

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE *Bacillus pumilus* AISLADO DE UN PRODUCTO LÁCTEO TRADICIONAL MEXICANO

Mayra Patricia Alcántara¹, Carolina Peña¹, Ismael Bustos², Maricarmen Quirasco¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología.

²Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Medicina. Lab. Físicoquímica e Ingeniería de proteínas. Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. quirabma@unam.mx, Tel. y fax (55) 5622-5305

Palabras clave: *Bacillus pumilus*, lipasa, propiedades cinéticas.

Introducción. Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles en una interfase agua-lípido y la reacción inversa en medio no acuoso. Debido a esta versatilidad y su facilidad de producción, las de origen microbiano son de importancia industrial y biotecnológica. Particularmente, en la industria de productos lácteos, las lipasas se han utilizado en la maduración de quesos, ya que los ácidos grasos liberados por acción hidrolítica de éstas influyen en su sabor y olor característico [1].

El propósito de este estudio fue determinar los parámetros cinéticos y la especificidad de sustrato de la lipasa madura de *B. pumilus* QC, aislado de queso Cotija y compararla con una lipasa de *B. pumilus* GMA1 en las mismas condiciones experimentales.

Metodología. El gen de la lipasa madura de *B. pumilus* QC se amplificó y clonó en el vector de expresión pET-22b(+). La lipasa se expresó en células de *E. coli* BL21 (DE3). La enzima recombinante, LipAQC-6H, se indujo con IPTG (0.5mM, 3 h), fue purificada por cromatografía de afinidad (resina Protino Ni-IDA, Macherey Nagel) y caracterizada. Se midió espectrofotométricamente la liberación enzimática de *p*-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenil acetato (pNFA) 500 µM, ajustando los datos de las curvas de progreso de la reacción con el programa ENCORE v.1.2. Se evaluó la especificidad de sustrato con pNFA, pNFButirato, pNFDecanoato y pNFLaurato (100 µM, respectivamente). Mediante cromatografía de gases se obtuvo el perfil de ácidos grasos libres (AGL) producto de la hidrólisis enzimática de grasa butírica a diferentes tiempos (0, 24 y 48 h) [2].

Resultados y discusión. La secuencia putativa de aminoácidos (aa) de la lipasa madura de *B. pumilus* QC (LipAQC) comparte una identidad del 96% (7 aa diferentes) con la de *B. pumilus* GMA1 (LipAGMA1), perteneciendo a la familia de lipasas I.4 [3]. Se calcularon el peso molecular y punto isoeléctrico de LipAQC-6H con

el programa ProtParam (www.expasy.ch), siendo de 20.5 kDa y 9.45 respectivamente, valores que se comprobaron experimentalmente (SDS-PAGE e IEF). Respecto a la caracterización cinética (Tabla 1), la k_{cat} de LipAQC-6H fue mayor con respecto a LipAGMA1-6H en todas las condiciones probadas. La composición de la mezcla de reacción utilizada en estos ensayos, pretendió simular las condiciones en que se llevaría a cabo la maduración de quesos. En la Fig. 1 se presenta el perfil de ácidos grasos liberados en la hidrólisis de grasa butírica con ambas enzimas. Se observa que ambas tienen una especificidad similar, por acilglicéridos de cadena corta (C4-C6). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos con *p*-nitrofenil ésteres. La mayor proporción de hidrólisis se lleva a cabo en las primeras 24 h, aunque la LipAQC-6H continúa funcionando 24 h más.

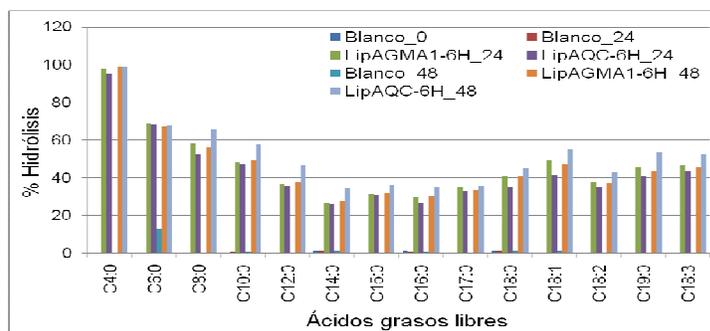


Fig. 1. Especificidad hacia grasa butírica.

Conclusiones. La diferencia en la secuencia de ambas lipasas se refleja en una mayor velocidad catalítica, pero no en la especificidad de sustrato. LipAQC-6H tendría un mejor comportamiento cinético en la maduración de quesos, en donde que se prefiere la liberación de ácidos grasos de cadena corta y mediana.

Agradecimiento. PAIP 5490-16. Química-UNAM y UNAM-DGAPA IN200705. Beca otorgada por CONACYT.

Bibliografía.

- Collins, Y. F., et al. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13: 841–866.
- O'Connor, C.J. et al. (1996). Ruminant pregastric lipases: experimental evidence of their potential as industrial catalysts in food technology. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.* 7: 189-205.
- Jaeger, K-E., et al. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Rev. Microbiol.* 53; 315–351.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes.

pH	NaCl (%)	ΔI	Enzima	$k_{cat} \pm DS$ (min ⁻¹)	$K_m \pm DS$ (µM)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ µM ⁻¹)
5.5	0	0	LipAQC-6H	643.06 ± 10.9	841.40 ± 44.4	0.764
			LipAGMA1-6H	410.13 ± 20.7	724.95 ± 46.8	0.566
5.5	2	0.342	LipAQC-6H	789.95 ± 46.5	1224.06 ± 83.1	0.645
			LipAGMA1-6H	421.02 ± 27.5	1008.16 ± 22.8	0.418
5.5	5.5	0.941	LipAQC-6H	1009.75 ± 72.2	1122.36 ± 101.7	0.900
			LipAGMA1-6H	541.37 ± 47.8	986.63 ± 81.9	0.549
7.5	0	0	LipAQC-6H	567.91 ± 11.1	595.69 ± 15.2	0.953
			LipAGMA1-6H	383.87 ± 5.1	633.08 ± 28.0	0.606