 2 minutos y posteriormente se calculó la actividad relativa de la enzima.

Los sustratos utilizados se especifican en el apartado 6.10 Caracterización bioquímica.

Se prepararon soluciones stock 10 mM de cada sustrato. Los p-nitrofenil ésteres C4-C8 se disolvieron en isopropanol mientras que los p-nitrofenil ésteres C10-C18 se disolvieron en una mezcla isopropanol:acetonitrilo (4:1) (Glogauer *et al.*, 2011).

#### 7.8.3 pH óptimo

Para determinar el pH óptimo de LipGoM se utilizaron los buffers descritos en el apartado 6.10 Caracterización bioquímica.

Los ensayos se realizaron con extracto crudo de proteína recién obtenido en un volumen de reacción de 200 µL, con 0.5 mM de sustrato a 30 °C. Durante dos minutos se monitoreó

la formación de p-nitrofenol a 320 nm a los valores de pH de 3.0 a 6.0, y a 400 nm a los valores de pH de 7.0 a 12.0. Posteriormente se calculó la actividad relativa de la enzima.

Para cada pH se obtuvo una curva de calibración del p-nitrofenol a la longitud de onda de máxima absorción correspondiente.

#### 7.8.4 Temperatura óptima

Para determinar la temperatura óptima de LipGoM se utilizaron los lectores de placas Synergy™ H1 de BioTek y VersaMax Microplate Reader de Molecular Devices, y el espectrofotómetro Beckman DU-650.

Los ensayos se realizaron con extracto crudo de proteína recién obtenido. Se utilizó un volumen de reacción de 200 µL para los ensayos en los lectores de placas, y de 300 µL para el espectrofotómetro. Se ajustó la cantidad de proteína y de sustrato para obtener la misma actividad enzimática volumétrica (U/mL) al pH óptimo de la enzima en los tres equipos utilizados bajo la condición estándar establecida.

Se monitoreó la formación de p-nitrofenol a 400 nm durante 5 minutos a las temperaturas de 10 a 60 °C con intervalos de 5 °C y se calculó la actividad relativa de la enzima.

#### 7.8.5 Termoestabilidad

Para conocer la termoestabilidad de LipGoM, el extracto de proteína se incubó durante 15, 30, 60 y 120 min, y cuando fue necesario a 300 y 720 min, desde 40 hasta 70 °C con intervalos de 5 °C y también a 80 °C.

Después del tiempo de incubación se monitoreó la formación de p-nitrofenol a 400 nm durante 2 minutos a las condiciones óptimas de la enzima (sustrato C12, pH 11.0 y temperatura 55 °C). Se calculó la actividad residual de la enzima teniendo como control la enzima sin ser sometida a incubación.

#### 7.9 Análisis bioinformático

A partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas LipGoM y Foldasa se llevó a cabo un análisis bioinformático para determinar su similitud con otras proteínas, la presencia de dominios, regiones conservadas, y en el caso de la lipasa, para su clasificación.

Para determinar la similitud de secuencia, se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de cada proteína utilizando la herramienta BLASTP del National Center for

Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en la base de datos no redundante y en la base de datos del Protein Data Bank (PDB por sus siglas en inglés) para la búsqueda por similitud de secuencia y estructura, respectivamente.

Para la clasificación de LipGoM dentro de las familias de enzimas lipolíticas se realizó un análisis filogenético a partir de la secuencia de aminoácidos de esta proteína, la secuencia de aminoácidos de su homólogo más cercano y la recopilación de algunas secuencias reportadas por Kovacic y colaboradores en 2019 (Rivera-Gómez, resultados sin publicar).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Aislamiento de la cepa *Pseudomonas alcaligenes*

En la campaña oceanográfica MET01 del CIGoM realizada en el año 2015 se recolectó una muestra de agua de mar a 1000 m de profundidad a 5.2°C y 3.49% de salinidad. Un mililitro de la muestra obtenida se inoculó en un medio de cultivo con 0.5 % de peptona, 0.25% de extracto de levadura y 1% de petróleo crudo Bacab alfa (16-20° API). El medio inoculado se incubó a 4°C y se agitó manualmente cada 24 h (Rodríguez-Mejía & Muriel-Millán, resultados sin publicar).

A la llegada de la muestra al laboratorio, 21 días después, se tomaron 100 µL y se realizaron diluciones seriadas. De la dilución 10<sup>-4</sup> se tomaron 100 µL y se sembraron por dispersión en medio sólido Luria-Bertani (LB)-modificado adicionado con 1% de tributirina y se incubó a 30°C durante 48 h. Las colonias aisladas que presentaron un halo de aclaramiento se seleccionaron y se sembraron en medio sólido LB-modificado adicionado con 1% de tricaprilina, compuesto específico para explorar la actividad lipasa (Rodríguez-Mejía & Muriel-Millán, resultados sin publicar).

Se identificó una cepa con alta actividad en tributirina y tricaprilina al 1%, la cual fue identificada como *Pseudomonas alcaligenes*, a partir de la secuenciación de su genoma completo (Rodríguez-Mejía & Muriel-Millán, resultados sin publicar).

### 8.2 Actividad lipolítica de la cepa *P. alcaligenes* aislada del Gofu de México

A partir del ADN genómico de *P. alcaligenes* se construyó una librería genómica que permitió asociar la actividad observada sobre tributirina y tricaprilina con tres enzimas lipolíticas. En un inserto de 5 Kb se identificó, a partir de datos de secuenciación, una lipasa con su foldasa específica abarcando una región de 1950 pb.

En la Figura 12 se describen los genes identificados en el inserto de 5 kb entre los que se muestran el gen codificante para una lipasa (azul) y el gen codificante para su foldasa específica (verde). La lipasa se nombró LipGoM.

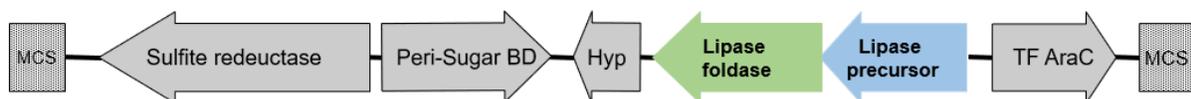


Figura 12. Descripción del inserto clonado de 5 Kb en la librería genómica de *P. alcaligenes*. Gen codificante para la lipasa en azul, gen codificante para la foldasa específica en verde.

### 8.3 Características estructurales de la lipasa LipGoM y de su foldasa específica

La lipasa LipGoM de *P. alcaligenes*, es una proteína de 312 aminoácidos con un peso molecular de 33.2 kDa que presenta un péptido señal en la región N-terminal.

De acuerdo con el análisis de secuencia realizado con la herramienta BLASTP del NCBI, en de la base de datos no redundante, LipGoM presenta un 96.47% de identidad con una triacilglicerol lipasa no caracterizada de *Pseudomonas sp.* BMS12, una cepa aislada de los sedimentos de un lago en la India (Mishra *et al.*, 2016).

Entre otras características, LipGoM presenta el dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa (Abhydrolase\_1, pfam00561) y el pentapéptido G-H-S-Q-G en el que se encuentra la serina catalítica. Los posibles residuos de la triada catalítica son Ser106, Asp256 e His278.

De acuerdo con el análisis realizado en la base de datos PDB, LipGoM presenta un 49.14% de identidad con una estructura cristalina de una lipasa de *P. aeruginosa* (1EX9, número de acceso PDB).

El análisis filogenético realizado por la Dra. Rivera-Gómez permitió establecer la pertenencia de LipGoM a la familia I de la clasificación de enzimas lipolíticas (Rivera-Gómez, resultados sin publicar).

La foldasa específica de la lipasa LipGoM es una proteína de 336 aminoácidos con un peso molecular de 37.8 kDa. De acuerdo con el análisis de secuencia realizado con la herramienta BLASTP del NCBI, en la base de datos no redundante, presenta un 72.86% de identidad con una proteína hipotética de *Pseudomonas sp.* BMS12, la misma cepa en la que se identificó el homólogo más cercano para LipGoM. Por otro lado, de acuerdo con el análisis en la base de datos PDB, la foldasa presenta un 37.18% de identidad con una estructura cristalina de una foldasa de *P. aeruginosa* (50VM, número de acceso PDB), también de la misma cepa en la que se identificó el homólogo estructural más cercano para LipGoM. Estos análisis demuestran la relación estrecha entre ambas proteínas, en la que la lipasa depende de la función de su foldasa específica.

### 8.4 Sobreexpresión previa de la lipasa LipGoM

Con el objetivo de estudiar y explorar el potencial biotecnológico de la lipasa LipGoM se realizó la clonación y sobreexpresión de la región codificante de 1950 pb, en la que se

encuentran los genes *lipgom* y *foldasa*, en el plásmido pET28a(+) utilizando como hospedero células de *E. coli* BL21 (DE3). Se obtuvo la construcción pET28a::LipGoM-Foldasa.

La expresión de la lipasa se verificó a partir de una prueba de actividad lipolítica sobre medio LB-modificado adicionado con tricaprilina al 1% como sustrato. La clona de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pET28a::LipGoM-Foldasa y la clona con el plásmido pET28a vacío se sembraron en el medio de cultivo. Después de 3 días de incubación a 30°C se observó un halo de aclaramiento alrededor de la clona pET28a::LipGoM-Foldasa, mientras que en la clona con el plásmido pET28a vacío no se observó ningún halo de aclaramiento, con lo cual, se evidenció que se logró clonar y expresar la lipasa LipGoM en las células de *E. coli* BL21 (Figura 13).

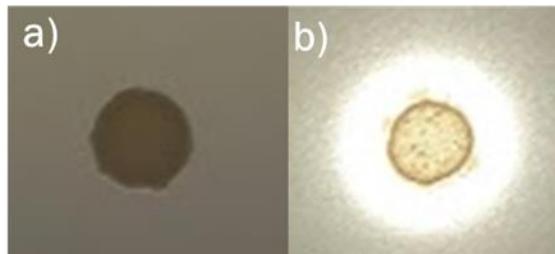


Figura 13. Actividad de LipGoM en medio LB-modificado con tricaprilina al 1% después de 3 días de incubación a 30°C. a) Clona con el plásmido pET28a vacío, b) Clona con el plásmido pET28a::LipGoM-Foldasa.

Posteriormente, se realizó la inducción de la expresión de la lipasa en medio LB líquido a 37°C durante 3 h con 0.5 mM de IPTG. Las células se lisaron por sonicación y se separaron los restos celulares (fracción insoluble) del extracto de proteína (fracción soluble). Con las fracciones obtenidas se realizó un SDS-PAGE y un Western-Blot, y a partir de estas pruebas se observó la presencia de LipGoM únicamente en la fracción insoluble (Figura 14), sin embargo, en la fracción soluble fue posible detectar actividad al realizar ensayos sobre p-nitrofenil ésteres de cadenas carbonadas de tamaño mediano y largo (Figura 15, pET28a::Lip2-Lif).

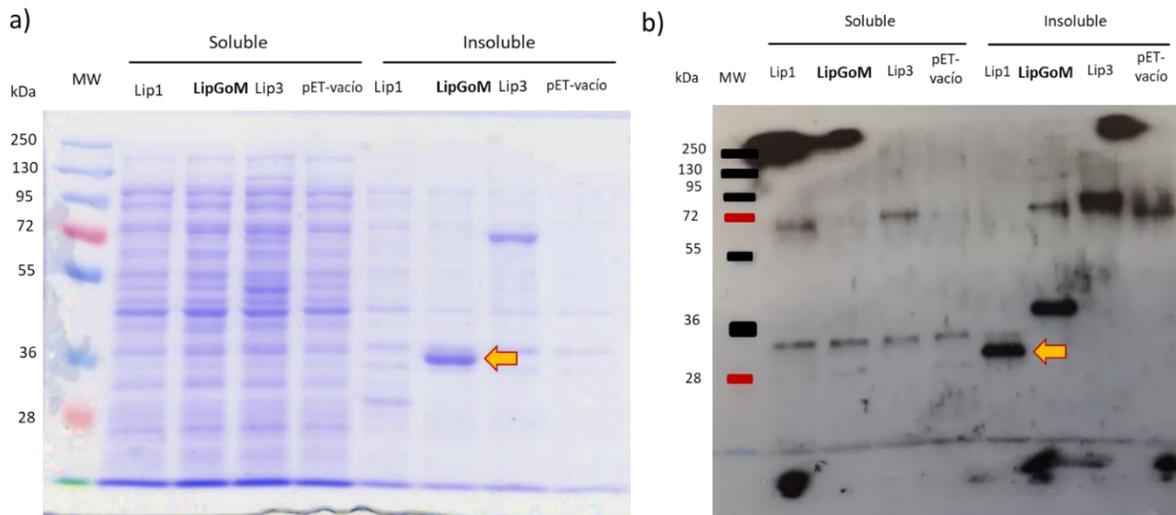


Figura 14. Análisis de la expresión de la lipasa LipGoM.

a) SDS-PAGE al 10%, b) Western Blot. La flecha amarilla indica la proteína cercana al tamaño esperado de la lipasa.

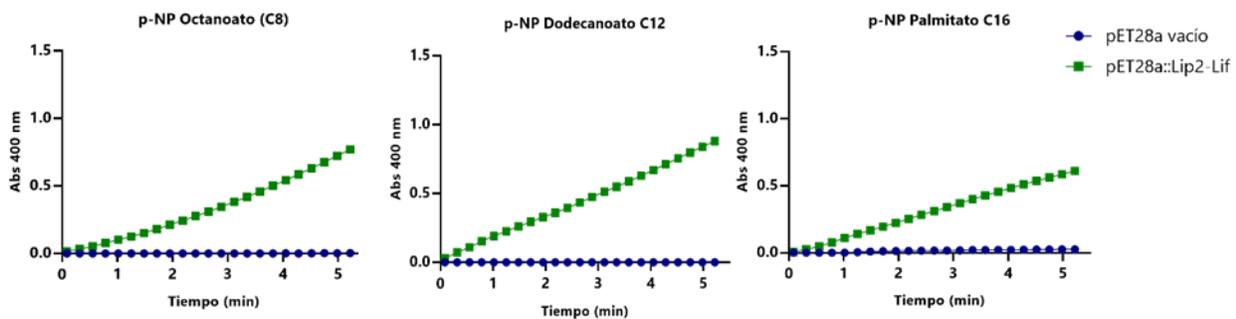


Figura 15. Actividad del extracto de proteína de LipGoM sobre distintos p-nitrofenil ésteres.

### 8.5 Incremento de la solubilidad de la lipasa LipGoM

Considerando los resultados las pruebas de SDS-PAGE y Western Blot (Figura 14), para incrementar la cantidad de lipasa soluble y conseguir su purificación, se realizaron pruebas de solubilización con distintos detergentes a concentraciones variadas. Al utilizar el detergente Sarcosil al 2% incrementó considerablemente la presencia de LipGoM en la fracción soluble y fue posible su purificación por cromatografía de afinidad, sin embargo, la forma pura que se obtuvo de la enzima era inactiva (resultados sin mostrar).

Se consideró que la forma pura de LipGoM era inactiva por haberla separado de su foldasa con el paso de purificación. Debido a que la pérdida de la actividad de una enzima está relacionada con la pérdida de su estructura, se hipotetizó que la pérdida de la conformación activa de LipGoM se debe a la separación de su foldasa específica, por lo que se planteó el uso de las estrategias de plegamiento in vivo para clonar nuevamente los genes lipgom y foldasa comenzando con la clonación del gen lipgom sin péptido señal.

### 8.6 Clonación y expresión de la lipasa LipGoM sin péptido señal

La clonación y expresión soluble de las lipasas de *A. veronii* B565 y *B. contaminans* LTEB11, cuyo plegamiento depende de su foldasa específica, se logró a través de estrategias de plegamiento in vivo removiendo su respectivo péptido señal (Martini *et al.*, 2014; Alnoch *et al.*, 2018), por lo que esperando incrementar la expresión soluble de la lipasa LipGoM se optó por remover su péptido señal.

La secuencia codificante los genes lipgom y foldasa tiene un tamaño de 1950 pb siendo el tamaño de los genes de 939 pb y 1011 pb, respectivamente (Figura 16).

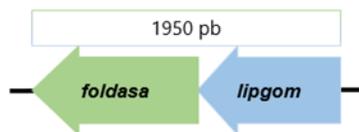


Figura 16. Representación esquemática de los genes *lipgom* y *foldasa*.

Para la clonación de la lipasa sin péptido señal se realizó la predicción de los aminoácidos que corresponden a esta secuencia utilizando el servidor SignalP 5.0.

De acuerdo con la predicción del programa, LipGoM tiene un péptido señal Sec (Sec/SPI) con una probabilidad del 95%, estos péptidos señal son transportados por el translocón Sec y escindidos por la Señal Peptidasa I Lep. Se trata de un péptido señal de 22 aminoácidos con un sitio de escisión entre los aminoácidos 22 y 23 (Figura 17).



amplificación del gen completo mientras que, en el carril 4 no se observa amplificación tal y como se esperaba al no estar presentes los nucleótidos necesarios para el alineamiento del oligonucleótido forward. Así mismo, se observa una diferencia en migración en el gel de agarosa al 1.5% entre el producto de PCR sin péptido señal y producto de PCR completo, siendo claramente de menor tamaño (1918 pb) el producto sin péptido señal.

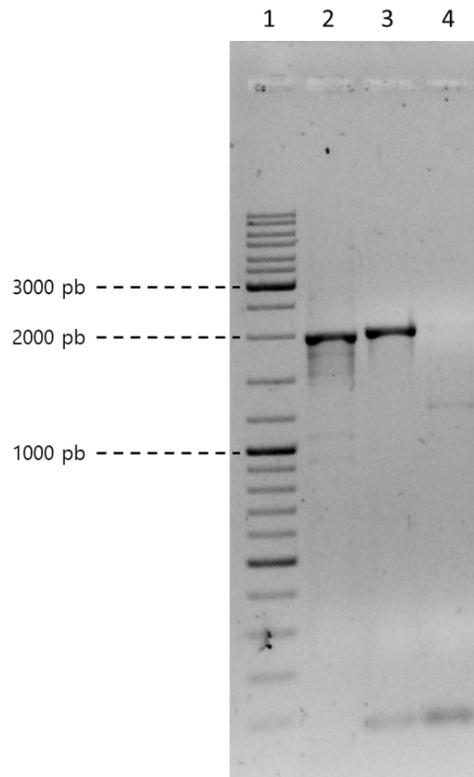


Figura 18. Amplificación del gen *lipgom* con y sin péptido señal. 1: marcador de peso molecular, 2: gen sin péptido señal, 3: gen con péptido señal, 4: sin producto de PCR.

Una vez corroborada la amplificación del gen sin péptido señal, se prosiguió a digerir el producto de PCR purificado con las enzimas NdeI y EcoRI. Así mismo, se digirió el plásmido pET28a(+) con las mismas enzimas para linealizarlo. Ambos se purificaron a partir de la banda (Figura 19). Posteriormente el producto de PCR se ligó al plásmido en una proporción 1:3 (vector:inserto) colocando 10 ng de plásmido y 11 ng de producto de PCR. La construcción obtenida se denominó pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa.

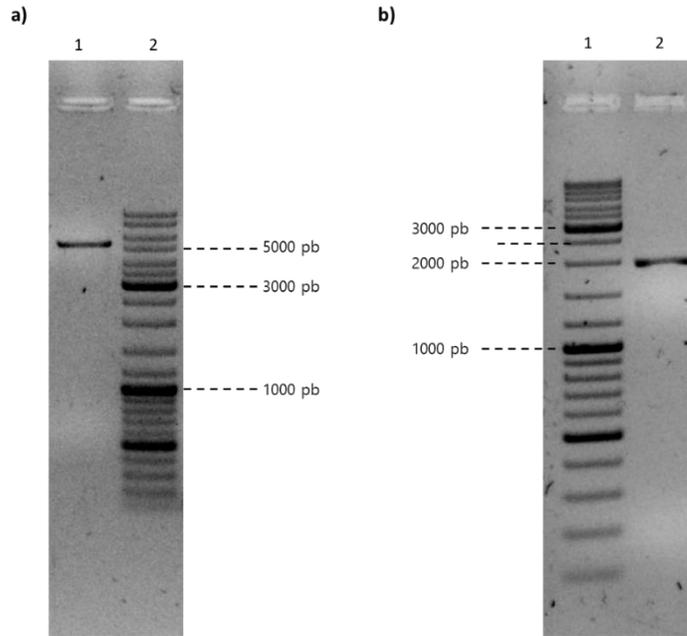


Figura 19. a) Plásmido pET28a linealizado (5369 pb). b) producto de PCR sin péptido señal (1918 pb).

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron al azar 10 clonas para verificar la clonación del inserto de interés mediante pruebas de PCR. De las clonas seleccionadas, en ocho de ellas se observó la amplificación del gen sin péptido señal (Figura 20).

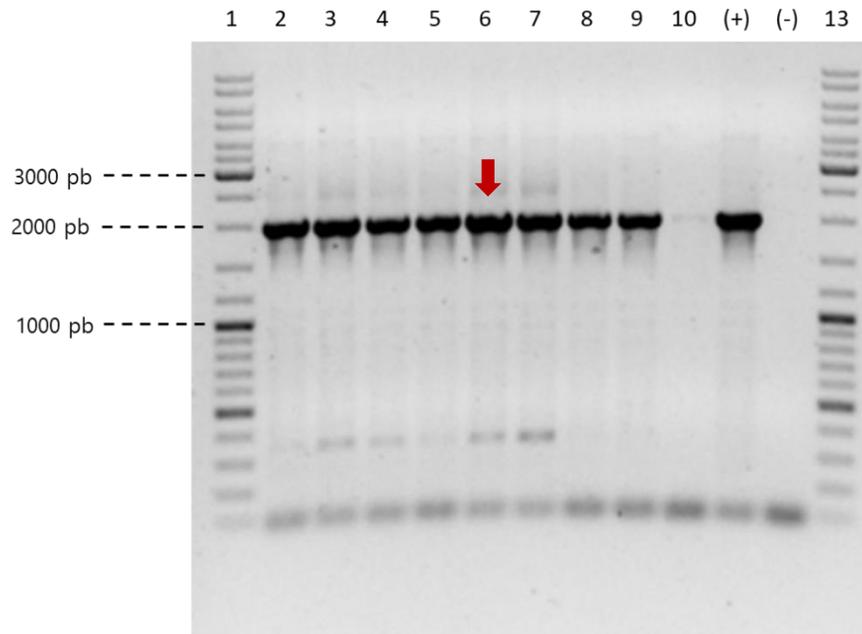


Figura 20. Tamizado de clonas con la construcción pET28a::LipGo $\Delta$ SP-Foldasa para el gen sin péptido señal. La flecha corresponde a la clona seleccionada.

Con estas mismas clonas se realizó otra prueba de PCR con oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen completo con el objetivo de corroborar la eliminación de los nucleótidos del péptido señal. Ninguna de las clonas presentó amplificación y se concluyó que se había logrado clonar el gen *lipgom* sin péptido señal (Figura 21).

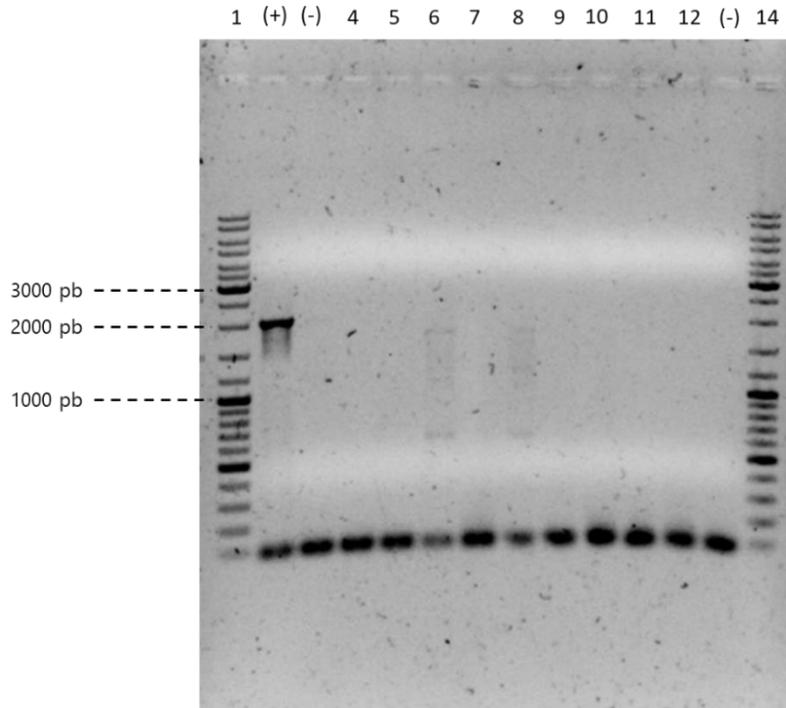


Figura 21. Tamizado de clonas con la construcción pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa para el gen con péptido señal.

A partir del tamizaje de clonas con la construcción pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa se seleccionó la clona 6 para la inducción de la expresión (Figura 20). Se estableció como control positivo la clona con la construcción que posee el gen con péptido señal (pET28a::LipGoM-Foldasa), dado que a partir de esta construcción se sabe que hay expresión activa de la enzima, y como control negativo se incluyó la clona conteniendo el vector de expresión pET28a vacío.

Para la inducción se cultivó por separado a 37 °C la clona 6 pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa y los controles pET28a::LipGoM-Foldasa y pET28a hasta una D.O<sub>600nm</sub> de 0.6, se agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM de IPTG y se incubó durante 3 h.

Se realizó un SDS-PAGE para analizar la expresión soluble de la lipasa a partir del extracto de proteína (fracción soluble) y los restos celulares (fracción insoluble o pellet) tras la lisis celular (Figura 22).

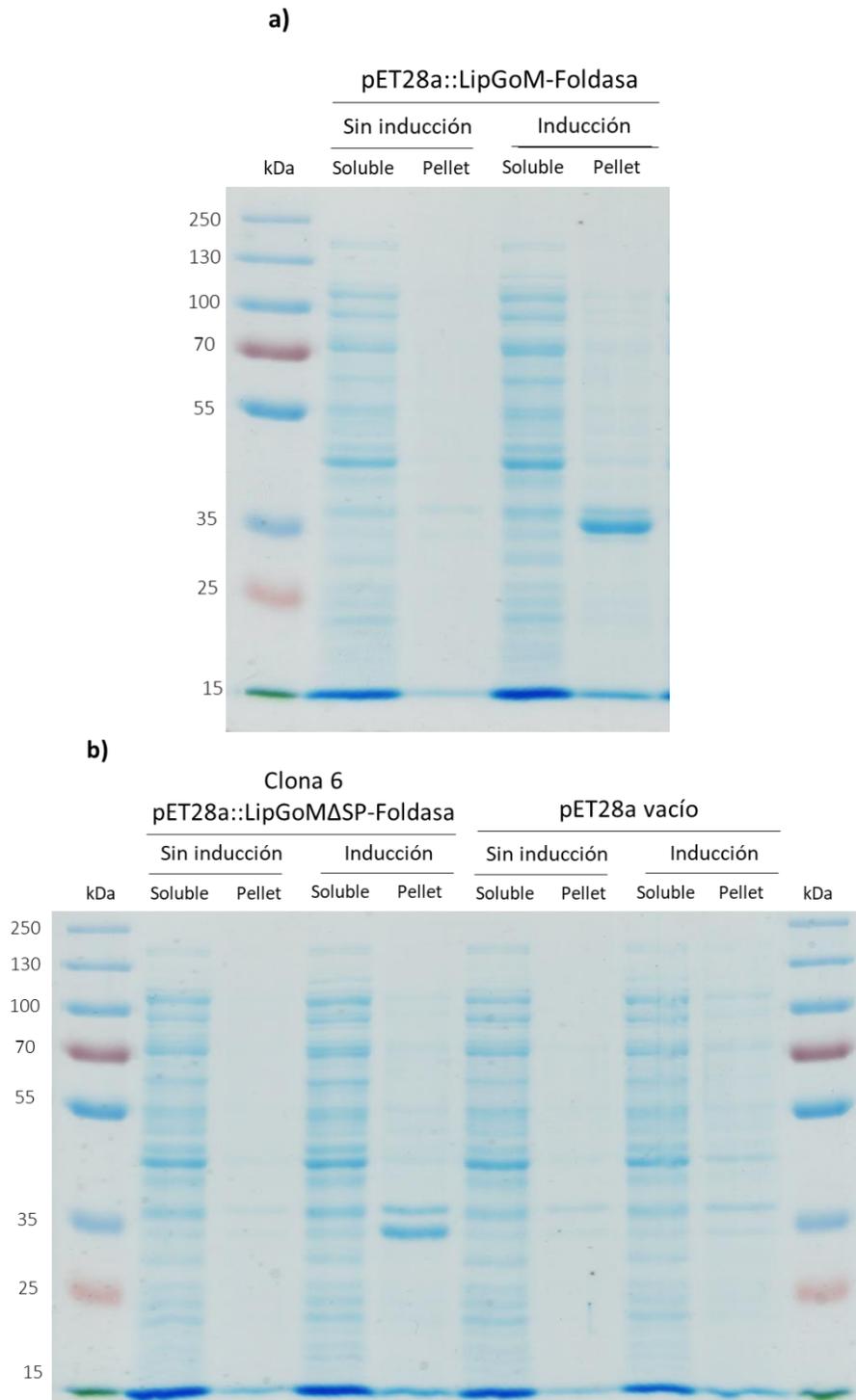


Figura 22. Expresión de LipGoM a 37 °C.

Análisis SDS-PAGE al 12% de las fracciones e insolubles de las clonas inducidas a 37 °C durante 3 h. Lipasa sin péptido señal: 31 kDa, lipasa completa: 33.2 kDa. Se cargaron 20 µg de proteína del extracto.

Se esperaba que la lipasa sin péptido señal de aproximadamente 31 kDa se encontrara en la fracción soluble (Figura 22 b, clona 6 pET28a::LipGoMΔSP-Foldasa), sin embargo, la proteína estaba en la fracción insoluble, aunque ligeramente de menor peso molecular que la lipasa completa (Figura 22 a, pET28a::LipGoM-Foldasa) al ya no tener péptido señal.

La presencia de la lipasa sin péptido señal en la fracción insoluble se atribuyó a las condiciones de inducción, ya que está reportado que durante la sobreexpresión de una proteína las regiones hidrofóbicas se encuentran expuestas y disponibles para interactuar con regiones similares causando así inestabilidad y/o la agregación de la proteína (Rosano & Ceccarelli, 2014). Una alternativa para evitar la agregación de las proteínas durante la sobreexpresión es realizar la inducción a bajas temperaturas, pues se disminuye la velocidad de transcripción y traducción, favoreciendo el correcto plegamiento y la estabilidad de la proteína recombinante (Lara, 2011).

Por lo anterior, se realizó la inducción a 18 °C durante toda la noche. Los resultados se muestran en la Figura 23.

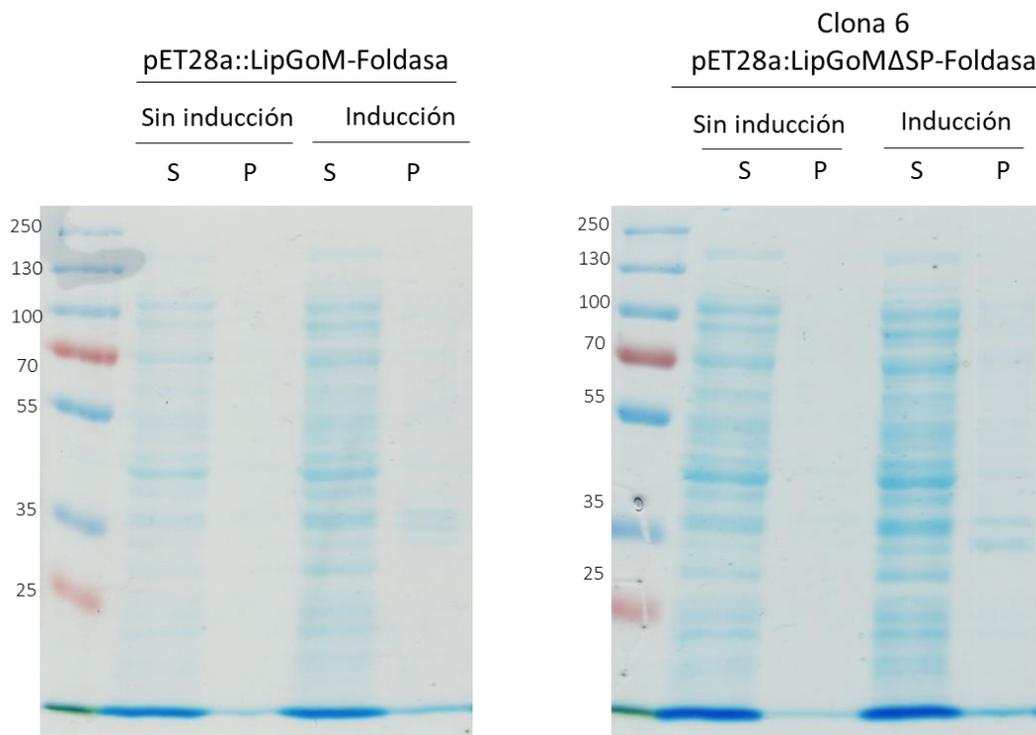


Figura 23. Expresión de LipGoM a 18 °C.

Análisis SDS-PAGE al 12% de las fracciones e insolubles de las clonas inducidas a 18 °C durante toda la noche. Lipasa sin péptido señal: 31 kDa, lipasa completa: 33.2 kDa. Se cargaron 20 µg de proteína del extracto. S: sobrenadante, P: pellet.

A pesar de la disminución de la temperatura de inducción no fue posible observar la lipasa en la fracción soluble, sin embargo, para comprobar la expresión activa de la lipasa sin péptido señal se realizaron dos pruebas de actividad. La primera en LB-modificado con sustrato emulsificado y la segunda con con p-nitrofenil dodecanoato como sustrato en ensayos espectrofotométricos.

Se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

Las clonas con los plásmidos pET28a::Lip2 $\Delta$ SP-Foldasa y los controles pET28a::Lip2-Foldasa y pET28a vacío se sembraron en medio LB-modificado adicionado con tricaprilina al 1%. Este método se basa en la identificación de una zona clara de lipólisis debida a la capacidad de los microorganismos de descomponer los lípidos presentes en el medio sólido (Jaeger & Kovacic, 2014; Bharathi & Rajalakshmi, 2019). Después de dos días de incubación a 30°C y una semana de incubación a 4°C fue posible observar halos de hidrólisis de la tricaprilina en medio sólido como se muestra en la (Figura 24). El halo de hidrólisis de la clona con la lipasa completa (LipGoM) se observó mucho más extendido que el de la clona con la lipasa sin péptido señal (6), lo que, se relaciona a la ausencia del péptido señal para la secreción eficiente de la enzima al medio extracelular, en contraste, la clona con el plásmido vacío no presentó halo de hidrólisis.



Figura 24. Clonas de *E. coli* BL21 en LB-modificado con tricaprilina al 1%. Se observan los halos de aclaramiento relacionados con actividad lipolítica. Lip2: clona pET28a::LipGoM-Foldasa, 12 pET: clona con el plásmido pET28a vacío, 6: clona pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa.

Para corroborar la expresión activa de la lipasa sin péptido señal, se midió la actividad enzimática de los extractos de proteína obtenidos de las inducciones a las dos temperaturas probadas (37°C y 18°C) utilizando al sustrato p-nitrofenil dodecanoato. Se utilizaron 100  $\mu$ g de proteína procedentes del extracto, y se monitoreó la liberación de p-nitrofenol espectrofotométricamente a 400 nm. Finalmente se graficó el tiempo que se

monitoreó la reacción y el incremento en absorbancia por la aparición de p-nitrofenol, por la acción enzimática, a medida que transcurrió el tiempo (Figura 25).

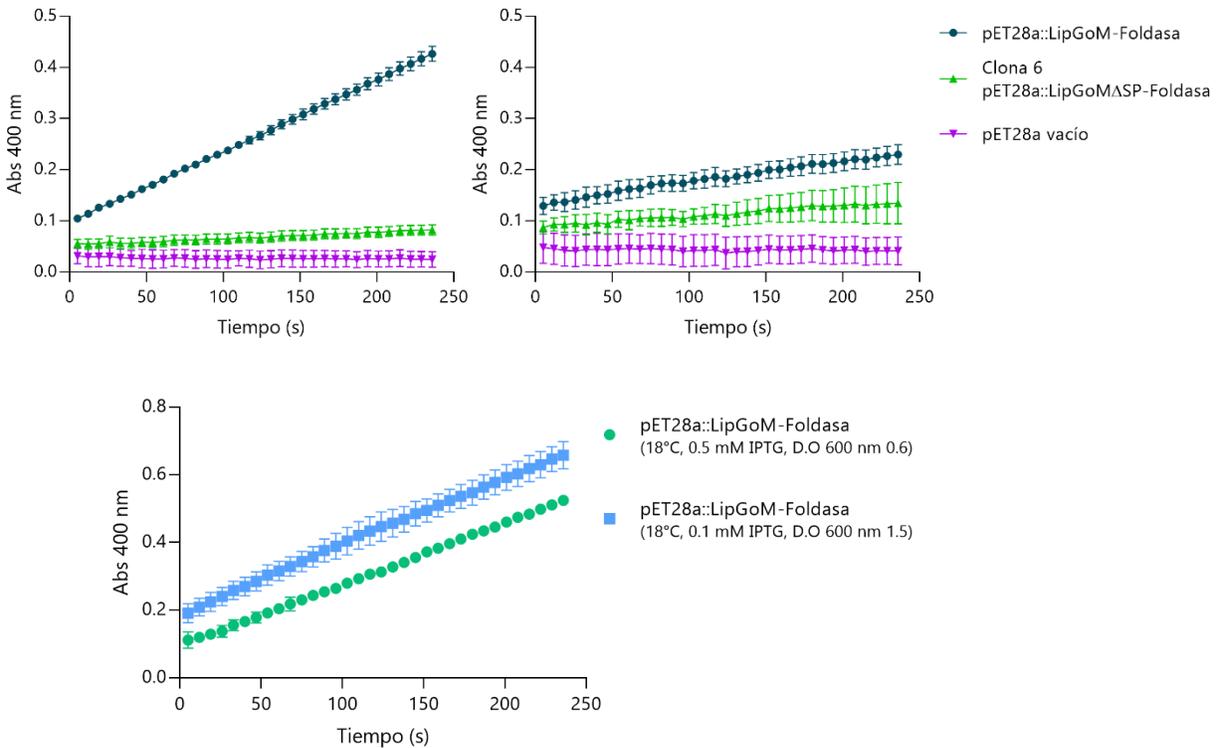


Figura 25. Actividad de extractos de proteína sobre p-nitrofenil dodecanoato.

a) actividad de los extractos de las clonas inducidas a 37 °C durante 3 horas, b) actividad de los extractos de las clonas inducidas a 18 °C durante toda la noche, c) comparación de la actividad de la lipasa completa (pET28a::LipGoM-Foldasa) a las dos temperaturas de inducción (37 °C y 18 °C).

La clona que contenía la lipasa sin péptido señal (pET28a::LipGoM $\Delta$ SP-Foldasa) inducida a 37 y a 18 °C no presentó actividad enzimática, sin embargo, la clona con la lipasa completa (pET28a::LipGoM-Foldasa) sí presentó actividad como se había observado previamente. Al comparar las actividades enzimáticas de esta versión de LipGoM obtenida a las temperaturas de inducción de 37 y 18 °C (Figura 25c) fue evidente que la clona inducida a 18 °C tiene más actividad, dando indicios de una posible mejora en la solubilidad para la versión completa de la lipasa.

A pesar de que teóricamente LipGoM solo presenta un enlace disulfuro, se consideró que la versión sin péptido señal no tendría oportunidad de llegar al periplasma del hospedero para la formación de este enlace. Para muchas proteínas recombinantes, la formación de

enlaces disulfuro correctos es vital para lograr su conformación tridimensional biológicamente activa. En *E. coli*, la oxidación de cisteínas tiene lugar en el periplasma, donde se forman enlaces disulfuro en reacciones catalizadas por enzimas principalmente de la familia Dsb. La formación de enlaces disulfuro en el citoplasma es rara y su formación en este sitio puede provocar la agregación de las proteínas al crearse enlaces disulfuro erróneos. El citoplasma se mantiene como un ambiente reductor por el sistema tiorredoxina-tiorredoxina reductasa (trxB) y el sistema glutaredoxina-glutarredoxina reductasa (gor), por lo que este ambiente químico tiene un gran impacto en la producción de proteínas recombinantes con enlaces disulfuro (Rosano & Ceccarelli, 2014). Para contrarrestar esta situación se han diseñado cepas de *E. coli* que poseen un entorno citoplasmático oxidativo para favorecer la formación de enlaces disulfuro. Tal es el caso de la cepa SHuffle® T7 que tiene mutaciones trxB<sup>-</sup> y gor<sup>-</sup> y además expresa constitutivamente una copia cromosómica de la isomerasa de enlace disulfuro DsbC que promueve la corrección de proteínas mal oxidadas en su forma correcta.

Por lo anterior, la construcción pET28a::LipGoMΔSP-Foldasa y los controles pET28a::LipGoM-Foldasa y pET28a vacío se cambiaron de hospedero a la cepa SHuffle® T7. Se transformaron células quimiocompetentes de SHuffle® T7, y se verificó la transformación por digestión enzimática. Se realizó una doble digestión con las enzimas NdeI y EcoRI para liberar el inserto de interés de los plásmidos (Figura 26).

Una vez que se verificó la transformación de las células de *E. coli* SHuffle® T7, se prosiguió a realizar una prueba de inducción siguiendo las recomendaciones de la casa comercial de la cepa New England Biolabs (NEB). Se incubó a 30 °C hasta una D.O<sub>600nm</sub> de 0.5 y se realizó la inducción con 0.5 mM de IPTG a 30 °C durante 4 horas.

Los resultados de la inducción se muestran en la Figura 26. A pesar de haber cambiado de hospedero para tener un mejor ambiente químico en el citoplasma, nuevamente se observó a la lipasa sin péptido señal en la fracción insoluble al igual que la lipasa completa.

Por otro lado, considerando los resultados de la actividad enzimática de los extractos de las clonas de *E. coli* BL21, en los que al menos para la lipasa completa se observó mayor actividad cuando la temperatura de inducción fue a 18 °C, se realizaron otras pruebas de

expresión a esta temperatura para intentar recuperar una mayor cantidad de lipasa soluble, tanto completa como sin péptido señal.

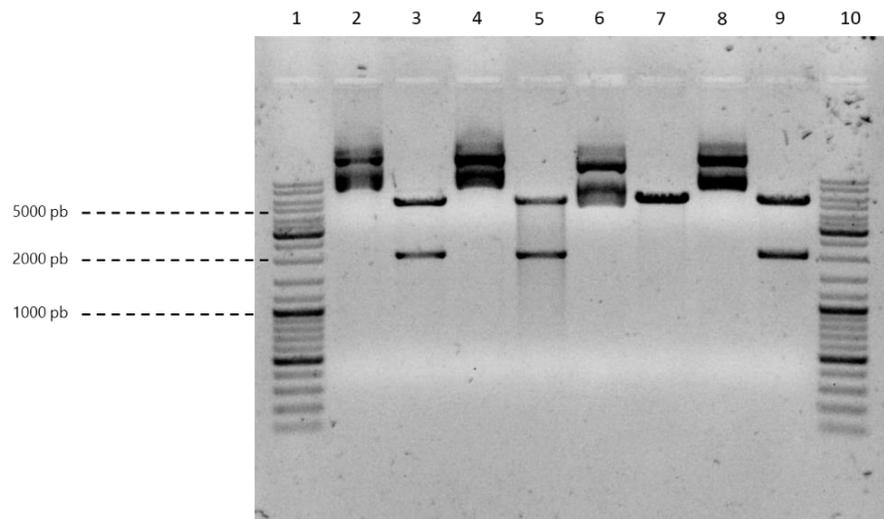


Figura 26. Doble digestión enzimática NdeI-EcoRI de plásmido de clonas *E. coli* SHuffle® T7. 1: marcador de peso molecular; 2: pET28a::LipGoM-Foldasa, plásmido sin digerir; 3: pET28a::LipGoM-Foldasa, plásmido digerido; 4: clona 5 pET28a::LipGoΔSP-Foldasa, plásmido sin digerir; 5: clona 5 pET28a::LipGoΔSP-Foldasa, plásmido digerido; 6: pET28a vacío sin digerir; 7: pET28a vacío digerido; 8: clona 6 pET28a::LipGoΔSP-Foldasa, plásmido sin digerir; 9: clona 6 pET28a::LipGoΔSP-Foldasa, plásmido digerido; 10: marcador de peso molecular.

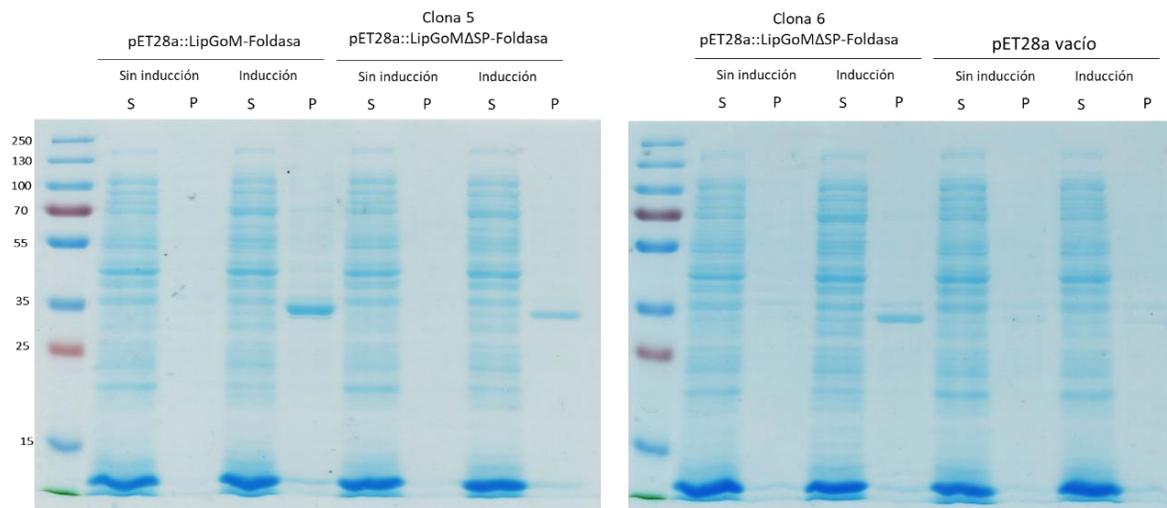


Figura 27. Expresión de LipGoM con y sin péptido señal en clonas de *E. coli* SHuffle® T7. La inducción se realizó a 30 °C durante 4 h. Se cargaron 50 µg de proteína del extracto. S: sobrenadante, P: pellet.

Dado que la variación de temperatura es uno de los factores de estrés más importantes que afectan el crecimiento, el metabolismo y la integridad de los microorganismos (Noor *et al.*, 2013; Chung, Bang & Drake, 2006), el crecimiento previo a la inducción se cambió a 30°C, una temperatura relativamente baja, para no ocasionar estrés a la bacteria por el cambio de temperatura a 18°C al realizar la inducción.

La inducción se realizó a una D.O<sub>600nm</sub> de 1.5 para tener mayor densidad celular y garantizar así la obtención de una mayor cantidad de enzima. Se disminuyó la cantidad de IPTG hasta 0.1 mM considerando la concentración antes usada de 0.5 mM como una alta concentración, ya que la inducción con altas concentraciones de IPTG puede causar toxicidad para las células y disminuir los niveles de expresión (Rizkia *et al.*, 2015). La temperatura de inducción fue a 18°C y se incubó durante 20 h.

Los resultados de esta prueba de inducción se muestran en la Figura 28. Una vez más se observó mayor presencia de la lipasa en la fracción insoluble, sin embargo, en las clonas pET28a::LipGoM-Foldasa y clona 6 pET28a::LipGoMΔSP-Foldasa se observó en el sobrenadante después de la inducción una banda más enriquecida alrededor del peso esperado que no se observa en los sobrenadantes sin inducir (Figura 28, flechas rojas).

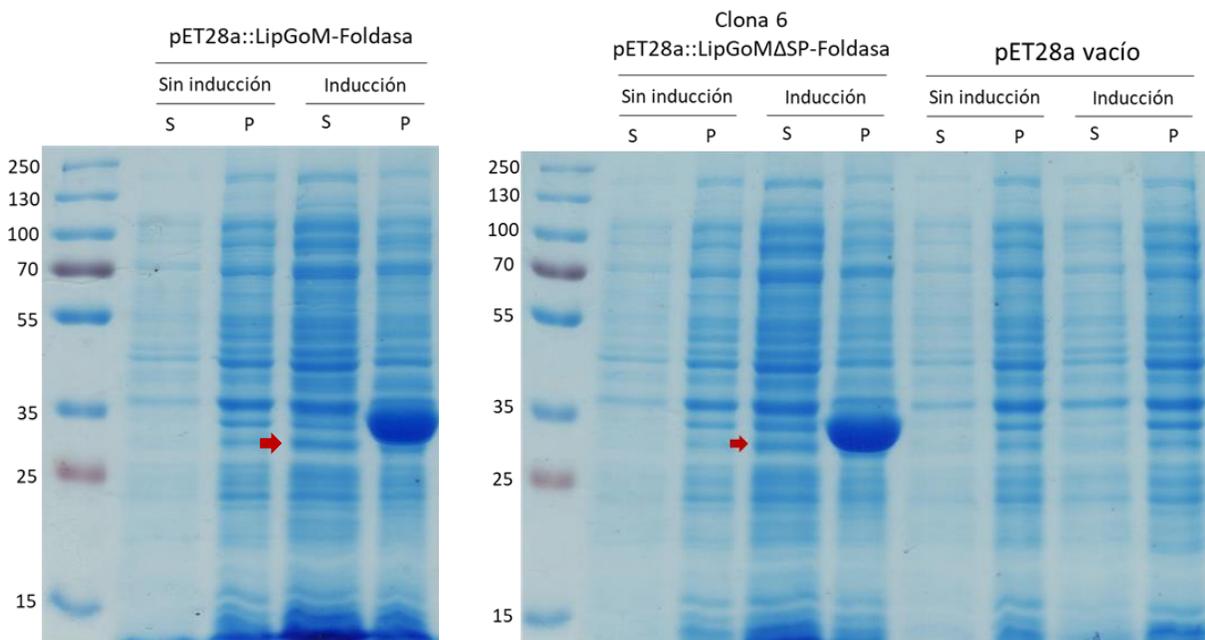


Figura 28. Expresión de LipGoM con y sin péptido señal a 18°C durante 20 h. Se cargaron 50 µg de proteína del extracto. S: sobrenadante, P: pellet.

Para verificar la expresión activa de las dos versiones de la lipasa bajo las nuevas condiciones de inducción, se realizó un ensayo de actividad enzimática con los extractos obtenidos. Los resultados de la actividad se muestran en la Figura 29.

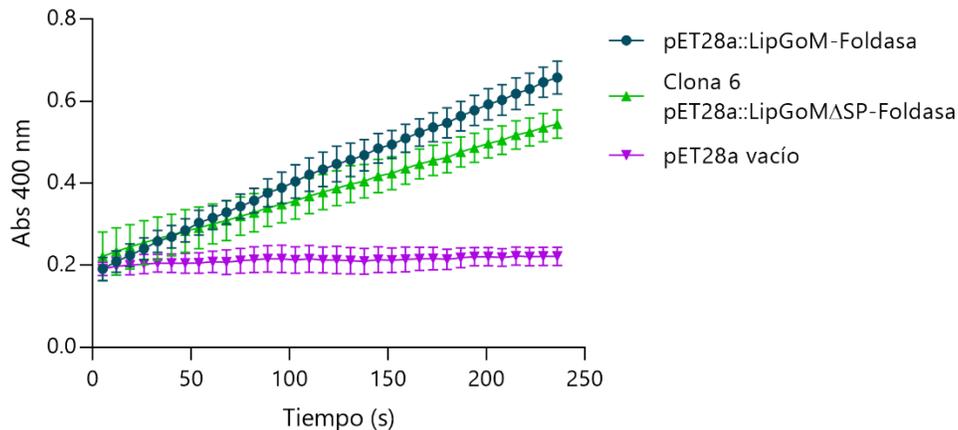


Figura 29. Actividad de extractos de proteína sobre p-nitrofenil dodecanoato de las clonas inducidas con 0.1 mM de IPTG a 18 °C durante 20 h.

Las nuevas condiciones de inducción permitieron observar por primera vez la actividad de la lipasa sin péptido señal al menos en la clona 6, un resultado favorable, dando indicios de una mejora en la expresión soluble. Así mismo, se observó actividad de la lipasa completa, la cual, llamó la atención al presentar mayores valores de absorbancia, que pueden interpretarse como mayor actividad, que los observados cuando la inducción se realizó también a 18 °C pero a una D.O<sub>600nm</sub> de 0.6 y con 0.5 mM de IPTG. La comparación de la actividad de LipGoM con péptido señal se muestra en la Figura 30. Es probable que al haber realizado la inducción teniendo mayor densidad celular se haya favorecido la obtención de la lipasa completa soluble con mayor actividad, a pesar de no observar la proteína claramente en el SDS-PAGE.

Para corroborar la presencia de la lipasa en las fracciones solubles de la clona pET28a::LipGoM-Foldasa y Clona 6 pET28a::LipGoMΔSP-Foldasa se realizó un Western Blot. Debido a que la clonación en el vector pET28a permite la expresión de la lipasa con una etiqueta de histidinas en la región N-terminal, fue posible realizar este ensayo.

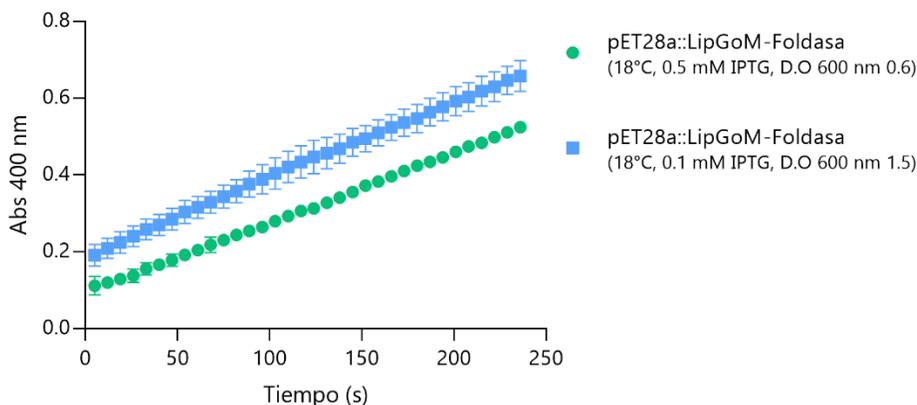


Figura 30. Comparación de la actividad de LipGoM completa a diferentes condiciones de inducción.

En la Figura 31a se muestra el SDS-PAGE y en la Figura 31b el Western Blot. Por primera vez se detectó con un ensayo de Western Blot a la lipasa completa en la fracción soluble y fue posible la detección de la lipasa sin péptido señal tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble. Se determinó que con las condiciones de inducción, D.O<sub>600nm</sub> de 1.5; 18°C; 0.1 mM de IPTG; 20 h, se favoreció la obtención soluble de las dos versiones de la lipasa, por lo que se prosiguió a realizar pruebas de purificación con el fin de obtener la lipasa de forma activa y continuar con la caracterización bioquímica.

Los resultados de una de las pruebas de purificación se muestran en la Figura 32. Se probaron condiciones de purificación variando la cantidad de resina y el volumen de extracto, incluso las eluciones obtenidas durante la purificación se concentraron y se realizó un ensayo de actividad sobre p-nitrofenil dodecanoato como sustrato como un método únicamente para esclarecer si se había logrado purificar lipasa activa.

Los resultados de la medición de actividad de las lipasas purificadas y concentradas se muestran en la Figura 33. En esta se observa actividad de la lipasa completa hasta los 20 minutos de reacción, mientras que, con el extracto los mismos valores de absorbancia alcanzados se observaron al monitorear la reacción durante 5 minutos. La lipasa sin péptido señal no presentó actividad.

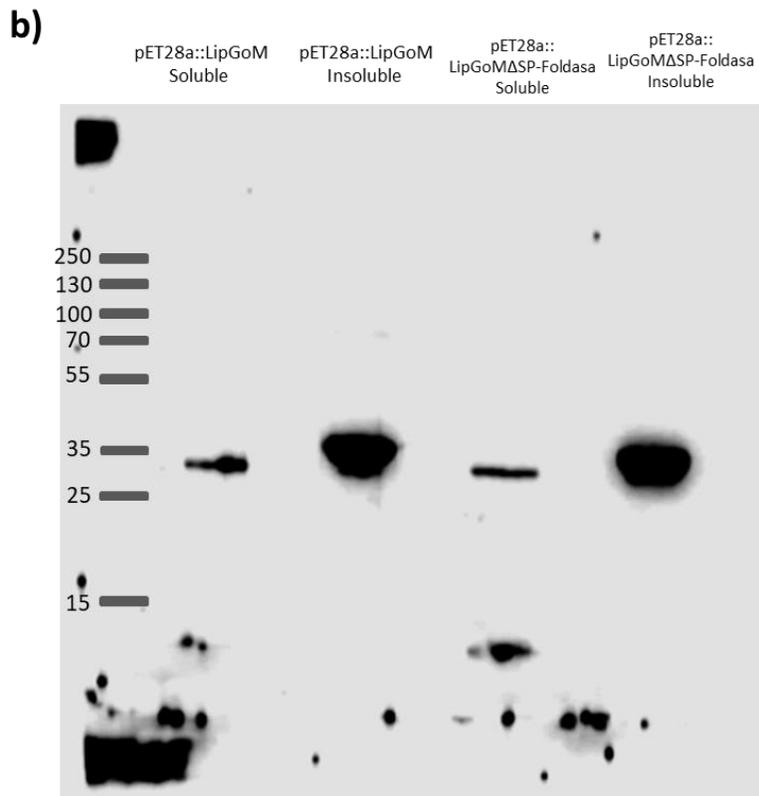
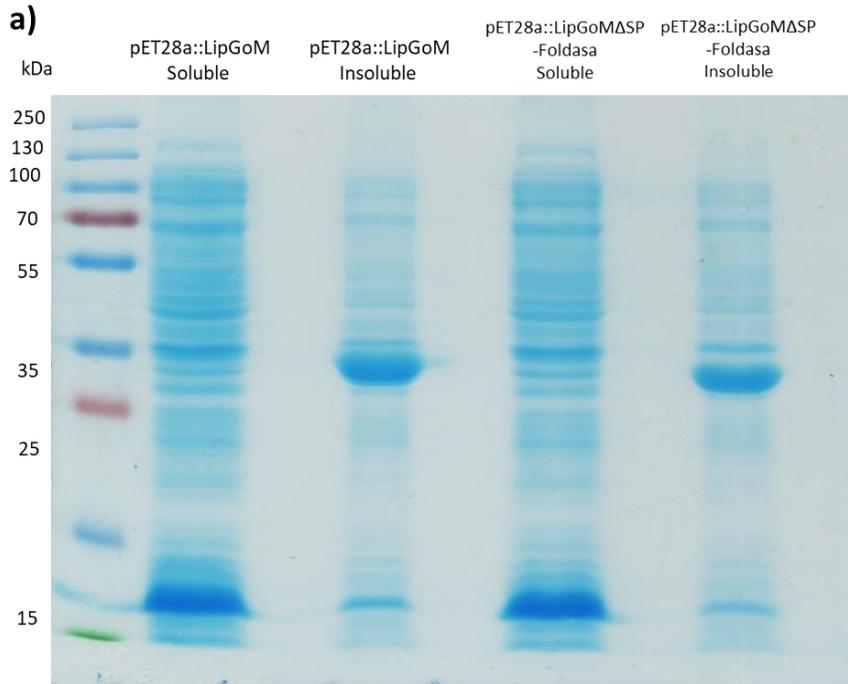


Figura 31. Verificación de la expresión soluble de la lipasa a partir de las construcciones pET28a::LipGoM-Foldasa y pET28a::LipGoMΔSP-Foldasa a 18 °C, D.O<sub>600nm</sub> de 1.5, 0.1 mM de IPTG.  
 a) Análisis SDS-PAGE al 12% y b) Western Blot. para corroborar la expresión soluble de la lipasa. Lipasa completa: 33.2 kDa, lipasa sin péptido señal: aprox. 31 kDa.

El objetivo de la purificación de proteínas es eliminar otras proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos o cualquier otro material biológico de la fracción que contiene la proteína de interés (Grant, 2022). Una buena purificación da como resultado la recuperación de la mayor parte de proteína que puede reflejarse en un aumento de la actividad específica de la enzima (Westphal & van Berkel, 2021). Si bien se recuperó la lipasa completa activa, el proceso de purificación no fue exitoso, además, la lipasa recuperada no fue suficiente para realizar más ensayos de actividad y continuar con la caracterización bioquímica.

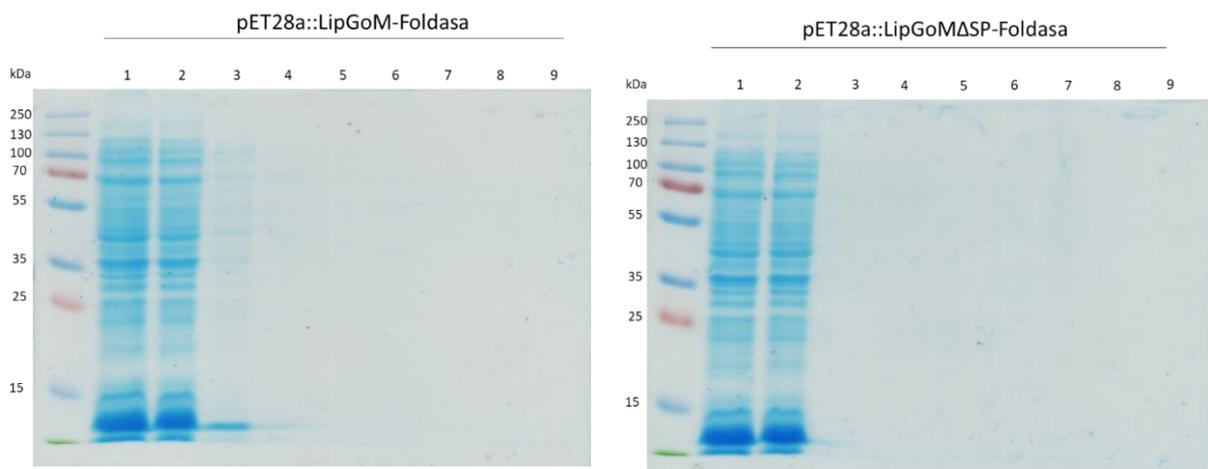


Figura 32. Purificación de LipGoM.

Análisis SDS-PAGE de la purificación. 1: Extracto total de proteína, 2: Flow through, 3: Lavado 1, 20 mM de imidazol, 4: Lavado 1, 50 mM de imidazol, 5: Elución 1, 6: Elución 2, 7: Elución 3, 8: Elución 4, 9: Elución 5.z

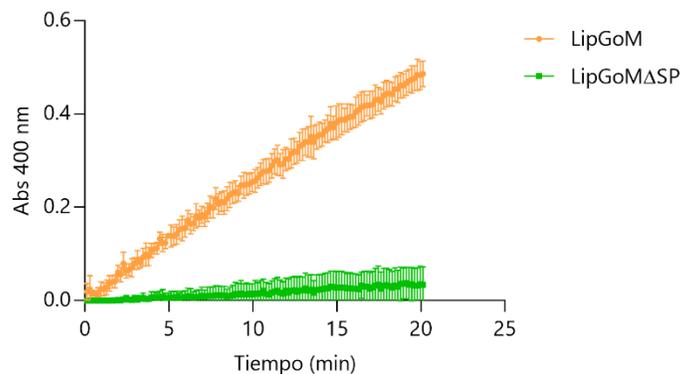


Figura 33. Actividad de las lipasas LipGoM y LipGoMΔSP purificadas y concentradas sobre p-nitrofenil dodecanoato.

La estrategia molecular de remover el péptido señal de la lipasa no resultó favorable ya que no se logró la expresión soluble de la lipasa en una cantidad suficiente como para permitir su purificación y posterior caracterización bioquímica, por lo que se propuso una segunda estrategia de clonación que contempló el uso de un vector de expresión dual.

### 8.7 Clonación y expresión de la lipasa LipGoM y su foldasa específica en un sistema de expresión dual

En la literatura está reportado que la lipasa y la foldasa deben estar presentes en cantidades equimolares para un plegamiento óptimo, por lo que el uso de vectores de expresión dual puede favorecer la expresión equitativa de la lipasa y la foldasa, aumentando así la probabilidad de obtener a la lipasa soluble y en su conformación activa (Wu *et al.*, 2012).

Para la segunda estrategia de clonación se seleccionó el vector de expresión pRSFDuet que tiene dos sitios de clonación múltiple (MCS) para la clonación y expresión de dos genes en el mismo vector. Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación por separado de los genes *lipgom* y *foldasa* y su posterior clonación en el MCS1 y en el MCS2 del vector, respectivamente.

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas BamHI y Sall (*lipgom*) y NdeI y XhoI (*foldasa*). En cuanto al vector, primeramente, se digirió con las enzimas BamHI y Sall y posteriormente se ligó al gen *lipgom* digerido (Figura 34). Finalmente se obtuvo la construcción pRSFDuet::LipGoM.

Con la construcción pRSFDuet::LipGoM se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se seleccionaron al azar seis clonas y se verificó la transformación por PCR.

El resultado de la prueba de PCR se muestra en la Figura 35. Todas clonas seleccionadas presentaron amplificación del inserto de interés de aproximadamente 960 pb. Se seleccionó una de las clonas y se linealizó el plásmido pRSFDuet::LipGoM con las enzimas NdeI y XhoI (Figura 36) para la clonación de la foldasa.

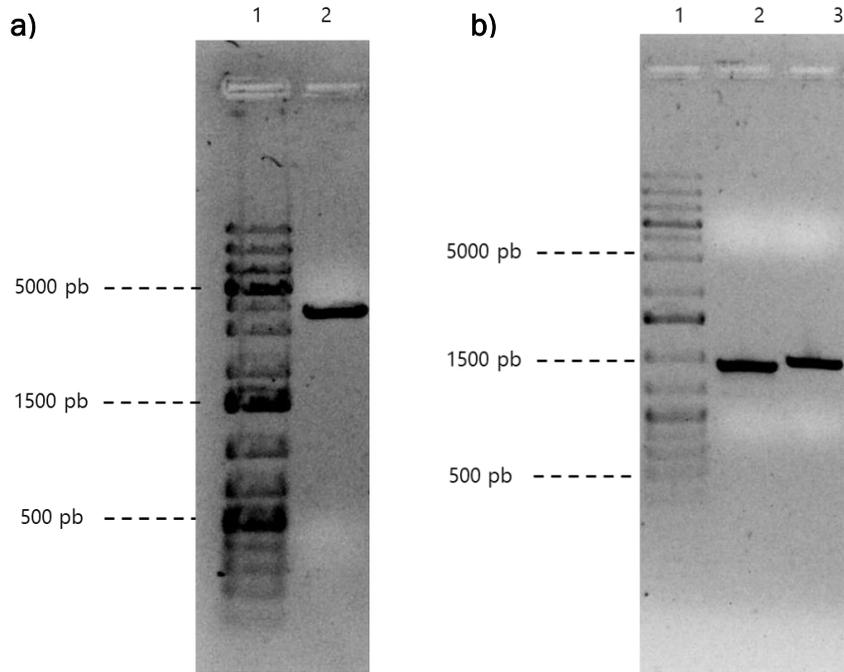


Figura 34. Digestión enzimática del plásmido pRSFDuet lineal y productos de PCR *lipgom* y *foldasa*. a) 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pRSFDuet lineal (3829 pb), b) 1: marcador de peso molecular, 2: gen *lipgom* (960 pb), 3: producto de PCR del gen *foldasa* (1036 pb).

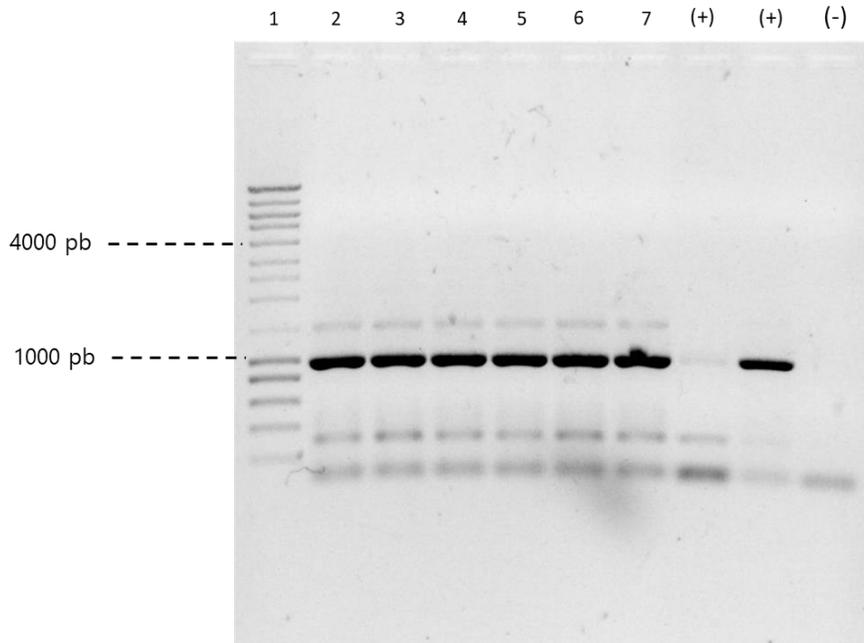


Figura 35. Tamizaje de clonas pRSFDuet::LipGoM para el gen *lipgom*. Amplificación del gen *lipgom* (960 pb). 1: marcador de peso molecular, 2-7: clonas pRSFDuet::LipGoM.

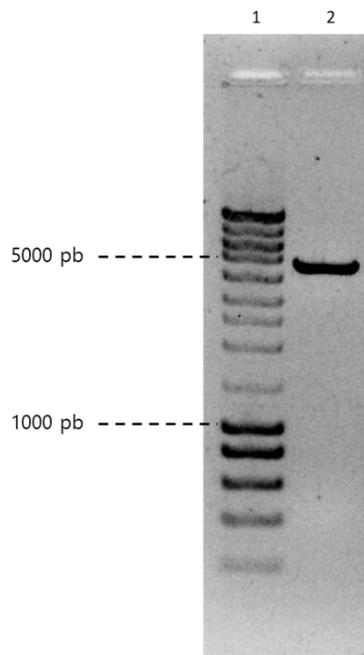


Figura 36. Plásmido pRSFDuet::LipGoM lineal.  
1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pRSFDuet::LipGoM lineal (4789 pb).

El gen *foldasa* previamente digerido se ligó al plásmido pRSFDuet::LipGoM en el MCS2 del vector. Con la construcción obtenida (pRSFDuet::LipGoM::Foldasa) se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron al azar ocho clonas para corroborar la clonación por PCR.

El resultado de la prueba de PCR se muestra en la Figura 37. En dos de las ocho clonas seleccionadas se observó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000 pb que corresponde al tamaño esperado de 1036 pb para el gen *foldasa*.

Con la construcción pRSFDuet::Lip2::Foldasa se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21 para la sobreexpresión. La transformación se verificó con una doble digestión con las enzimas NdeI y XhoI para liberar el gen de la foldasa del plásmido pRSFDuet::LipGoM (Figura 38). Tras la digestión se observaron dos bandas, una de casi 5,000 pb que corresponde al tamaño de la construcción pRSFDuet::LipGoM de 4,798 pb y otra de 1000 pb que corresponde al gen *foldasa* (1036 pb).

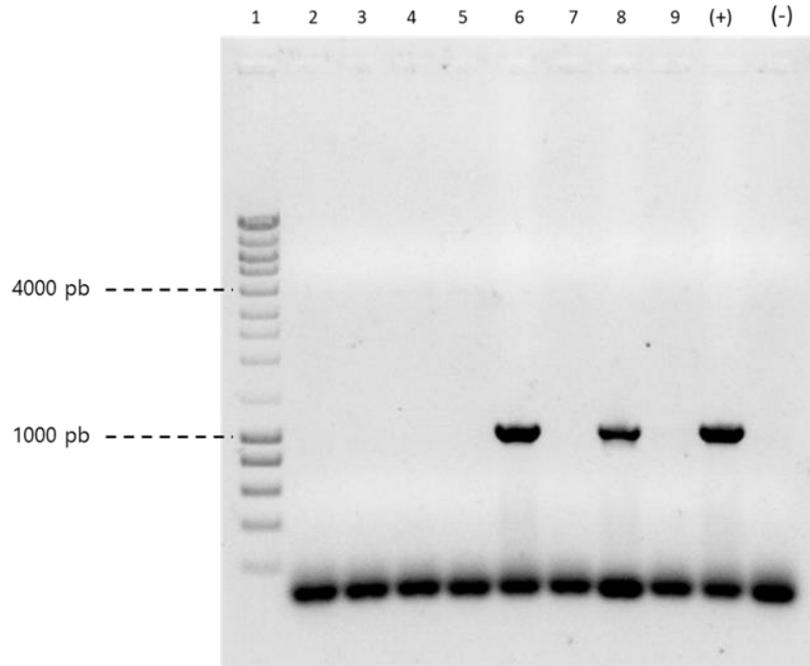


Figura 37. Tamizaje de clonas pRSFDuet::LipGoM para el gen *foldasa*. Amplificación del gen *foldasa* (1036 pb). 1: marcador de peso molecular, 2-9: clonas pRSFDuet::LipGoM::Foldasa.

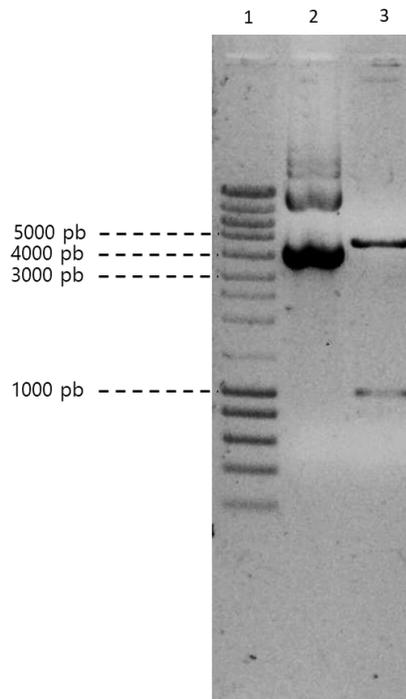


Figura 38. Doble digestión enzimática del plásmido pRSFDuet::LipGoM::Foldasa. 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido sin digerir, 3: plásmido digerido, pRSFDuet::LipGoM (4,798 pb) y gen *foldasa* (1036 pb).

Después de comprobarse la clonación de los genes *lipgom* y *foldasa* en el plásmido pRSFDuet, la clona correspondiente y la clona con el plásmido vacío (como control negativo) se sembraron en LB-modificado con tricaprilina al 1%. Después de 3 días de incubación a 30°C y 2 días a 4°C, se observó un halo de hidrólisis en la clona pRSFDuet::LipGoM::Foldasa, mientras que, la clona con el plásmido vacío no presentó halo (Figura 39). Con este experimento se determinó que la lipasa que se estaba expresando era activa.

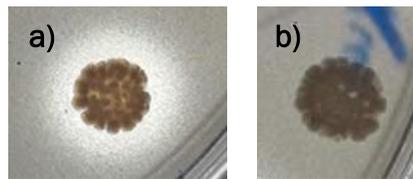


Figura 39. Prueba de actividad en el medio LB-modificado con tricaprilina al 1%. a) Clona *E. coli* BL21 pRSFDuet::LipGoM::Foldasa, b) Clona *E. coli* BL21 pRSFDuet vacío.

Se prosiguió a realizar una prueba de inducción para verificar la expresión soluble de la lipasa. Se mantuvo un crecimiento a 37°C hasta una  $D.O_{600nm}$  de 0.6 y se realizó la inducción con 0.5 mM de IPTG a 30°C durante 3 h.

Para verificar la expresión de las proteínas se realizó un SDS-PAGE (Figura 40). Se esperaba observar dos bandas de proteínas sobreexpresadas en la fracción soluble de la clona pRSFDuet::LipGoM::Foldasa cercanas a 35 kDa, para la foldasa 37.8 kDa y para la lipasa 33.2 kDa, sin embargo, solamente se observó la proteína de mayor peso, la cual, se dedujo que era la foldasa. En cuanto a la lipasa, no se observó ni en la fracción soluble ni en la insoluble.

Esperando mejorar la expresión de la lipasa, se realizó una prueba de inducción a 18°C con 0.5 mM de IPTG durante 20 h (Figura 41). A pesar de haber cambiado la temperatura de inducción tampoco se observó la expresión de la lipasa.

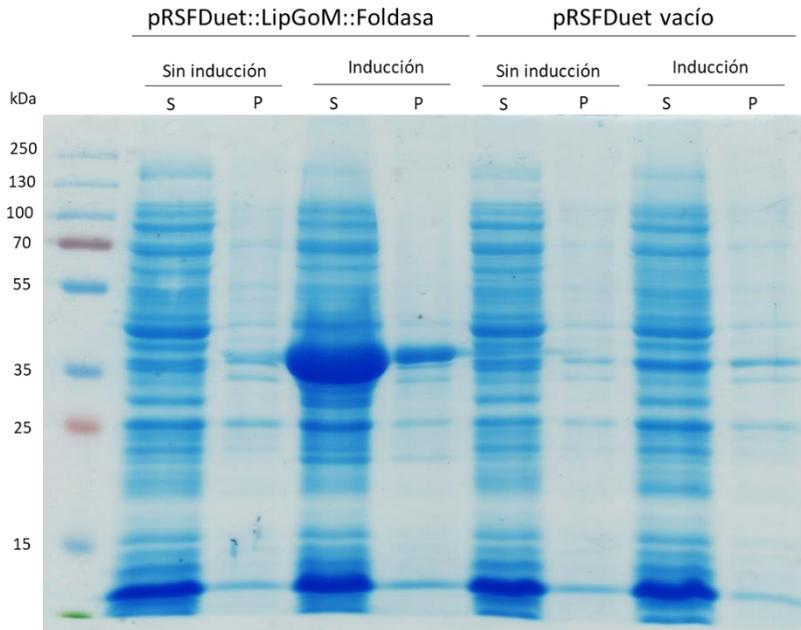


Figura 40. Expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa. Análisis SDS-PAGE al 12% de las fracciones solubles e insolubles de *E. coli* BL21 inducidas a 30 °C durante 3 h.

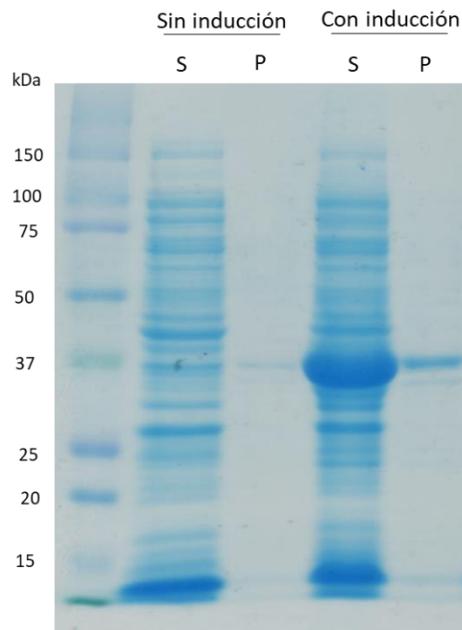


Figura 41. Prueba de expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa a 18 °C durante 20 h. S: sobrenadante, P: pellet.

Con los extractos obtenidos a partir de las dos condiciones de inducción se midió actividad enzimática con p-nitrofenil dodecanoato como sustrato. Únicamente fue posible detectar actividad en el extracto proveniente de la inducción a 18 °C, sin embargo, una vez más fue posible alcanzar valores de absorbancia comparables con la construcción pET28a::LipGoM::Foldasa hasta los 20 minutos de reacción, por lo que la cantidad de lipasa obtenida con el sistema de expresión dual pareció no ser suficiente para observar mejor actividad enzimática (Figura 42).

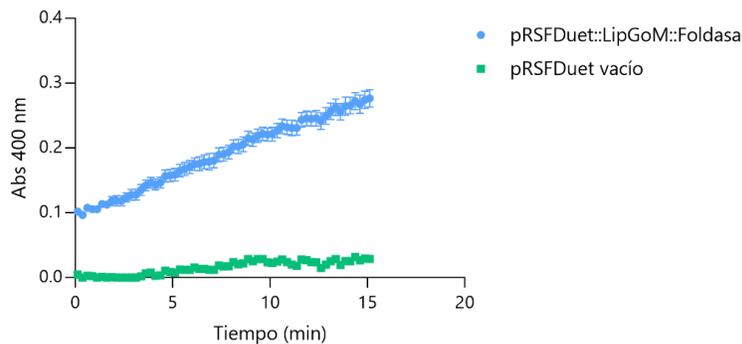


Figura 42. Actividad de LipGoM sobre p-nitrofenil dodecanoato.

Actividad medida a partir de extracto de proteína proveniente de una inducción a 18 °C de la clona pRSFDuet::LipGoM::Foldasa, se incluyó como control negativo la clona con el plásmido pRSFDuet vacío.

Para comprobar si se estaba expresando, se realizó un ensayo de Western Blot. El resultado se muestra en la Figura 43. Se incluyó como control positivo la enzima 1,2 catecol dioxigenasa (1,2 CDO) de *Pseudomonas stutzeri*, una enzima con la que se ha trabajado ampliamente en el laboratorio cuyo peso es de 34.7 kDa cercano al de la lipasa. Las mismas bandas que se detectaron en la clona con la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa también se detectaron en la clona con el plásmido vacío, tanto en la fracciones solubles como en las insolubles, por lo que se infirió que la banda cercana al peso esperado no era la lipasa. A diferencia de la expresión con las construcciones anteriores, la lipasa no se detectó en la fracción insoluble por lo que se prosiguió a realizar un Western Blot con la construcción obtenida previo a la clonación de la foldasa para verificar que el inserto clonado realmente permitía la expresión de la lipasa.

El resultado del Western Blot de la expresión solamente de la lipasa a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM se muestra en la Figura 44. Se observó el mismo patrón de bandas y tampoco fue posible detectar la lipasa en la fracción insoluble.

Para determinar si las bandas inespecíficas que se observaban correspondían a proteínas del propio hospedero y que no correspondían a la lipasa, ya que se observaban tanto en la clona con la construcción como en la clona que contenía el plásmido vacío, se realizó una prueba de PCR para la amplificación del gen *lipgom*.

El resultado de la prueba de PCR se muestra en la Figura 45. Se observó la amplificación del gen *lipgom* para la clona que contenía la construcción pRSFDuet::LipGoM pero no se observó amplificación cuando se utilizó el plásmido vacío como templado, tanto proveniente de *E. coli* BL21 como de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Con esta prueba se comprobó que la lipasa estaba clonada en la construcción pRSFDuet::LipGoM y no en el plásmido que se consideraba vacío. Se determinó que las bandas observadas eran inespecificidades.

Comprobada la clonación del gen *lipgom* aún existía la posibilidad de que la clonación no estuviera hecha correctamente, y que por esta razón no se observara expresión de la lipasa ni en la fracción insoluble como con las construcciones anteriores. Para elucidar si el gen estaba clonado en fase, el plásmido que tenía solamente clonada la lipasa se secuenció.

La secuenciación se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt UNAM. Los resultados de secuenciación se analizaron con el software MEGAX, que permite analizar datos de secuencias de ADN y proteínas. Se realizó un alineamiento de los resultados de la secuenciación con secuencia del gen *lipgom* y con la secuencia del plásmido pRSFDuet vacío para compararlas y determinar si el gen estaba clonado en fase.

Con fines prácticos el resultado del alineamiento se muestra en la Figura 46. La Figura 46a corresponde al alineamiento de los nucleótidos #55 al #98 del resultado de secuenciación con el plásmido pRSFDuet vacío, en color amarillo se resalta el codón ATG del plásmido que se encuentra después de la secuencia AAGGAG que es el sitio de unión al ribosoma. Por otro lado, en la Figura 46b se muestran los nucleótidos #77 al #162 del resultado de secuenciación, donde a partir del nucleótido #136 se observa el alineamiento con el gen *lipgom*. A partir de estos resultados se determinó que el gen de LipGoM sí estaba clonado en fase en el vector pRSFDuet, sin embargo, no se logró su expresión.

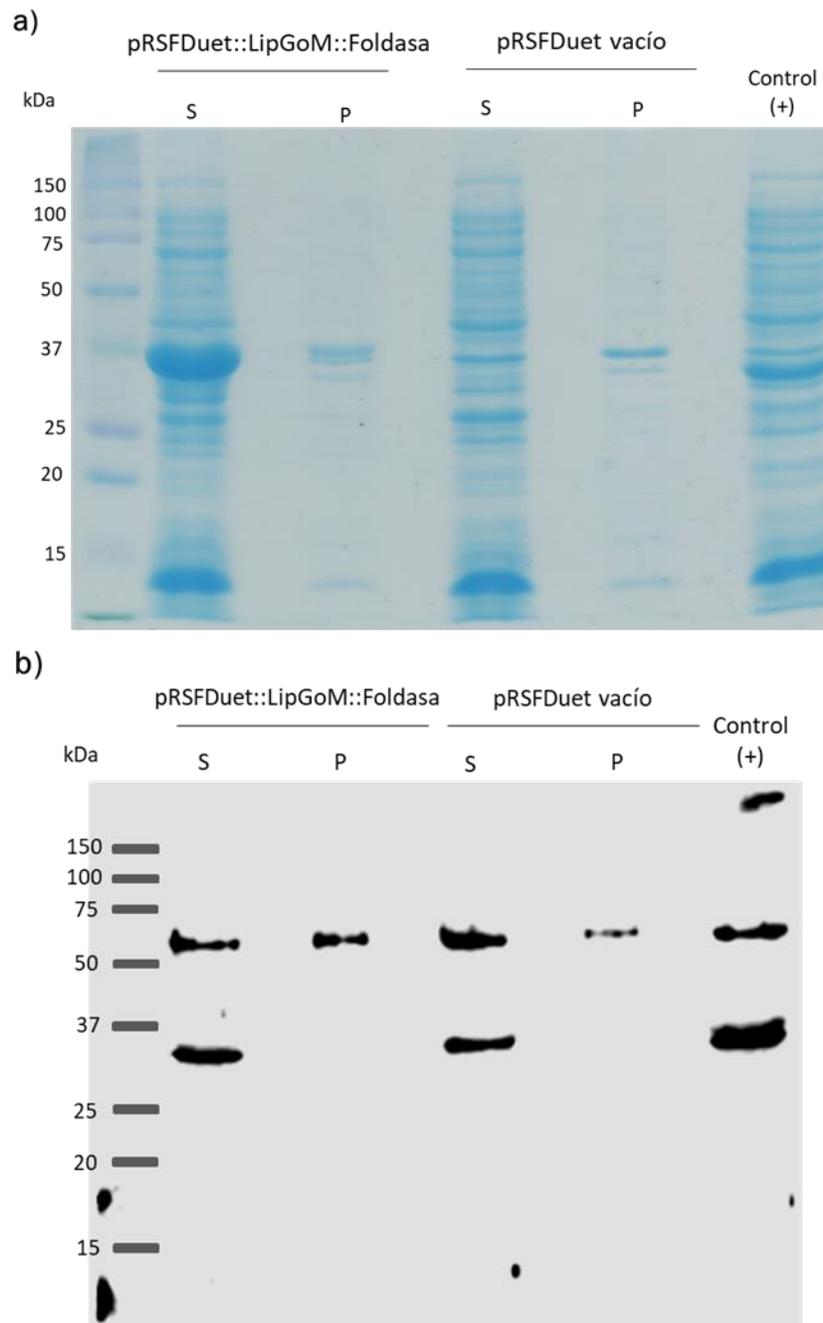


Figura 43. Expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM::Foldasa.  
a) Análisis SDS-PAGE al 12% y b) Western Blot. Lipasa: 33.2 kDa, 1,2 CDO: 34.7 kDa.

A pesar de que muchas proteínas se han expresado en *E. coli* BL21 (DE3) con niveles altos muy a menudo no se puede lograr una sobreproducción significativa debido a que la proteína de interés puede llegar a ser tóxica (Dumon-Seignovert, Cariot & Vuillard, 2004).

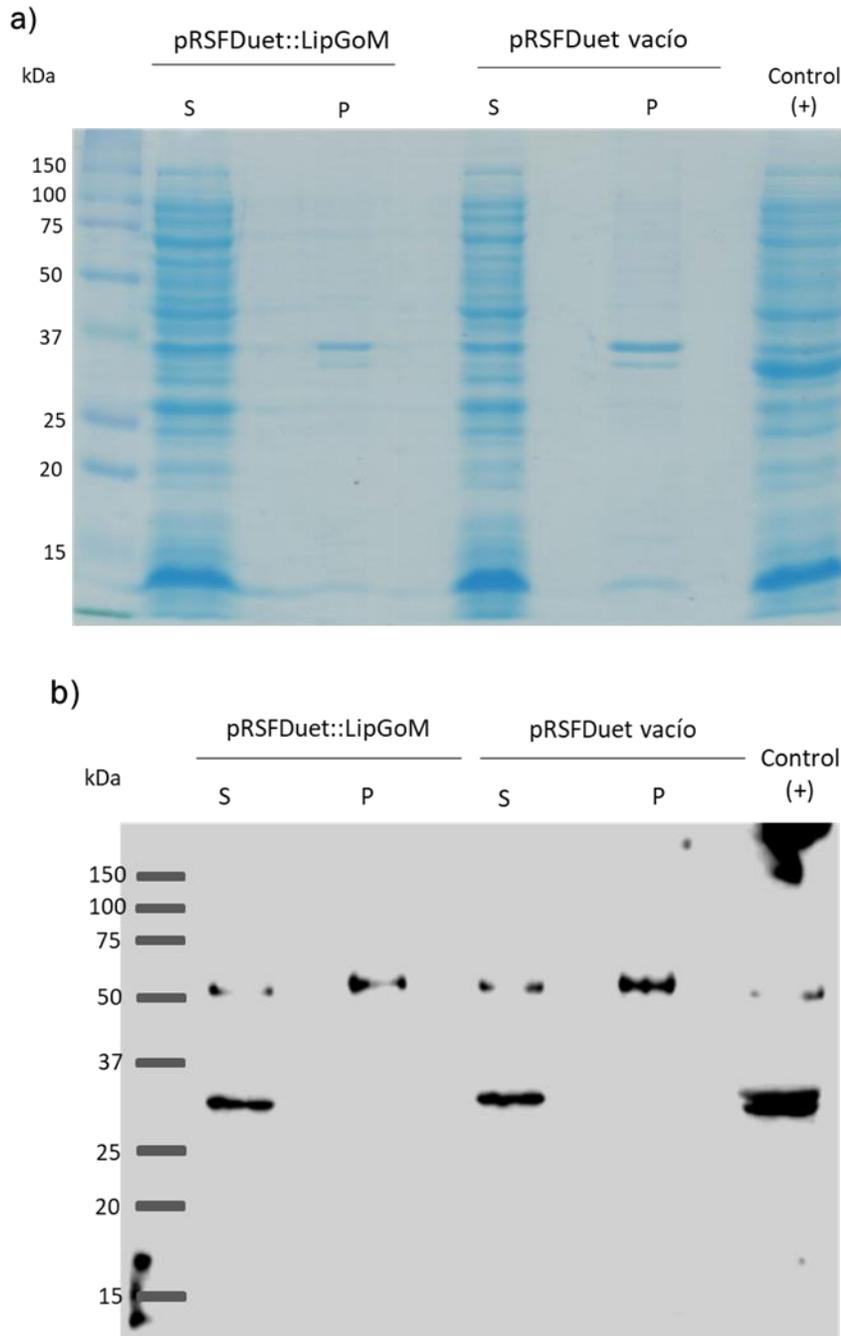


Figura 44. Expresión de LipGoM a partir de la construcción pRSFDuet::LipGoM.  
a) Análisis SDS-PAGE al 12% y b) Western Blot. Lipasa: 33.2 kDa, 1,2 CDO: 34.7 kDa.

En términos generales, cuando no se logra la producción heteróloga de una proteína o cuando hay tan baja producción que no se puede detectar mediante una técnica tan sensible como el Western Blot, el problema puede radicar en que la proteína ejerce un

efecto nocivo sobre el hospedero interfiriendo en la proliferación del microorganismo presentándose una tasa de crecimiento más lenta, una baja densidad celular y/o la muerte celular (Rosano & Ceccarelli, 2014). En cuanto al plásmido utilizado, dado que existe una producción basal mínima de ARN polimerasa T7, hay expresión antes de la inducción de la proteína de interés, por lo que, si la proteína es tóxica para el hospedero, provoca la muerte celular o la detención del crecimiento (Francis & Page, 2010). Por lo anterior, es posible que la proteína LipGoM ejerciera un efecto negativo sobre las células de *E. coli* BL21 ya que el crecimiento previo a la inducción era más lento comparado con la clona con el plásmido vacío.

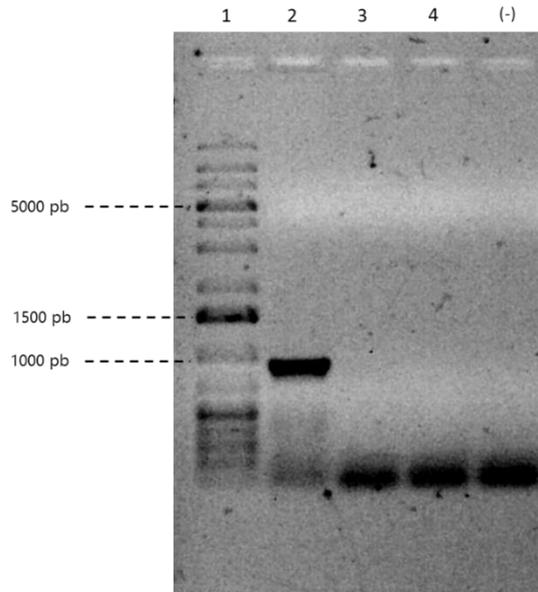


Figura 45. Amplificación del gen LipGoM.

1: marcador de peso molecular, 2: Clona pRSFDuet::LipGoM, 3: plásmido pRSFDuet vacío de *E. coli* BL21, 4: plásmido pRSFDuet vacío de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Gen *lipgom*: 960 pb.



membranas, participan en la degradación de proteínas y/o ayudan en su correcto plegamiento y ensamblaje. Las foldasas son un grupo de proteínas que asisten el correcto plegamiento de las proteínas (Bhatwa et al., 2021). Teniendo en cuenta la función natural de estas particulares proteínas, se consideró que si la lipasa LipGoM tenía su propia foldasa, ésta se podía agregar durante el proceso de lisis celular y durante la expresión para mejorar la solubilidad, como una alternativa al uso de un nuevo sistema de expresión.

Para llevar a cabo estos ensayos de solubilización *in vivo* se clonó el gen *foldasa* en el vector pET28a con los oligonucleótidos previamente diseñados. El producto de PCR y el plásmido pET28a se digirieron con las enzimas NdeI y XhoI (Figura 47). Posteriormente el producto de PCR se ligó al plásmido y se obtuvo la construcción pET28a::*Foldasa*.

Con la construcción obtenida se transformaron por electroporación células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De las clonas obtenidas se seleccionaron al azar 12 para verificar la clonación del gen de interés mediante pruebas de PCR. De las clonas seleccionadas solo tres presentaron amplificación del gen *foldasa* (1036 pb, figura 48).

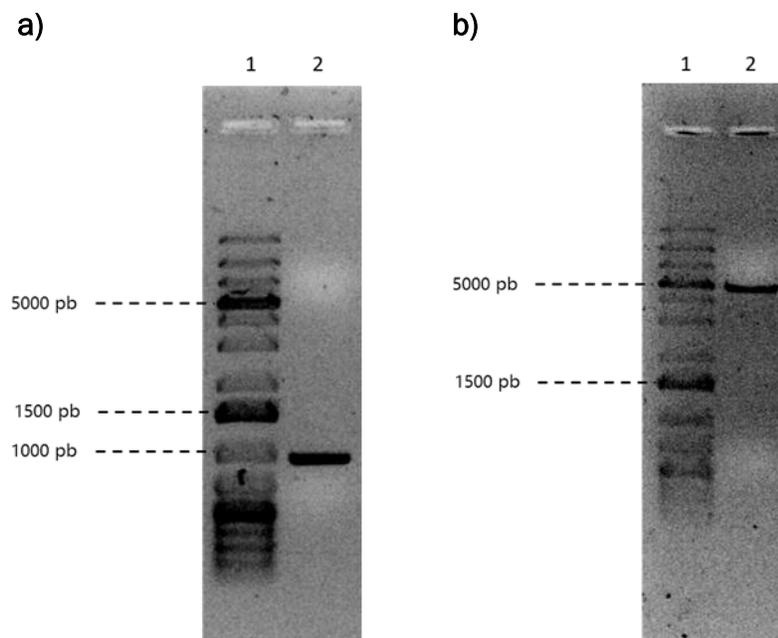


Figura 47. Gen *foldasa* y plásmido pET28a.

a) 1: marcador de peso molecular, 2: Producto de PCR del gen *foldasa* (1036 pb) digerido y purificado. b) 1: marcador de peso molecular, 2: plásmido pET28a lineal (5369 pb).

Posteriormente se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21 con la construcción pET28a::Foldasa para la sobreexpresión de la proteína.

Se realizó una prueba de inducción para verificar la expresión de la foldasa cultivando la clona de *E. coli* BL21 a 37 °C hasta una D.O<sub>600 nm</sub> de 0.8 y posteriormente se realizó la inducción a 37 °C durante 3 h con 0.5 mM de IPTG. El resultado de la expresión se verificó por SDS-PAGE y se observó la expresión de una proteína en el peso esperado de foldasa de 37.8 kDa (Figura 49). Se determinó que a partir de la construcción obtenida se expresan altos niveles de foldasa y que las condiciones de expresión se podían mejorar para obtener mayor cantidad de foldasa soluble ya que se observó alrededor del 50% de proteína soluble y 50% de proteína insoluble.

Considerando que con la construcción pET28a::LipGoM-Foldasa se obtenían altos niveles de lipasa insoluble, a partir de esta construcción se realizaron las pruebas de solubilización. El plásmido pET28a vacío se consideró como control.

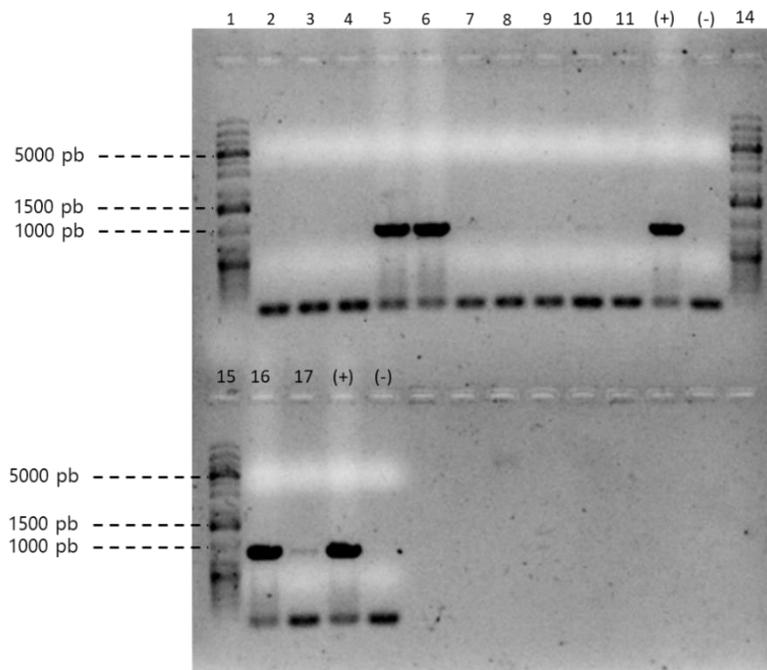


Figura 48. Tamizaje de clonas pET28a::Foldasa.

Productos de PCR para comprobar la clonación del gen foldasa en el plásmido pET28a. Prueba de PCR para verificar la clonación de la Foldasa. 1: marcador de peso molecular, 2-11: clonas; 14, 15: marcador de peso molecular; 16, 17: clonas. Gen foldasa:1036 pb.

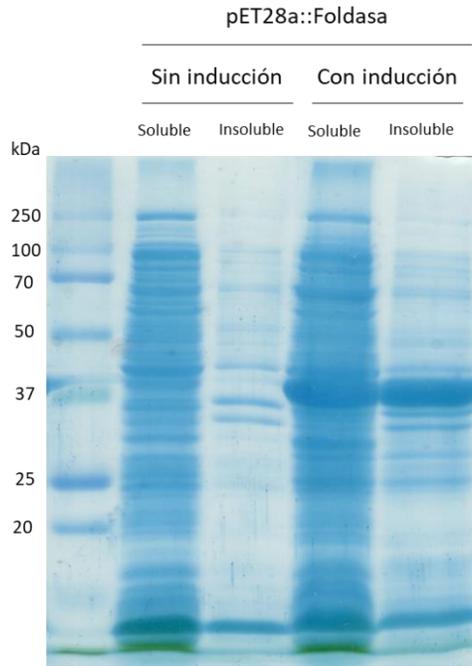


Figura 49. Expresión de la Foldasa.

Análisis SDS-PAGE al 12% para verificar la expresión de la foldasa (37.8 kDa) a partir de la construcción pET28a::Foldasa.

La primera prueba de solubilización se realizó a partir de las inducciones a 30°C y a 18°C de las proteínas LipGoM y Foldasa. Las clonas se mezclaron esperando que, al momento de realizar la ruptura celular, la foldasa ayudara a mejorar la solubilidad de la lipasa.

La segunda prueba consistió en cultivar juntas las clonas pET28a::LipGoM-Foldasa y pET28a::Foldasa esperando mejorar así la solubilización de la lipasa. La inducción se realizó a 18°C.

Los resultados de las pruebas de solubilización se analizaron mediante SDS-PAGE. Ninguna de las condiciones probadas permitió incrementar la cantidad de lipasa soluble. Además, a 18°C no fue posible observar una cantidad considerable de foldasa expresada, sin embargo, se encontró que a 30°C la foldasa obtenida era en su mayoría soluble a diferencia de cuando la inducción se realizó a 37°C.

En la Figura 50 se muestran por un lado los resultados de la expresión a 30°C, en los que se observa la mejora en la solubilidad de la foldasa, y por otro lado se muestran los resultados de la primera prueba de solubilización; que consistió en mezclar las clonas

pET28::LipGoM-Foldasa y pET28a::Foldasa, donde la foldasa se encuentra en la fracción soluble pero la lipasa continúa en la fracción insoluble.

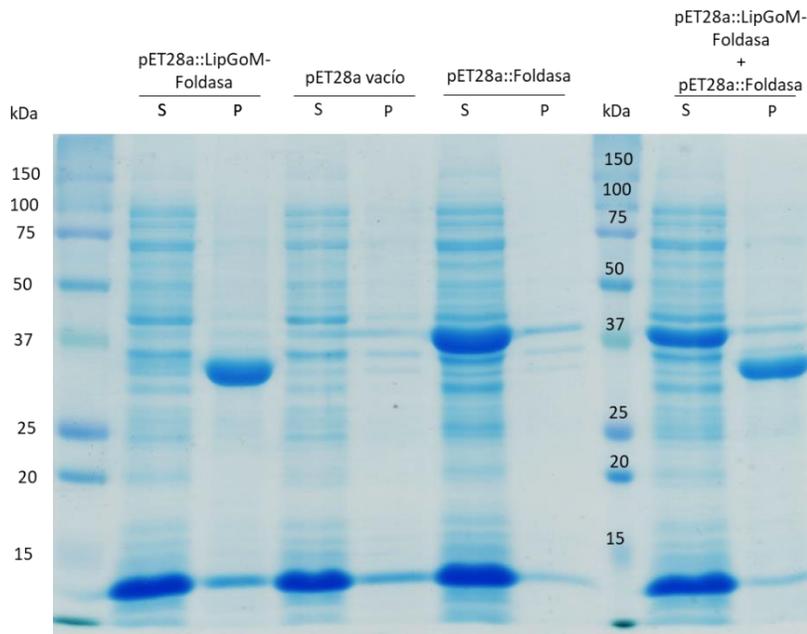


Figura 50. Pruebas de solubilización *in vitro*.

Análisis SDS-PAGE al 12% de las inducciones a 30 °C de las clonas pET28a::LipGoM-Foldasa, pET28a vacío y pET28a::Foldasa, y de la prueba de solubilización pET28a::LipGoM-Foldasa+pET28a::Foldasa. S: sobrenadante, P: pellet.

Las pruebas de solubilización *in vitro* no funcionaron para mejorar la obtención soluble de la lipasa, sin embargo, de todas las estrategias implementadas la única que permitió incrementar la cantidad de lipasa obtenida, suficiente para medir actividad enzimática, fue la de realizar la inducción de la construcción pET28a::LipGoM-Foldasa a una D.O<sub>600nm</sub> de 1.5, con 0.1 mM de IPTG, a 18 °C durante toda la noche. Para continuar con los objetivos para el desarrollo de este trabajo, fue a partir de esta construcción y bajo las condiciones de crecimiento e inducción mencionadas que se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la lipasa LipGoM.

### 8.9 Caracterización bioquímica de la lipasa LipGoM

Se han estudiado las propiedades de lipasas crudas y purificadas a diferentes condiciones de pH, temperatura, en presencia de iones metálicos, solventes orgánicos, entre otros, para determinar su potencial biotecnológico (Rasmey *et al.*, 2017).

La caracterización de la lipasa LipGoM se llevó a cabo sobre distintos sustratos, valores de pH y temperatura. Se cuantificó la actividad enzimática del extracto de proteína obtenido como el sobrenadante después de la sonicación de la biomasa celular y la centrifugación correspondiente.

### 8.9.1 Especificidad de sustrato

La especificidad de sustrato de LipGoM se estudió con p-nitrofenil ésteres (p-NPCn) de diferente longitud de cadena carbonada como sustrato. Se incluyó la clona con el plásmido pET28a vacío como control para contrarrestar el efecto de las proteínas de *E. coli* BL21 presentes en el extracto que pudieran hidrolizar los sustratos.

Como se muestra en la Figura 51, LipGoM presentó una amplia especificidad de sustrato, siendo preferentemente hidrolizados los ésteres de cadena carbonada mediana y larga. La actividad sobre p-nitrofenil dodecanoato (C12) fue mayor comparada con los otros ésteres.

Las actividades relativas sobre pNPC4, pNPC5, pNPC8, pNPC10, pNPC14, pNPC16 y pNPC18, fueron 8.9%, 24.8%, 65%, 64%, 86.5%, 75.5% y 46.7%, respectivamente.

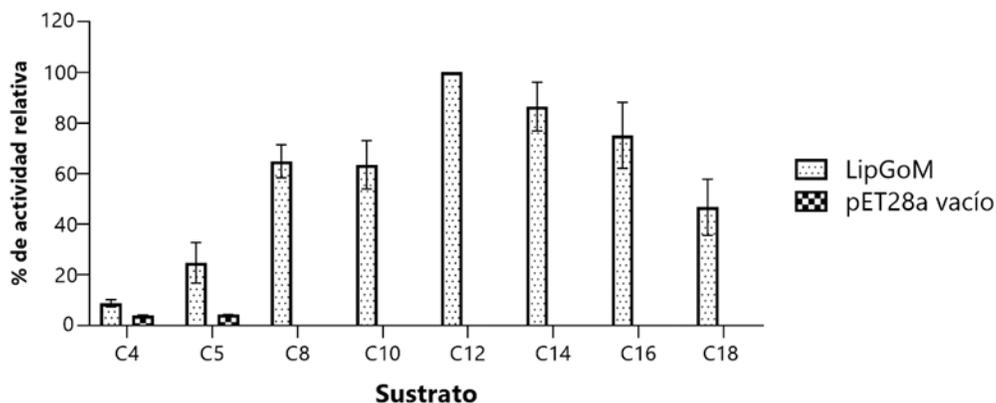


Figura 51. Especificidad de sustrato de LipGoM.

La especificidad de sustrato de LipGoM difiere de la especificidad reportada de otras lipasas de *Pseudomonas*. Por un lado, las lipasas de *P. reinekei* (H1), *P. fluorescens* JCM5963, *Pseudomonas* sp. TK-3 y la lipasa F1 de *P. monteilii* TKU009 mostraron su máxima actividad sobre p-NPC8 (Priyanka et al., 2019; Zhang et al., 2009; Tanaka et al.,

2012; Wang *et al.*, 2008), mientras que la lipasa de *Pseudomonas sp.* YY31 mostró su máxima actividad sobre p-NPC10 (Yamashiro *et al.*, 2013) y la lipasa F2 de *P. monteilii* TKU009 mostró su máxima actividad sobre p-NPC14 (Wang *et al.*, 2008). Por otro lado, las lipasas de *P. aeruginosa* CS-2, *P. aeruginosa* LX1, *P. aeruginosa* PseA, *P. fluorescens* AK102 y *Pseudomonas sp.* DMVR46 mostraron su máxima actividad sobre p-NPC16 (Peng, Lin & Wei, 2009; Ji *et al.*, 2010; Gaur, Gupta & Khare, 2008; Kojima, Yokoe & Mase, 1994; Patel, Nambiar & Madamwar, 2014).

En cuanto al amplio rango de actividad sobre sustratos de diferente tamaño, en 2008 Yapaşan reportó la caracterización de una lipasa de una cepa de *Pseudomonas* que presentó actividad sobre p-NPC12, sin embargo, no presentó actividad sobre sustratos de cadena más larga y solo presentó el 50% de actividad sobre p-NPC10 (Yapaşan, 2008). Se determinó que esta lipasa no presenta amplia especificidad de sustrato como LipGoM.

La lipasa de *P. pseudoalcaligenes* F-111 también presentó su actividad máxima en p-NPC12, sin embargo, presenta distintas actividades comparadas con LipGoM, ya que presenta el 47% y el 10% de actividad sobre sustratos más largos, p-NPC16 y p-NPC18, respectivamente (Lin *et al.*, 1996), mientras que LipGoM presenta el 75% y el 46% de actividad sobre los mismos sustratos, respectivamente. La actividad enzimática de LipGoM no se reduce de la misma manera que la lipasa de *P. pseudoalcaligenes* F-111 con el aumento de la longitud de la cadena del sustrato.

Teniendo en cuenta que el p-NPC12 fue el sustrato sobre el que LipGoM presentó mayor actividad, se realizaron los demás experimentos de caracterización utilizando este sustrato.

### 8.9.2 pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad de LipGoM se estudió con distintos sistemas amortiguadores desde 5.0 a 12.0 (Dobrev *et al.*, 2012).

Por lo general, las lipasas de *Pseudomonas* presentan un pH óptimo neutro o alcalino (Rios *et al.*, 2018). LipGoM presenta un pH óptimo de 11.0, sin embargo, también presenta actividad a otros pH alcalinos (Figura 52).

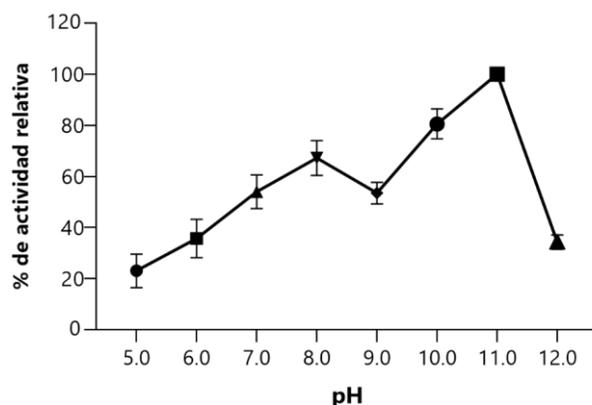


Figura 52. pH óptimo de LipGoM.

Comparada con otras lipasas designadas como alcalinas, LipGoM resulta tener actividad a pH más alcalino que la mayoría. En la Tabla 33 se enlista y compara el pH óptimo de lipasas alcalinas de diferentes *Pseudomonas* respecto a LipGoM.

Tabla 33. pH óptimo de lipasas alcalinas de *Pseudomonas*.

| Fuente de la lipasa alcalina          | pH óptimo | Referencia                      |
|---------------------------------------|-----------|---------------------------------|
| <i>P. fluorescens</i> AK102           | 8.0-10.0  | Kojima, Yokoe & Mase, 1994      |
| <i>Pseudomonas</i> sp. DMVR46         | 8.5       | Patel, Nambiar & Madamwar, 2014 |
| <i>P. mendocina</i> PK-12CS           | 8.0       | Jinwal et al., 2003             |
| <i>P. pseudoalcaligenes</i> F-111     | 6.0-10.0  | Lin et al., 1996                |
| <i>P. aeruginosa</i> CS-2             | 8.0       | Peng, Lin & Wei, 2009           |
| <i>P. aeruginosa</i> JCM5962 (T)      | 8.0       | Sachan, Iqbal & Singh, 2018     |
| <i>P. aeruginosa</i> HFE733           | 8.5       | Hu et al., 2018                 |
| <i>P. fluorescens</i> NS2W            | 9.0       | Kulkarni & Gadre, 2002          |
| <i>P. aeruginosa</i>                  | 9.0       | Goswami & Sharma, 2017          |
| <i>P. aeruginosa</i>                  | 11.0      | Karadzic et al., 2006           |
| <i>Pseudomonas</i> sp.                | 11.0      | Rati et al., 2000               |
| <b><i>P. alcaligenes</i> (LipGoM)</b> | 11.0      | Este trabajo                    |

Después de haber determinado el pH óptimo de la enzima, se determinó su temperatura óptima a pH 11.0.

### 8.9.3 Temperatura óptima

La actividad de LipGoM se midió a varias temperaturas y se encontró la actividad máxima a 55 °C (Figura 53). Además, presentó alrededor del 70% de la actividad máxima a 55 °C en un rango de temperatura de 35-60 °C.

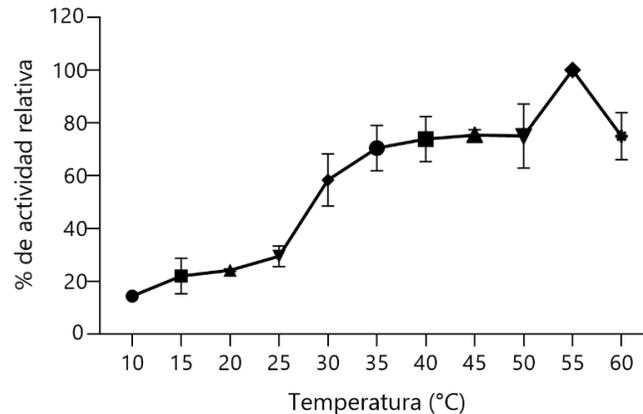


Figura 53. Temperatura óptima de LipGoM.

Las lipasas de *Pseudomonas* tienen actividades a temperaturas variadas y se pueden considerar como lipasas psicrófilas, mesófilas y termófilas dependiendo de su temperatura óptima de trabajo, por lo que LipGoM se podría considerar como una lipasa termofila (Rasmey *et al.*, 2017).

Entre las lipasas con actividad óptima a temperaturas moderadamente altas se encuentran las lipasas de *P. aeruginosa* LX1, *P. monteilii* TKU009, *P. aeruginosa* PseA, *P. aeruginosa* HFE733 y *P. pseudoalcaligenes* F-111 con una temperatura óptima a 40 °C (Ji *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008; Gaur, Gupta & Khare, 2008; Hu *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 1996).

En cuanto a las lipasas con actividad óptima a temperaturas más altas se encuentran por un lado las lipasas de *P. aeruginosa* CS-2 y *P. aeruginosa* JCM5962 (T) cuya temperatura óptima se ha reportado a 50 °C (Peng, Lin & Wei, 2009; Sachan, Iqbal & Singh, 2018) y, por otro lado, la lipasa de *Pseudomonas* sp. que tiene su actividad óptima a 60 °C mientras que la lipasa de una cepa de *P. aeruginosa* a presenta su actividad óptima a 70 °C (Noormohamadi *et al.*, 2013; Karadzic *et al.*, 2006).

Al igual que LipGoM, las lipasas de *P. fluorescens* AK102, *P. aeruginosa* LP602 y *P. fluorescens* JCM5963 presentaron su actividad máxima a 55 °C (Kojima, Yokoe & Mase, 1994; Dharmsthiti & Kuhasuntisuk, 1998; Zhang *et al.*, 2009).

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática resulta complejo ya que dos procesos de acción contraria son responsables de este comportamiento. A medida que aumenta la temperatura, aumenta la tasa de movimiento molecular y, por lo tanto, la velocidad de reacción, pero al mismo tiempo se produce una inactivación progresiva provocada por la desnaturalización de la enzima ya que su estructura tridimensional es termosensible y se desestabiliza a altas temperaturas. La desnaturalización es un proceso que se opone a la aceleración de la velocidad de reacción y es responsable del declive de esta velocidad a alta temperatura, por lo que puede en realidad observarse una temperatura aparente. Como la desnaturalización térmica depende del tiempo, es importante tener en cuenta la estabilidad térmica de una enzima (Robinson, 2015; Bisswanger, 2012).

#### 8.9.4 Termoestabilidad

La temperatura a la que la desnaturalización de una enzima se vuelve significativa varía de una a otra, pero normalmente es insignificante por debajo de los 30 °C y empieza a ser apreciable por encima de 40 °C (Robinson, 2015). La termoestabilidad de LipGoM se determinó incubando la enzima a diferentes tiempos a temperaturas desde 40 °C hasta 65 °C y a 70 °C y 80 °C.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de LipGoM después de 2 h de incubación a las distintas temperaturas probadas se muestra en la Figura 54a. Al observarse que LipGoM aún retenía el 80% de actividad después de 2 h a 60 °C se hizo el seguimiento durante más tiempo hasta las 5 h y 12 h de incubación (Figura 54b).

A pesar de que LipGoM presentó su máxima actividad a 55 °C, la actividad se disminuyó a 46% después de 15 min de incubación a esta temperatura, sin embargo, resultó termoestable a 60 °C ya que después de 2 h mostró una actividad residual del 80%, no obstante, después de 5 h y 12 h solo mostró 30% y 12%, respectivamente.

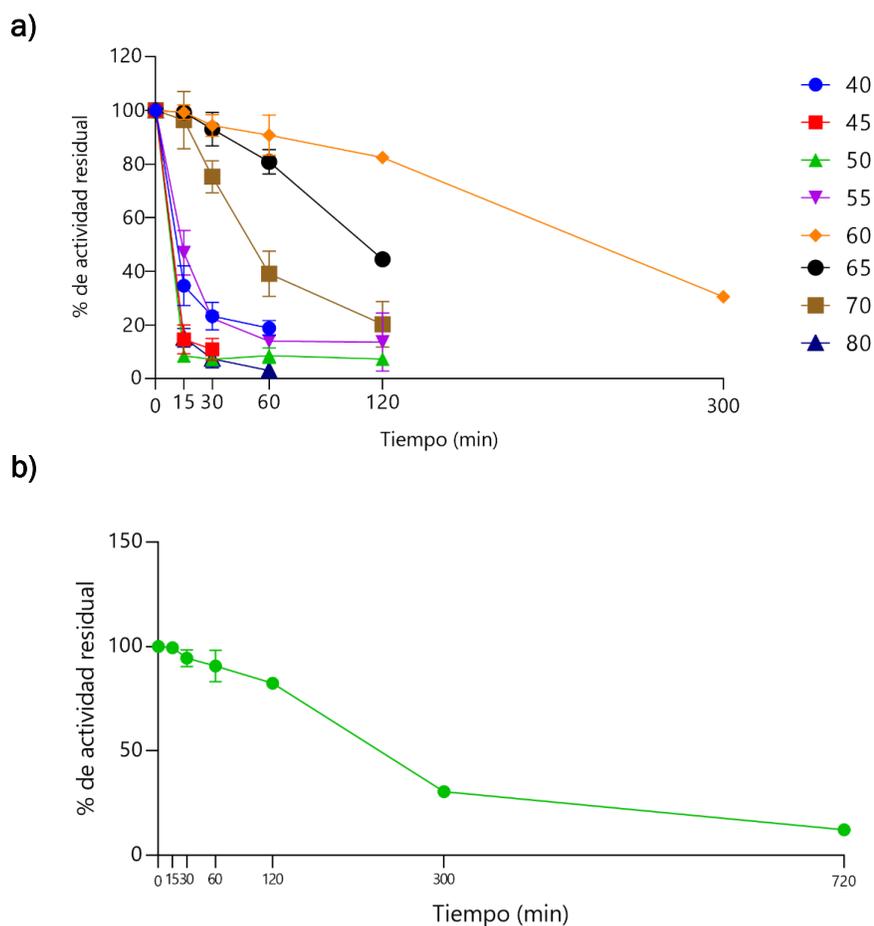


Figura 54. Termoestabilidad de LipGoM.

La termoestabilidad de LipGoM con respecto a otras lipasas con temperatura óptima a 55 °C resulta diferente. La lipasa de *P. aeruginosa* LP602 mantuvo el 50 % de actividad después de 2 h a 55 °C y el 40% después de 30 min a 60 °C (Dharmstithi & Kuhasuntisuk, 1998), en cuanto a la lipasa de *P. fluorescens* JCM5963, esta mantuvo una actividad superior a 75% después de 1 h a 60 °C (Zhang *et al.*, 2009), y la lipasa de *P. fluorescens* AK102 mantuvo una actividad de 90% después de 1 h a 60 °C (Kojima, Yokoe & Mase, 1994).

Considerando la estabilidad térmica de LipGoM a 60 °C, esta lipasa también podría catalogarse como termoestable.

### 8.9.5 Potencial biotecnológico

La lipasa LipGoM podría ser utilizada como una enzima a granel. Estas enzimas que no se requieren en un alto grado de pureza y a menudo se comercializan como preparaciones crudas de medio de cultivo que además de contener los componentes del medio, pueden estar presentes organismos enteros o fragmentados y por su puesto la enzima de interés (Robinson, 2015).

Considerando las características bioquímicas de LipGoM que incluyen actividad sobre sustratos de cadena mediana y larga, pH óptimo de 11.0, temperatura óptima a 55°C y alta termoestabilidad a 60°C, resulta una potencial candidata para aplicaciones en detergentes ya que cumple parcialmente los requisitos esenciales para su uso en este campo al degradar estructuras lipídicas, ser activa en pH alcalino y térmicamente estable (Alabdall et al., 2021).

Por otro lado, también es potencialmente aplicable en el tratamiento de agua con contenido lipídico. Estudios previos con preparaciones de lipasas crudas o parcialmente purificadas para el tratamiento de aguas residuales han sido utilizadas con éxito (Nimkande, 2022).

Entre las diversas aplicaciones de las lipasas del género *Pseudomonas* se encuentra el tratamiento de aguas residuales. Tal es el caso de la lipasa cruda de *P. aeruginosa* LP602. Dharmsthiti y Kuhasuntisuk realizaron experimentos en los que se añadió la lipasa cruda a aguas residuales, de restaurantes, ricas en lípidos, y encontraron que el contenido lipídico se redujo en un 70% durante las primeras 24 h, y a las 48 h ya no fue posible detectar tales compuestos (Dharmsthiti & Kuhasuntisuk, 1998).

## 9. CONCLUSIONES

- Se logró la clonación y expresión del gen *lipgom* sin péptido señal, sin embargo, contrario a lo que se esperaba, no fue posible obtener a la lipasa LipGoMΔSP mayoritariamente soluble.
- Se utilizó el hospedero *E. coli* SHuffle® T7 para mejorar la expresión citoplasmática de LipGoMΔSP, sin embargo, ésta solo se recuperaba de forma siendo insoluble.
- Entre las condiciones de inducción probadas se encontró que la obtención soluble de la lipasa con y sin péptido señal mejoró significativamente al inducir hasta alcanzar una  $D.O_{600nm}$  de 1.5 a 30 °C, con 0.1 mM de IPTG, a 18 °C durante 20 h, ya que incluso fue posible su detección por Western Blot.
- Como alternativa a la remoción del péptido señal de la lipasa, se utilizó un sistema de expresión dual esperando tener una expresión equimolar de la lipasa y su foldasa específica a través del que se logró la expresión de la foldasa, pero no fue posible la expresión de la lipasa en las células de *E. coli* BL21 a pesar de estar clonado en fase el gen correspondiente.
- Se clonó por separado el gen de la foldasa y se realizaron pruebas de solubilización agregando foldasa a la lipasa insoluble, sin embargo, esto tampoco mejoró su recuperación soluble.
- La caracterización bioquímica de LipGoM se realizó con extractos de proteína en los que se encontró que había lipasa soluble altamente activa.
- LipGoM presentó preferencia por sustratos acilo de cadena mediana y larga.
- LipGoM tiene un pH óptimo de 11.0 y una temperatura óptima de 55 °C.
- LipGoM presentó una alta termoestabilidad a 60 °C reteniendo un 82% de actividad después de 2 h de incubación a esta temperatura.
- Por sus características bioquímicas LipGoM podría tener aplicación en el campo de los detergentes o en el tratamiento de aguas residuales.

## 10. PERSPECTIVAS

Dadas las características bioquímicas que se encontraron de la lipasa LipGoM de *P. alcaligenes*, para tener una mayor certeza de su aplicabilidad como aditivo a detergentes o en el tratamiento de aguas residuales, por un lado, se podrían realizar ensayos de actividad y estabilidad en presencia de detergentes no iónicos o/y detergentes comerciales y, por otro lado, se podría probar la actividad directamente sobre aceites o grasas para determinar su capacidad degradativa.

El sistema de expresión dual podría probarse en otros hospederos que sí permitan la expresión de la lipasa, o se podría utilizar otro de vector de expresión dual, ya que obtener a LipGoM de forma pura sigue siendo un reto y es necesario purificarla para caracterizarla a nivel estructural y funcional.

## 11. LITERATURA REVISADA

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Akbari, N., Khajeh, K., Rezaie, S., Mirdamadi, S., Shavandi, M., & Ghaemi, N. (2010). High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of active recombinant enzyme through in vitro refolding. *Protein expression and purification*, 70(1), 75-80.
- Alabdall, A. H., Al-Anazi, N. A., Aldakheel, L. A., Amer, F. H., Aldakheel, F. A., Ababutain, I. M., ... & Al-Khaldi, E. M. (2021). Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. *Scientific reports*, 11(1), 1-10.
- Alnoch, R. C., Stefanello, A. A., Martini, V. P., Richter, J. L., Mateo, C., de Souza, E. M., ... & Krieger, N. (2018). Co-expression, purification and characterization of the lipase and foldase of *Burkholderia contaminans* LTEB11. *International journal of biological macromolecules*, 116, 1222-1231.
- Arpigny, J. L., & Jager, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical journal*, 343(1), 177-183.
- Bansal, S., Gunjan, G., & Ojha, S. (2014). Industrial enzyme production. *Industrial enzymes trends, scope and relevance*, 15-32.
- Beygmoradi, A., & Homaei, A. (2017). Marine microbes as a valuable resource for brand new industrial biocatalysts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 131-152.
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 65.
- Bhatia, S., Naved, T., & Sardana, S. (2018). *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*, Volume 2.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
- Buchholz, K., & Bornscheuer, U. T. (2017). Enzyme technology: history and current trends. *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, 13-46.
- Buchholz, K., Kasche, V., & Bornscheuer, U. T. (2012). *Biocatalysts and enzyme technology*. John Wiley & Sons.
- Buchner, E. (1897). Alkoholische garung ohne hefezellen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 30(1), 1110-1113.

Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.

Chung, H. J., Bang, W., & Drake, M. A. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(3), 52-64.

Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, 13(4), 1925-1965.

Dharmsthiti, S., & Kuhasuntisuk, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 75-80.

Díaz, A. P., & Pena, A. (2004). *Bioquímica*. Editorial Limusa.

Dobrev, G., Zhekova, B., Nedelcheva, P., Chochkov, R., & Krastanov, A. (2011). Characterization of crude lipase from *Rhizopus arrhizus* and purification of multiplicity forms of the enzyme. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 2295-2300.

El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K. E., & Tommassen, J. (1999). Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Molecular and general genetics MGG*, 261(4), 770-776.

Filho, D.G., Silva, A. G., & Guidini, C. Z. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7399-7423.

Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science*, 61(1), 5-24.

Gaur, R., Gupta, A., & Khare, S. K. (2008). Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, 43(10), 1040-1046.

Glogauer, A., Martini, V. P., Faoro, H., Couto, G. H., Müller-Santos, M., Monteiro, R. A., ... & Krieger, N. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial cell factories*, 10(1), 1-15.

González, A., & Fillat, M. F. (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de educación Bioquímica*, 37(1), 14-27.

Goswami, V. K., & Sharma, J. G. (2017). An intermediate temperature stable, extracellular and alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* and its application in biodiesel production. *Asian Journal of Applied Science and Technology*, 1(7), 104-115.

Grant, G. (2022) *Molecular Principles, Components, Technology, and Concepts: Proteins – Isolation/Purification of Proteins*, Reference Module in Life Sciences. Elsevier.

Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781.

Hames, D., Hooper, N. (2014). *Bios. Notas Instantáneas de Bioquímica*. McGraw-Hill.

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39(2), 235-251.

Hausmann, S., & Jaeger, K. E. (2010). Lipolytic enzymes from bacteria. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.

Headon, D. R., & Walsh, G. (1994). The industrial production of enzymes. *Biotechnology advances*, 12(4), 635-646.

Hosseini, H., Al-Jabri, H. M., Moheimani, N. R., Siddiqui, S. A., & Saadaoui, I. (2022). Marine microbial bioprospecting: Exploitation of marine biodiversity towards biotechnological applications—a review. *Journal of Basic Microbiology*.

Hu, J., Cai, W., Wang, C., Du, X., Lin, J., & Cai, J. (2018). Purification and characterization of alkaline lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* HFE733 and application for biodegradation in food wastewater treatment. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(3), 583-590.

Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular. *Annu. Rev. Microbiol*, 53, 315-51.

Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 390-397.

Jaeger, K. E., & Kovacic, F. (2014). Determination of lipolytic enzyme activities. In *Pseudomonas methods and protocols* (pp. 111-134). Humana Press, New York, NY.

Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.

Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.

Ji, Q., Xiao, S., He, B., & Liu, X. (2010). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(3-4), 264-269.

Jinwal, U. K., Roy, U., Chowdhury, A. R., Bhaduri, A. P., & Roy, P. K. (2003). Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(6), 1041-1046.

- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L. I., & Fujiwara, N. (2006). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(2), 82-89.
- Kennedy, J., Marchesi, J. R., & Dobson, A. D. (2008). Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. *Microbial cell factories*, 7(1), 1-8.
- Kojima, Y., Yokoe, M., & Mase, T. (1994). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(9), 1564-1568.
- Kovacic, F., Babic, N., Krauss, U., & Jaeger, K. (2019). Classification of lipolytic enzymes from bacteria. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 24, 255-289.
- Kulkarni, N., & Gadre, R. V. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 344-348.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.
- Lin, S. F., Chiou, C. M., Yeh, C. M., & Tsai, Y. C. (1996). Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1093-1095.
- Lotti, M., & Alberghina, L. (2007). Lipases: molecular structure and function. In *Industrial enzymes* (pp. 263-281). Springer, Dordrecht.
- Lozada, M., & Dionisi, H. M. (2015). Microbial bioprospecting in marine environments. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 307-326). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Madan, B., & Mishra, P. (2010). Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(3), 597-604.
- Madhavan, A., Sindhu, R., Parameswaran, B., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2017). Metagenome analysis: a powerful tool for enzyme bioprospecting. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(2), 636-651.
- Martini, V. P., Glogauer, A., Müller-Santos, M., Iulek, J., de Souza, E. M., Mitchell, D. A., ... & Krieger, N. (2014). First co-expression of a lipase and its specific foldase obtained by metagenomics. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-14.
- Melani, N. B., Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews*, 49(2), 143-158.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

Nimkande, V. D., & Bafana, A. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102591.

Noor, R., Islam, Z., Munshi, S. K., & Rahman, F. (2013). Influence of temperature on *Escherichia coli* growth in different culture media. *J Pure Appl Microbiol*, 7(2), 899-904.

Noormohamadi, R., Tabandeh, F., Shariati, P., & Otadi, M. (2013). Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas sp.* *Iranian Journal of Microbiology*, 5(4), 422.

Patel, V., Nambiar, S., & Madamwar, D. (2014). An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas sp.* DMVR46: Partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 49(10), 1673-1681.

Patel, A. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2017). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 13-41). Academic Press.

Paul, P. E. V., Sangeetha, V., & Deepika, R. G. (2019). Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. *Recent developments in applied microbiology and biochemistry*, 107-125.

Peng, R., Lin, J., & Wei, D. (2010). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(3), 733-743.

Prasad, S., & Roy, I. (2018). Converting enzymes into tools of industrial importance. *Recent patents on biotechnology*, 12(1), 33-56.

Priyanka, P., Kinsella, G., Henehan, G. T., & Ryan, B. J. (2019). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein expression and purification*, 153, 121-130.

Quyen, T., Vu, C., & Thu Le, G. (2012). Enhancing functional production of a chaperone-dependent lipase in *Escherichia coli* using the dual expression cassette plasmid. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1-12.

Rao, T. E., Imchen, M., & Kumavath, R. (2017). Marine enzymes: production and applications for human health. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 80, pp. 149-163). Academic Press.

Rasmey, A. H. M., Aboseidah, A. A., Gaber, S., & Mahran, F. (2017). Characterization and optimization of lipase activity produced by *Pseudomonas monteilli* 2403-KY120354 isolated from ground beef. *African Journal of Biotechnology*, 16(2), 96-105.

Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R. K., & Gupta, R. (2000). A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas sp.* with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, 22(6), 495-498.

Rios, N. S., Pinheiro, B. B., Pinheiro, M. P., Bezerra, R. M., dos Santos, J. C. S., & Gonçalves, L. R. B. (2018). Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process biochemistry*, 75, 99-120.

- Rizkia, P. R., Silaban, S., Hasan, K., Kamara, D. S., Subroto, T., Soemitro, S., & Maksum, I. P. (2015). Effect of Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside concentration on prethrombin-2 recombinan gene expression in *Escherichia coli* ER2566. *Procedia Chemistry*, 17, 118-124.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
- Rosenau, F., & Jaeger, K. E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, 82(11), 1023-1032.
- Rosenau, F., Tommassen, J., & Jaeger, K. E. (2004). Lipase-specific foldases. *Chembiochem*, 5(2), 152-161.
- Roskoski, R. (2015). Principles of Enzymes. Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier.
- Sachan, S., Iqbal, M. S., & Singh, A. (2018). Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962 (T): Isolation, identification, and characterization. *International Microbiology*, 21(4), 197-205.
- Saha, B., Bothast, R. & Jordan, D. (2009). Enzymes, Industrial. *Encyclopedia of microbiology*, 281-294.
- Saran, S., Chib, S., & Saxena, R. K. (2019). Biotechnology of leather: an alternative to conventional leather processing. *High Value Fermentation Products: Human Welfare*, 2, 23-47.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2017). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 34(1), 5-28.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 1-15.
- Tanaka, D., Yoneda, S., Yamashiro, Y., Sakatoku, A., Kayashima, T., Yamakawa, K., & Nakamura, S. (2012). Characterization of a new cold-adapted lipase from *Pseudomonas* sp. TK-3. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(2), 327-338.
- Thapa, S., Li, H., O'Hair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., ... & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 61(8), 579-601.
- van Beilen, J. B., & Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 338-344.
- Verma, S., Meghwanshi, G. K., & Kumar, R. (2021). Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*, 182, 23-36.
- Walsh, G. (2014). *Proteins: biochemistry and biotechnology*. John Wiley & Sons.

- Wang, S. L., Lin, Y. T., Liang, T. W., Chio, S. H., Ming, L. J., & Wu, P. C. (2009). Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 65-73.
- Westphal, A. H., & van Berkel, W. J. (2021). *Techniques for Enzyme Purification. Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*, 1-31.
- Wu, X., You, P., Su, E., Xu, J., Gao, B., & Wei, D. (2012). In vivo functional expression of a screened *P. aeruginosa* chaperone-dependent lipase in *E. coli*. *BMC biotechnology*, 12(1), 1-9.
- Yamashiro, Y., Sakatoku, A., Tanaka, D., & Nakamura, S. (2013). A cold-adapted and organic solvent-tolerant lipase from a psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. strain YY31: identification, cloning, and characterization. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(4), 989-1000.
- Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W., & Wang, T. (2021). A Valuable Product of Microbial Cell Factories: Microbial Lipase. *Frontiers in Microbiology*, 2724.
- Yapaşan, E. (2008). *Partieal purification and characterization of lipase enzyme from a Pseudomonas strain (Doctoral dissertation, Izmir Institute of Technology (Turkey))*.
- Zhang, A., Gao, R., Diao, N., Xie, G., Gao, G., & Cao, S. (2009). Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(2-3), 78-84.
- Zhang, J., Jiang, L., Chen, X., Lv, K., Basiony, M., Zhu, G., ... & Liu, X. (2021). Recent advances in biotechnology for marine enzymes and molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 308-315.
- Zhang, C., & Kim, S. K. (2010). Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Marine drugs*, 8(6), 1920-1934.
- Zhu, D., Wu, Q., Hua, L. (2019). 3.01 - Industrial Enzymes. *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*. Pergamon, 1-13.

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: *Expresión y caracterización bioquímica de una lipasa y su foldasa específica de Pseudomonas alcaligenes* proveniente del Golfo de México, que presenta la alumna **Itzel Anahí Hidalgo Manzano (10036971)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

| NOMBRE  | DICTAMEN | FIRMA |
|---|----------|-------|
| Dra. Ma. del Rayo Sánchez Carbente<br>CEIB-UAEM     | APROBADO |       |
| Dr. Nelson Avonce Vergara<br>CIDC-UAEM              | APROBADO |       |
| Dr. Edmundo Castillo Rosales<br>IBT-UNAM            | APROBADO |       |
| Dra. María del Refugio Trejo Hernández<br>CEIB-UAEM | APROBADO |       |
| Dra. Liliana Pardo López<br>IBT-UNAM                | APROBADO |       |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LILIANA PARDO LÓPEZ** | Fecha:2022-11-17 17:39:35 | Firmante

eWtSZ4bSgiqBfK5VJzFF3ueRcLA4Hh0S1wsY6GkMYt4ddPyxPZ+ABXXGff2NIRIxhVxYGOOURvXIOS4nLyWNBNOA0llz6YREOSSld+fv5YBomEU8txSJA4QajHFZ5PO2UuYh undhJWesO60xRhQFNtyMitAVyL4gQ7e1Rlm+selWmgiSH/0tDslgcWE7ZuTdzNOWVXasR1esRWZ/hl2XoSEHgnm9GOp5b/qREwJe3iyylyfPWIZHzrTUM7Pe+7kHbBab0nEBfL D4qoWBdlmHzSFuCH2YU0vQWRE/uXVYbFmpp2/ypaT1yXqhETVYWsX/hwQXpLIZPWHrdHMSqIYw==

**NELSON AVONCE VERGARA** | Fecha:2022-11-17 19:11:12 | Firmante

0Z9HXTXyQevLgypabHKb8oGzv6Flak2GTuNDqEaDwaHOEQ8lj8FeDW15xLgSnVU2e+Apdjxnv2HWZ68eDVhkOYQ4cpmS12Jbpg/k5fRj1Bin6nDFiWWlt6J+kvJqxkxRptD6rc0 jA4o/5xPeQ1scRVsui2YE4JdjcAvOIAMwAr4P9WhPUKVKGINF6aoVQKcFTp3JcNRUnV4uCdX7ArYrTRQuYl6HHjS0pqq+nlsapV9TL4NuGUCAnC33qaDrsgzfNDv2GNFA23L9YR sftUuwzUjQ1V0xt2V+GEmoq0LAI6ukAeD0LkzxxVJ3R19/FSH5H46+cRz0OCY3XPIzAslOhQ==

**MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ** | Fecha:2022-11-18 11:10:27 | Firmante

f0tPeQBJS+rZ/VSGpG0ezRMT1Gm9hv8L4ANHh0m8SN1x2jvNssWnyLMI5kYnU7G9/At3d5HL1jwziStUrMI96u5yjQeggcPW1QdtZCYpjtdxqrbJ68q8iQkXyurOKDAs3KWGMlmb qyyA3sV+cfVWw2NPDdwBLaUQL3mjh8+hx7881ZbdsIkYKAKbBOAaXuX0kCEA6ckldkC24GeCiu3fLDoru2d3IR3jOuNN+lzU9maTyArdV70R3nFUVdPqX7XGcvKN1i61fmzMB 1MHo67vo6t+PMWwo0dljvpFGHwPggmTiBvzpXtIUUxbiYgzu6FEt4xbIThqwgt8cuGJwBA==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE** | Fecha:2022-11-18 11:38:36 | Firmante

XtFieS71fUE50gYgDJC90kQ2/psR8QuLdqdXPsyHJh9njElfw6/Wwa4PBAshOulh0Lqm8hbdJnbQdifgq8x2UIFDKquFhmdNhyi57yORLgjs7+aEgdcge7cwi5LuzMzMcmKCF+gtun2/ QQpzorMqoV8Y5ndaUtqMKJGVrEDcNDI2HebiNNLwQYxEBI2D4I8gzJWr66r6OtsGyPYYQ3yxINLUIVFCsxHg56RTuB4fOsHiWeqT50QHngHly9hWYRqFrQbSt70fGk4njTbLggE Gs3b9EjTzMKPSStWEO3uA2U/UD6gk/UPvS2/HAR1xpefiTeYsnh4XA/ICGYL26z2fQ==

**EDMUNDO CASTILLO ROSALES** | Fecha:2022-11-18 17:33:11 | Firmante

EKTQqpswnVQwAzAFcayEG+tjnXGK+EdHK9VP6DYKxcq+3WLRwuoXmosqlmG5aSxPOCDa4dBM/Mc8Dvnm4bAbfoMdsY37sp7wkvIFni8hG/0hJsmvqeE0AsuFcshtl6fcPwS kh/gZvNAWR+jeCwJgJPEhA2T9Bs7UBNstzw6t+glrqltL5IKvCXz3u10Y1drBfD4sN4sc7S3LAN810cYD5f5uPDXWfhMDIplZDNATArVJ3sSAVdBh4bTsDrDMacyc1v7WuwxmGp 5a3Xz3Djpc/sEQ9yVnNMPDFiqghgr7b+eY5Xx238CeUqIK4jnjThY4OdVlaVc/ng1xPnnhgLA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FcgdBXPDR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/v74zewJbrrFkoxFGa0S107q7BtsZexr>

