

Expresión heterológica de la lipasa LipA de *Bacillus subtilis* (BSLA) (PDB: 2QXU) en *Escherichia coli*: uso de una variante soluble para la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con metanol (biodiésel)

Andrés Arturo Luque Díaz

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Biólogo

Director

Jorge Hernández Torres

Ph.D. en Ciencias

Co- Directora

Oriana Danuta Serna Daza

Bióloga

Co- Director

Jefferson Yadir Barraza Gómez

Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular –CINBIN, en cabeza de su director Jorge Hernández Torres y los investigadores asociados Oriana Serna y Jefferson Barraza, por proveer el conocimiento y los recursos que permitieron la realización de este proyecto.

Al Centro de Supercomputación y Cálculo Científico de la Universidad Industrial de Santander (SC3-UIS), por brindar los recursos tecnológicos y el soporte informático indispensables para este trabajo.

Al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Industrial de Santander, por su eficiencia en la prestación de servicios.

Este proyecto hace parte del macroproyecto 'EVALUACIÓN DE LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON ETANOL (BIODIESEL), USANDO EXTRACTOS CRUDOS DE *Escherichia coli* BL21 (DE3), TRANSFORMADA CON GENES MUTANTES DERIVADOS DEL DISEÑO RACIONAL DE FORMAS SOLUBLES DE DOS LIPASAS BACTERIANAS' financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander.

Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	18
1.1 General	18
1.2 Específicos:	18
2. Marco Teórico	19
2.1 Producción de FAME mediante transesterificación enzimática	19
2.2 Lipasas	20
2.3 La lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i> BSLA	21
2.4 Expresión insoluble de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	23
2.5 Diseño racional de proteínas solubles	24
2.6 Cuantificación de lípidos y FAME mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- ¹ H)	25
3. Materiales y Métodos	26
3.1 Diseño <i>in silico</i> de una versión soluble de BSLA	26
3.1.1 Construcción de modelos estructurales de la versión soluble BSLA	26
3.1.2 Acoplamiento molecular (proteína-ligando)	26
3.1.3 Dinámica molecular	27
3.2 Construcción de un vector de expresión con el gen de la versión soluble de BSLA	28

3.3 Transformación del hospedero de expresión	28
3.4 Sobreexpresión de la versión soluble de BSLA.....	29
3.4.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE	29
3.4.2 Determinación de la actividad hidrolítica frente al <i>p</i> -Nitrofenil butirato (<i>p</i> -NPB)	29
3.4.3 Determinar el efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de las versiones solubles	30
3.4.4 Concentración de extractos crudos de BSLA_SM2 y BSLA_SM5.....	30
3.5 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford	31
3.6 Evaluación de la síntesis de FAME utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA_SM como catalizador de la reacción de transesterificación.....	32
3.6.1 Caracterización del aceite de palma como materia prima	32
3.6.3 Diseño experimental de la reacción de transesterificación	33
4. Resultados.....	34
4.1 Diseño <i>in silico</i> de una versión soluble de BSLA.....	34
4.1.1 Construcción de modelos estructurales de la versión soluble BSLA	34
4.1.2 Acoplamiento molecular (proteína-ligando).....	37
4.1.3 Dinámica molecular~	38
4.2 Construcción de un vector de expresión con el gen de las versiones soluble BSLA_SM2 y BSLA_SM5.....	40
4.3 Transformación del hospedero de expresión	41
4.4 Sobreexpresión de las versiones solubles de BSLA_SM2 y BSLA_SM5	41
4.4.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE	43
4.4.2 Determinación de la actividad hidrolítica frente al <i>p</i> -nitrofenil butirato (<i>p</i> -NPB)	44

4.4.3 Efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de las versiones solubles BSLA_SM2 y BSLA_SM5.....	45
4.5 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford	47
4.6 Evaluación de la síntesis de FAME utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizador de la reacción de transesterificación.....	48
4.6.1 Caracterización del aceite de palma como materia prima	48
4.6.2 Identificación y cuantificación de FAME.....	49
5. Discusión.....	51
6. Conclusiones.....	54
7. Recomendaciones	55
Referencias Bibliográficas	57
Apéndices.....	67

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de la reacción de transesterificación catalizada por lipasas (Korman et al., 2013).....	20
Figura 2. Estructura tridimensional de la Lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB: 2QXU). Se muestra el detalle de la triada catalítica compuesta por los residuos Ser77, Asp133 e His 156.	23
Figura 3. Perfil de solubilidad estructuralmente corregido de la estructura cristalina de BSLA y sus versiones solubles. A. la lipasa BSLA, B. BSLA_SM1, C. BSLA_SM2 y D. BSLA_SM5. Se presenta la triada catalítica de cada estructura (S77, D133, H156-157-159) y los residuos donde se identificaron los posibles sitios de sustitución o inserción de aminoácidos con mayor efecto en la solubilidad de la proteína. La escala de color representa el puntaje de solubilidad de los residuos donde valores mayores a 1 (azul) denotan regiones altamente solubles, mientras que valores inferiores a -1 (rojo) regiones con baja solubilidad.....	36
Figura 4. Desviación de la media cuadrática (RMSD) en función del tiempo de BSLA y sus versiones solubles. A. un sistema acuoso y B. un sistema bifásico compuesto por metanol y POP.	38
Figura 5. Evolución a través del tiempo de los elementos de la estructura secundaria de las versiones solubles en un sistema acuoso. A. BSLA_SM2 y C. BSLA_SM5. Estructura = Hélice- α , lámina- β , Puente- β , Giro.....	39

- Figura 6. Evolución a través del tiempo de los elementos de la estructura secundaria de A. BSLA_SM2 y B. BSLA_SM5 en un sistema bifásico (metanol y POP). Estructura = Hélice- α , lámina- β , Puente- β , Giro..... 40
- Figura 7. Plásmidos recombinantes pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5. Se muestran otros componentes del plásmido pET-22b (+): secuencia señal peIB, gen de resistencia a la ampicilina (AmpR), gen regulador lacI, el origen de replicación ori y el gen rop. 42
- Figura 8. Crecimiento de E. coli BL21 (DE3) transformada con A. pET-22b_BSLA_SM2 y B. pET-22b_BSLA_SM5, en presencia (+) y ausencia (-) de IPTG. Las barras verticales representan el $X \pm \delta$ de tres mediciones independientes..... 43
- Figura 9. Localización subcelular de BSLA_SM2 y BSLA_SM5. Electroforesis SDS-PAGE de extractos crudos de E. coli BL21 (DE3), inducida con 0.4 mM IPTG después de 3 h, a 37 °C. Marcador (M) PageRuler™ #26614; fracciones celulares: proteína celular total (PT), fracción del medio (FM), fracción del periplasma (FP), fracción soluble del citoplasma (FSC), fracción insoluble del citoplasma (FIC). Marcador (M) PageRuler™ #26616. 44
- Figura 10. Producción de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 para cada tiempo de inducción (0, 1, 3 horas). Electroforesis SDS-PAGE de extractos crudos del periplasma de E. coli BL21 (DE3) inducida con 0.4 mM IPTG. Marcador (M) PageRuler™ #26614 (izq.) y marcador (M) PageRuler™ #26616 (der.). 45
- Figura 11. Actividad hidrolasa relativa de extractos crudos de E. coli BL21 transformados con los plásmidos pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5 frente al p-NPB. A. Actividad relativa obtenida a partir de las fracciones insoluble del citoplasma (FIC), medio (M), periplasma (FP) y soluble del citoplasma (FSC). B. Actividad relativa de extractos crudos periplasmáticos en diferentes tiempos de inducción. El 100 % de actividad relativa corresponde a la máxima

actividad de cada preparación. Los datos representan el $X \pm \delta$ de tres mediciones independientes.

..... 46

Figura 12. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) sobre la actividad hidrolasa de extractos crudos periplasmáticos de *E. coli* BL21 transformada con los plasmidos pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5 frente al p-NPB. El 100 % de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación. Los datos representan el $X \pm \delta$ de tres mediciones independientes.

..... 46

Figura 13. Proporción molar de los componentes presentes en el aceite crudo de palma africana.

..... 50

Figura 14. Identificación de FAME mediante RMN-¹H. Los espectros representan el producto de reacciones de transesterificación de aceite de palma con metanol en una relación molar (1:9), utilizando las enzimas BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizadores de la reacción. Se presenta el espectro del aceite de palma crudo (control). 50

Figura 15. Productos finales de la transesterificación del aceite de palma con el metanol

utilizando las enzimas BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizadores. 51

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Determinación del perfil de ácidos grasos. Modificado de Knothe (2004).	32
Tabla 2. Cuantificación de MAG, DAG, TAG, FAA y FAME siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al. (2014 y 2015) y modificaciones de Barraza et al (2016).....	33
Tabla 3. Variantes solubles de BSLA obtenidas mediante CamSol design.....	35
Tabla 4. Valores de RMSD (Å) estimados para cada modelador estructural.	35
Tabla 5. Valores de energía libre de unión (Kcal/mol), estimados a partir de la interacción de los modelos estructurales y el ligando TAG.....	37
Tabla 6. Promedio de residuos observados para las principales estructuras secundarias de BSLA, BSLA_SM2 y BSLA_SM5 en un sistema acuoso (sa) y en un sistema bifásico (sb).	39
Tabla 7. Actividad específica estimada para extractos periplasmáticos (crudos y liofilizados) de BSLA_SM2 y BSLA_SM5.....	47
Tabla 8. Perfil de ácidos grasos del aceite crudo de palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>), estimado mediante RMN- ¹ H. Los datos representan el $X \pm \delta$ de tres mediciones independientes.....	49

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Parámetros del equipo RMN1H en la detección-cuantificación de FAEE y perfil de ácidos grasos.....	67
Apéndice B. Traducción del gen de la versión soluble BSLA_SM2.....	68
Apéndice C. Traducción del gen de la versión soluble BSLA_SM5.....	69

Resumen

TÍTULO: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LIPASA LipA DE *Bacillus subtilis* (BSLA) (PDB: 2QXU) EN *Escherichia coli*: USO DE UNA VARIANTE SOLUBLE PARA LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON METANOL (BIODIÉSEL)*

AUTOR: ANDRÉS ARTURO LUQUE DÍAZ**

PALABRAS CLAVES: LipA, *Bacillus subtilis*, solubilidad, diseño racional de proteínas, acoplamiento molecular, dinámica molecular, transesterificación, aceite de palma, biodiésel (FAME), ¹H-RMN.

El biodiésel es un combustible funcional que podría reemplazar parcial o totalmente al petrodiésel. Usualmente, es sintetizado mediante transesterificación básica. Se obtiene de fuentes renovables como el aceite de palma y puede utilizarse en motores diesel convencionales. Sin embargo, la catálisis básica genera productos no deseados que elevan los costos de operación. Una alternativa para la producción de biodiésel es el uso de catalizadores biológicos como las lipasas. En nuestro laboratorio logramos demostrar que la lipasa A de *Bacillus subtilis* (BSLA) tiene potencial en la producción enzimática de biodiésel. No obstante, esta enzima se expresa de forma insoluble en *E. coli* formando cuerpos de inclusión, lo que obliga a reconstituir la enzima y elevar los costos de producción. Este trabajo de investigación se propuso desarrollar versiones solubles de BSLA, concebidas mediante diseño racional. Inicialmente, se llevaron a cabo análisis de acoplamiento y dinámica molecular que demostraron la viabilidad *in silico* de dos versiones solubles, bajo condiciones de reacción específicas. Posteriormente, ambas lipasas fueron clonadas en el vector pET-22b, se sobreexpresaron en *E. coli* y se comprobó la actividad hidrolasa de extractos crudos frente al *p*-NPB. Los mutantes presentaron máxima actividad a 40 °C y pH 9. Finalmente, se evaluó la producción de biodiésel. Los rendimientos fueron bajos (1-3%), lo cual puede atribuirse a la baja carga enzimática (1 U) y a las condiciones de reacción.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. Co- Directores: Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga; Jefferson Yadir Barraza Gómez, Químico

Abstract

TITLE: HETEROLOGOUS EXPRESSION OF *Bacillus subtilis* Lipase LipA (BSLA) (PDB: 2QXU) IN *Escherichia coli*: USE OF A SOLUBLE VARIANT FOR ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF AFRICAN PALM OIL WITH METHANOL (BIODIESEL)*

AUTHOR: ANDRÉS ARTURO LUQUE DÍAZ**

KEYWORDS: LipA, *Bacillus subtilis*, solubility, rational protein design, molecular docking, molecular dynamics, transesterification, palm oil, biodiesel (FAME), ¹H-RMN.

Biodiesel is a functional fuel that could partially or entirely replace petrodiesel. It is obtained from renewable sources such as palm oil and can be used in conventional diesel engines. Typically, it is synthesized by basic transesterification. However, basic catalysis generates unwanted products that raise operating costs. An alternative for producing biodiesel is to use biological catalysts such as lipases. In our laboratory we were able to demonstrate that *Bacillus subtilis* lipase A (BSLA) has potential in the enzymatic production of biodiesel. However, this enzyme forms insoluble inclusion bodies when expressed in *E. coli*, which forces to reconstitute the enzyme and raises production costs. This research work aimed to develop soluble versions of BSLA, conceived by rational design. Firstly, docking and molecular dynamics analyzes were carried out to demonstrate the viability in silico of two soluble versions, under specific reaction conditions. Subsequently, they were cloned into the pET-22b and overexpressed in *E. coli* and the hydrolase activity of crude extracts was monitored against *p*-Nitrophenyl butyrate. Both mutants showed maximum activity at 40 °C and pH 9. Finally, biodiesel production was evaluated. Yields were low (1-3%), which can be attributed to the low enzymatic load (1 U) and to the reaction conditions.

* Research Work

** Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. Co- Directors: Oriana Danuta Serna Daza, Biologist; Jefferson Yadir Barraza Gómez, Chemist

Introducción

En Colombia, la producción de aceite de palma ha venido en aumento desde la última década del siglo XX (Ocampo, 2009). Durante el año 2016, Colombia alcanzó una producción de 1.143.000 toneladas de aceite de palma crudo, posicionándose como cuarto productor a nivel mundial (Fedepalma, 2017). Este crecimiento se debe, entre otros, al aumento constante en la demanda mundial de grasas y aceites, y a la posibilidad de utilizar este tipo de productos como biocombustibles (Ocampo, 2009). El biodiésel (mezcla de monoalquilésteres —FAAE, *Fatty Acid Alkyl Esters*— derivados de aceites vegetales), constituye una alternativa atractiva para reemplazar parcialmente el petrodiesel (Luque et al., 2010). El biodiésel libera menos CO₂ a la atmosfera, se obtiene de recursos biológicos renovables, es biodegradable y es compatible con la infraestructura actual de distribución de combustible (Luque et al., 2010; Robles-Medina et al., 2009). En 2015, la producción mundial de biodiésel se estimó en 30.4 mil millones de litros, de los cuales 600 millones de litros corresponden a la producción colombiana (U.S. Energy Information Administration, 2016)

El biodiesel es usualmente sintetizado mediante transesterificación básica, de triacilglicerol (TAG) con etanol o metanol (Bielecki, 2009). Durante la transesterificación alcalina, la presencia de agua conduce a la producción de ácidos grasos libres (FFA, *Free Fatty Acids*), un producto final no deseado, pues inducen la producción de jabones (saponificación) (Du et al., 2004). Adicionalmente, los FFA presentes en el aceite de palma no pueden ser convertidos en FAAE

(Leung et al., 2010). En consecuencia, la contaminación con FFA requiere purificación adicional, elevando los costos de operación.

Las lipasas constituyen una alternativa para la producción de biodiesel. Al igual que los catalizadores básicos, las lipasas pueden catalizar la transesterificación de TAG con alcoholes de cadena corta, a una alta tasa de conversión (~90%) (Kumari et al., 2007). En contraste con la transesterificación alcalina, La mayoría de lipasas pueden convertir FFA en FAME incluso en presencia de grandes cantidades de agua, evitando la saponificación (Hasan et al., 2006). Adicionalmente, las lipasas pueden separarse fácilmente del glicerol producido, incrementando su potencial como producto de valor agregado (Parawira, 2009; Sotoft et al., 2010). El principal obstáculo de usar lipasas para producir biodiesel es su alto costo (>1000 US\$/kg), respecto a catalizadores ácido/base (Biermann et al, 2011; Sotoft et al., 2010). Esta inversión inicial podría mitigarse produciendo localmente lipasas funcionales, incrementando la viabilidad de producir biodiesel a escala industrial.

Actualmente, el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología realiza investigaciones relacionadas con la producción de lipasas recombinantes de origen bacteriano, que cumplan con los estándares industriales para la síntesis de biodiésel. Una de ellas es la lipasa A de *Bacillus subtilis* (BSLA) que cataliza la formación de biodiesel mediante la transesterificación de TAGs con metanol (Ying et al., 2007). No obstante, esta proteína presenta problemas de solubilidad al expresarse en *E. coli*, debido a la formación de cuerpos de inclusión (Zhou et al., 2012). Generalmente, los cuerpos de inclusión son solubilizados mediante el uso de altas concentraciones de agentes desnaturalizantes como urea o hidrocloreuro de guanidina, junto con agentes reductores como el β -mercaptoetanol (De Bernardez, 1998; Vallejo et al., 2004). Sin embargo, el uso de agentes caotrópicos para la solubilización de proteínas resulta en la pérdida de

la estructura secundaria de la proteína (Dill et al., 1991) e incremento de los costos de producción de proteínas recombinantes (Vallejo et al., 2004). Adicionalmente, BSLA es una enzima propensa a la agregación incluso a temperatura ambiente y valores básicos de pH (Acharya et al., 2004).

En consecuencia, uno de los desafíos principales del sector biotecnológico es incrementar la solubilidad de las proteínas recombinantes sin afectar su actividad. Dos metodologías han demostrado ser especialmente efectivas mejorando la solubilidad y otras cualidades *in vitro* de algunas proteínas recombinantes: la evolución dirigida y el diseño racional (Fang et al., 2014; Waldo, 2003). Este último resulta conveniente, pues explora las características fisicoquímicas de las proteínas a través de métodos computacionales, aumentando el número de variantes mutacionales que pueden ser procesadas (Chennamsetty et al., 2009).

Con el fin de expresar BSLA en *E. coli* de forma soluble y funcional sin requerir reconstitución con urea, el objetivo de este trabajo de grado fue diseñar un mutante soluble de BSLA, concebido mediante diseño racional. La actividad aciltransferasa fue evaluada usando aceite de palma africana como sustrato y metanol como aceptor acilo. Con los resultados de este proyecto esperamos contribuir al mejoramiento de la solubilidad y eficiencia en la producción de BSLA en *E. coli*, minimizando costos de producción.

1. Objetivos

1.1 General

Evaluar la actividad aciltransferasa de extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con un gen mutante *LipA* que codifica la lipasa soluble de la lipasa LipA de *Bacillus subtilis* (BSLA_SM), concebido mediante diseño racional.

1.2 Específicos:

1. Diseñar *in silico* un mutante soluble de BSLA (BSLA_SM).
2. Sobreexpresar el mutante BSLA_SM en *E. coli* BL21 (DE3).
3. Demostrar la actividad hidrolasa de extractos crudos de BSLA_SM recombinante con *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB).
4. Evaluar la actividad aciltransferasa de BSLA_SM recombinante en función del pH y la temperatura.

2. Marco Teórico

2.1 Producción de FAME mediante transesterificación enzimática

El biodiesel es un combustible funcional, típicamente compuesto por ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos (FAEE -*Fatty acid ethyl esters*- o FAME -*Fatty acid methyl esters*-) (Xiao et al., 2009). El biodiesel es obtenido mediante transesterificación a partir de fuentes renovables como el aceite de palma africana (*Elaeis guineensis*), el cual se caracteriza por tener altos niveles de ácidos grasos y triacilglicerol (TAGs) (Fjerbaek et al., 2009). La transesterificación consiste en la conversión de los TAG en FAEE usando un alcohol de cadena corta (Figura 1) (Villadiego et al., 2015). Actualmente se utilizan catalizadores básicos para producir biodiesel. No obstante, cuando los aceites vegetales contienen agua o altos niveles de FFA (como el aceite de palma africana), la reacción deriva en una saponificación (producto no deseado) (Leung et al., 2010). La contaminación con FFA propicia la formación de emulsiones que complican la limpieza del producto final (Korman et al., 2013; Knothe, 2005).

Recientemente, se ha investigado la producción de biodiesel mediante catálisis enzimática. Las lipasas son una familia de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis, transesterificación y de esterificación (Taher et al., 2011). Algunas lipasas pueden convertir simultáneamente TAGs y FFAs en FAMEs (Hasan et al., 2006). Además, la transesterificación enzimática requiere temperaturas de reacción inferiores a las empleadas durante la catálisis alcalina (Sotoft et al., 2010). Sin embargo, las lipasas presentan algunas desventajas como: tiempo de vida reducido con

cada ciclo de reacción (Kourist, 2014), inmovilización de la enzima, el uso de co-solventes y/o la adición por pasos del alcohol (Barbosa et al., 2016).

Actualmente se ha explorado el uso de técnicas mutacionales que mejoran cualidades fisicoquímicas de las lipasas como la solubilidad, la termoestabilidad y la resistencia a algunos solventes (Korman et al., 2013; Yang et al., 2015).

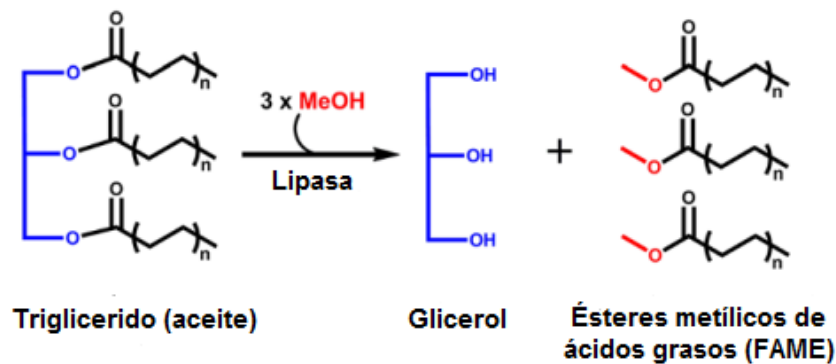


Figura 1. Representación esquemática de la reacción de transesterificación catalizada por lipasas (Korman et al., 2013).

2.2 Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas EC 3.1.1.3) son una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos para producir ácidos grasos y glicerol. Estas enzimas son producidas por animales, plantas y microorganismos (Treichel et al., 2010). Desde el punto de vista industrial, las lipasas han ganado interés debido a características como: 1) capacidad de usar TAG y FFA en reacciones de hidrólisis y transesterificación; 2) especificidad por una amplia gama de sustratos; 3) estabilidad y rendimiento en medios acuosos; 4) bajas temperaturas de reacción; 5) reutilización

de la enzima después n de ciclos de reacción; 6) poca necesidad de cofactores en su actividad catalítica (Dutra et al., 2008).

El sitio activo de las lipasas consiste en la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu, donde el residuo de serina se localiza usualmente en el pentapéptido conservado GX SXG (Schrag et al., 1997). Una característica que distingue lipasas de las esterasas es la presencia de una región ‘lid’ o ‘tapadera’, comprendida por una α -hélice que cubre el sitio activo, la cual se desplaza al entrar en contacto con el sustrato en interfaz micelar (Brzozowski et al., 1991; Cyler et al., 1997). Sin embargo, no todas las lipasas poseen ‘lid’, de modo que formalmente se describen como carboxilesterasas que hidrolizan acilglicéridos de cadena larga (>10 átomos de carbono).

Las lipasas fúngicas son ampliamente reconocidas por su potencial biotecnológico en la producción de biodiesel (Fedosov et al., 2013; Hughes et al., 2011). Sin embargo, estas lipasas requieren hongos hospederos como *Pichia pastoris* que aporten la maquinaria celular para realizar modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Yang et al., 2015). Al igual que las lipasas de origen fúngico, las lipasas de origen microbiano pueden catalizar reacciones de hidrólisis y de síntesis de productos industriales. Además, sus genes respectivos pueden ser expresados eficientemente en organismos hospederos como *E. coli* (Meier et al., 2007).

2.3 La lipasa A de *Bacillus subtilis* BSLA

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva aerobia comúnmente encontrada en el suelo (Doi et al., 1986). Produce una variedad de proteínas extracelulares, entre ellas dos enzimas lipolíticas: LipA y LipB (Eggert et al., 2003). La lipasa A de *B. subtilis* (BSLA) es una proteína de 19.3 KDa, producto del gen *LipA* (Lesuisse et al., 1993). Se compone de 181 aminoácidos, siendo una de las

lipasas más pequeñas hasta hoy reportadas (Dartois et al., 1994). BSLA cataliza preferencialmente la hidrólisis de ésteres de glicerol de longitud media (C:8-C:14).

BSLA posee un pI de 9.9 y una actividad óptima a 35 °C, pH 10 (Lesuisse et al., 1993; Rajakumara et al., 2008). La actividad enzimática de BSLA es estimulada 140% tributirina, 30% DMSO (en vol.). En contraste, la acetona y el isopropanol inhiben la actividad de la enzima en cualquier concentración. BSLA mantiene su actividad al ser incubada con 30% (v/v) metanol, mientras que concentraciones similares de etanol inactivan la enzima (Lesuisse et al., 1993).

BSLA presenta una arquitectura de único dominio globular con compactación mínima de giros α/β , con 6 hojas beta rodeadas por cinco α -hélices (Rajakumara et al., 2008) (Figura 2). El sitio activo de BSLA está comprendido por los aminoácidos S₇₇, D₁₃₃ y H₁₅₆, y el oxianión está constituido por I₁₂ y M₇₈ (Singh et al., 2015).

BSLA ha sido clasificada como una verdadera lipasa con una demostrada actividad aciltransferasa. Ying et al. (2007) obtuvieron FAMES a partir de aceites reciclados y metanol, utilizando BSLA expresada en su organismo de origen. No obstante, BSLA también es una enzima propensa a agregarse incluso a temperatura ambiente y valores de pH superiores a 7 (Acharya et al., 2004). En el rango de pH de 4-10 la tasa de agregación de esta proteína es pequeña, pero incrementa rápidamente cuando la lipasa es calentada a 55°C (Rajakumara et al., 2008).

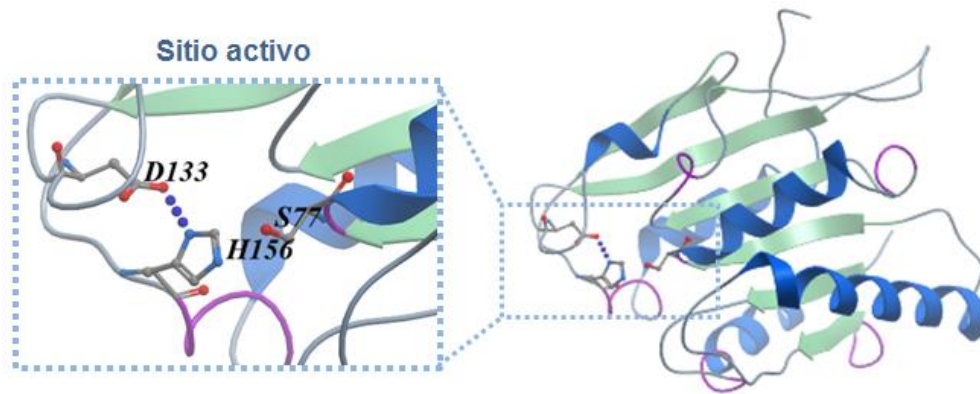


Figura 2. Estructura tridimensional de la Lipasa A de *Bacillus subtilis* (PDB: 2QXU). Se muestra el detalle de la triada catalítica compuesta por los residuos Ser77, Asp133 e His 156.

2.4 Expresión insoluble de proteínas recombinantes en *E. coli*

E. coli es el organismo más ampliamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes que no requieren modificaciones post-traduccionales tales como la glicosilación (Dartois et al., 1992). Gran número de lipasas bacterianas han sido expresadas exitosamente en *E. coli*, debido a que es un hospedero con una tasa alta de crecimiento, su genética es bien conocida y muchos vectores de expresión están diseñados para este hospedero (Dartois et al., 1992; Kaur, 2017).

Con frecuencia altos niveles de expresión de proteínas recombinantes forman agregados insolubles o cuerpos de inclusión debido a: 1) alta concentración local de cadenas polipeptídicas 2) un plegamiento ineficiente de la proteína, ó 3) nula disponibilidad de chaperonas (Ventura, 2005). Generalmente se asume que proteínas altamente hidrofóbicas son más propensas a acumularse como cuerpos de inclusión en *E. coli* (Mitraki et al., 1991). En el caso de las proteínas que forman puentes disulfuro, la formación de cuerpos de inclusión es anticipada, puesto que el ambiente reductor del citosol bacteriano inhibe la formación de puentes disulfuro (Singh et al., 2005).

El diámetro de los cuerpos de inclusión varía desde 0.5-1.3 μm y poseen una densidad superior a muchos componentes celulares ($\sim 1.3 \text{ mg ml}^{-1}$) facilitando su separación por centrifugación (Georgiou et al., 1999). La metodología más ampliamente utilizada para solubilizar proteínas presentes en cuerpos de inclusión consiste en la adición de altas concentraciones (6-8 M) de caotrópicos como urea o hidrocloreuro de guanidina o de detergentes como SDS (Stöckel et al., 1997; Vallejo et al., 2004). Cabe resaltar que se atribuye al uso de caotrópicos la poca recuperación de proteína activa a partir de cuerpos de inclusión (Vallejo et al., 2004).

Recientemente, se han dispuesto metodologías más eficientes para solubilizar cuerpos de inclusión como la aplicación de diálisis y el uso de técnicas cromatográficas (Li et al., 2004; Tsumoto et al., 2003). Por otro lado, algunas metodologías como la evolución dirigida y el diseño racional, apuestan mejorar la solubilidad de las proteínas modificando las características estructurales de éstas (Adamczak et al., 2004; Fang et al., 2014; Roodveldt et al., 2005).

2.5 Diseño racional de proteínas solubles

El diseño racional de proteínas fue la primera aproximación a la ingeniería de proteínas y actualmente se sigue empleando para obtener características deseadas en proteínas de interés (Adamczak et al., 2004). Esta metodología combina el conocimiento de las propiedades bioquímicas de una proteína junto con su estructura nativa para proponer mutaciones, las cuales son introducidas mediante mutagénesis dirigida (Steiner et al., 2012).

El desarrollo de herramientas computacionales ha permitido generar modelos estructurales a partir de proteínas homologas cuya estructura es previamente conocida (Kelly et al., 2015; Söding et al., 2005; Zhang, 2008). Una vez se dispone de una estructura proteica (real o modelada), es

posible simular el comportamiento de la proteína frente a un determinado sustrato o solvente (Adcock et al., 2006; Alonso et al., 2006).

En la actualidad se dispone de algoritmos de diseño racional para mejorar la solubilidad de proteínas recombinantes. Algunos algoritmos como CamSol y PON-Sol calculan el perfil intrínseco de solubilidad de la proteína y proponen posibles sitios de inserción o sustitución de aminoácidos, conservando la actividad catalítica (Sormanni et al., 2015; Y. Yang et al., 2017). Otros algoritmos como TANGO predicen regiones con secuencias propensas a aumentar la agregación (*aggregation prone sequence regions*, APRs) (Rousseau et al., 2004).

2.6 Cuantificación de lípidos y FAME mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones RMN-¹H es una técnica que permite elucidar moléculas grandes y pequeñas (Bharti et al., 2012). Esta técnica también permite la cuantificación de un compuesto presente en una mezcla, tomando como referencia la intensidad de las señales presentes en el espectro de RMN (Soininen, 2008).

La espectroscopia RMN-¹H presenta algunas ventajas respecto a otras metodologías de cuantificación (cromatografía HPLC, HPTLC, gas), tales como: tiempos cortos de análisis, uso de pequeñas cantidades de solventes y muestra y la no necesidad de calibración con compuestos estándar (Nieva-echevarría et al., 2014). Esta técnica ha sido utilizada anteriormente para la cuantificación de di-, mono-gliceridos y ácidos grasos en mezclas grasas (Nieva-echevarría et al., 2014; Oicoechea, 2008; Ruiz, 2003). La determinación del contenido de metil ésteres de ácidos

grasos en muestras lipídicas y de biodiesel mediante RMN-¹H también ha sido reportada en estudios previos (Mello et al., 2008; Song et al., 2015).

3. Materiales y Métodos

3.1 Diseño *in silico* de una versión soluble de BSLA

3.1.1 Construcción de modelos estructurales de la versión soluble BSLA Para el diseño de la secuencia proteica relativa a la versión soluble de BSLA se tuvo en cuenta el código PDB 2QXU. Se aplicó el algoritmo de diseño racional CamSol, a través de la función *CamSol design* para identificar posibles mutaciones con efecto en la solubilidad de la enzima nativa. Adicionalmente se estimó el perfil de solubilidad de los modelos estructurales generados. Con la secuencia proteica obtenida se construyeron modelos estructurales a través de los modeladores HHpred, I-Tasser y Phyre2 (Kelly et al., 2015; Söding et al., 2005; Zhang, 2008). El modelo con mayor ajuste fue seleccionado a través de alineamientos estructurales con la estructura nativa mediante el software VMD (Humphrey et al., 1996) teniendo en cuenta el valor de RMSD más cercano a 0.

3.1.2 Acoplamiento molecular (proteína-ligando) Con el software Autodock-4.2.6 (Morris et al., 1998), se llevaron a cabo simulaciones de acoplamiento molecular (proteína-ligando) donde se estimó la energía libre de unión (ΔG_b) entre los modelos 3D de la versión nativa y las versiones solubles de BSLA y el sustrato (TAG). El acoplamiento se realizó bajo los siguientes parámetros:

libre rotación de todos los enlaces del ligando con libertad conformacional, adición de cargas de Gasteiger a la proteína y al ligando, adición de hidrógenos a la proteína, se utilizó el Algoritmo Genético (GA). Al utilizar el Algoritmo Genético se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones: 100 corridas del GA, 150 tamaño de población, 2 500 000 máximo número de evaluaciones, 27 000 máximo número de generaciones, 0.02 tasa de mutación del gen y 0.08 tasa de cruza. La simulación fue llevada a cabo en una caja de dimensiones $x=53$, $y=46$ y $z=44$, que contenía los residuos de la triada catalítica de la estructura nativa y los modelos. Se efectuaron un total de 10 réplicas de simulación para cada estructura.

3.1.3 Dinámica molecular La estabilidad estructural de los modelos y la estructura nativa se evaluó mediante simulaciones de dinámica molecular a través del software GROMACS-5.0.7 (James et al., 2015). Para evaluar la estabilidad de los modelos estructurales en un sistema acuoso, se seleccionó el campo de fuerza Gromos53a6 y se solvató con moléculas de agua (modelo spc216) una caja cubica con una distancia mínima entre la superficie de la proteína y la caja de 1 nm. El sistema fue equilibrado durante 10ns a una temperatura de 300 K y 1 bar de presión.

La estabilidad de los modelos estructurales también fue evaluada bajo las condiciones de reacción del biodiesel. Para ello se construyó un sistema bifásico compuesto por una caja cuadrangular de dimensiones 6.10606x6.10606x 12.21212 nm. La mitad de esta caja fue solvatada con moléculas del triglicérido POP (1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerol, atb moleculeID = 22627) y la otra mitad con moléculas de metanol (atb moleculeID = 15607). Ambas moléculas fueron obtenidas en la base de datos ATB (*Automated Topology Builder*) (Malde et al., 2011). Las estructuras fueron ubicadas en la mitad de la bifase.

Los parámetros del campo de fuerza y de equilibrio de temperatura y presión fueron los mismos empleados para el sistema acuoso. La trayectoria de los modelos estructurales fue evaluada mediante la función RMSD y el análisis de las estructuras secundarias (DSSP) durante un intervalo de 50 ns para el sistema acuoso y de 10 ns para el sistema bifásico.

3.2 Construcción de un vector de expresión con el gen de la versión soluble de BSLA

El diseño del gen relativo a la versión soluble de BSLA se llevó a cabo tomando como base la secuencia proteica obtenida mediante el algoritmo de diseño racional CamSol (ver sección 3.1). La secuencia de ADN relativa al gen de la versión soluble de BSLA se obtuvo mediante la traducción inversa de la secuencia proteica propuesta. En la construcción de la secuencia nucleotídica se tuvo en cuenta el uso de codones de *E. coli*. Se clonó el gen en el vector de expresión pET-22b (+) con las enzimas de restricción Xho I y Nco I. Se adicionó una secuencia de polihistidina (His₆)-tag, para futuras aplicaciones. Para la síntesis del gen se contrató con la empresa Epoch Life Science Inc y la precisión de la construcción fue constatada mediante secuenciación por electroforesis capilar con la empresa Macrogen Inc. (Corea).

3.3 Transformación del hospedero de expresión

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET-22b_BSLA_SM2 (+) y pET-22b_BSLA_SM5 (+), por medio de choque térmico en presencia de CaCl₂. Las cepas transformadas fueron criopreservadas según el protocolo propuesto por

Sambrook & Russell (2001) y almacenadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular – LBM de la Escuela de Biología de la UIS.

3.4 Sobreexpresión de la versión soluble de BSLA

La expresión de BSLA_SM se llevó a cabo en medios de cultivo LB a pH 7, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, e incubados a 180 rpm y 37 °C. Se realizó seguimiento del crecimiento bacteriano a una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀). La expresión fue inducida en cultivos líquidos mediante la adición de IPTG 0.4 mM cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ entre 0.6-1.0.

Las células fueron concentradas mediante centrifugación y se recuperaron las fracciones medio de cultivo (FM), periplasma (FP) y citoplasma (soluble, FCS e insoluble, FIC) luego de 0, 1 y 3 h de inducción, de acuerdo con el manual para el sistema pET de Novagen (11th Ed.). Posteriormente, la sobreexpresión fue verificada mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). La sobreexpresión se realizó por triplicado.

3.4.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE Las proteínas fueron observadas según el Sistema Laemmli mediante electroforesis en gel 20% poliacrilamida (SDS-PAGE), seguido de la tinción con 0,1% nitrato de plata (AgNO₃) según el protocolo de Chevallet et al. (2006).

3.4.2 Determinación de la actividad hidrolítica frente al *p*-Nitrofenil butirato (*p*-NPB) La capacidad de los mutantes para hidrolizar ésteres fue cuantificada por espectrofotometría,

monitoreando el incremento de la absorbancia del *p*-nitrofenol ($pK_a = 7.15$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$, $\epsilon_{400} = 14775\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ a $\text{pH } 7.25$) a 410 nm . Se utilizaron extractos crudos proteicos de las fracciones medio de cultivo (FM), periplasma (FP) y citoplasma (soluble, FCS e insoluble, FIC) a 3 h de inducción. También se utilizaron extractos crudos del periplasma a las 0, 1 y 3 horas de inducción. Las reacciones se realizaron en 25 mM buffer fosfato de potasio $\text{pH}=8.0$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$, durante un intervalo de 300 segundos.

3.4.3 Determinar el efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de las versiones solubles La variación en la actividad hidrolasa de los mutantes solubles fue evaluada mediante ensayos con *p*-NPB utilizando extractos crudos periplasmáticos obtenidos a 3 h de inducción. Se definieron 3 puntos de pH (7, 8 y 10) y temperatura (25, 40 y $55\text{ }^\circ\text{C}$). Los extractos proteicos fueron incubados previamente a la medición durante 1 hora a la temperatura de cada ensayo. Cada uno de los ensayos fue llevado a cabo de manera independiente y por triplicado.

3.4.4 Concentración de extractos crudos de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 Extractos crudos periplasmáticos de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 obtenidos a las 3 horas de inducción fueron concentrados mediante liofilización (deshidratación por frío). Los extractos crudos fueron previamente sometidos a diálisis para eliminar la cantidad máxima de impurezas. Los extractos liofilizados fueron resuspendidos en $300\text{ }\mu\text{L}$ de 100 mM Tris-HCl, $\text{pH}=9$. Este procedimiento se llevó a cabo para minimizar el volumen de la solución enzimática en las reacciones de transesterificación.

3.5 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford

Se utilizó el ensayo estándar de Bradford (Bradford, 1976) de 3.1 ml, el cual consistió en una mezcla de muestra proteica de concentración desconocida y reactivo de Bradford en una proporción de 1:30. La concentración desconocida se determinó a 595 nm y se empleó albumina de suero bovino (BSA) como proteína estándar conocida. La actividad específica de extractos crudos periplasmáticos fue estimada mediante la siguiente ecuación propuesta por Quinn *et al.* 1982:

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = m \frac{10^6}{\varepsilon_{400}} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{FD}{C_{prot}} * \frac{1 l}{1000 ml}$$

Dónde: m = Pendiente (min^{-1}); ε_{400} = Coeficiente de extinción molar de *p*-nitrofenol ($14775 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 7.25); V_t = Volumen total de la reacción (mL); V_m = Volumen de la solución enzimática (mL); FD = Factor de dilución enzimático; C_{prot} = Concentración de proteína en la solución enzimática (mg/mL); U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un μmol de *p*-NPB a 25°C en 1 min.

La pendiente fue estimada a partir de reacciones de hidrólisis del *p*-NPB utilizando BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizadores a una temperatura de 40°C y $\text{pH}=9$.

3.6 Evaluación de la síntesis de FAME utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA_SM como catalizador de la reacción de transesterificación.

3.6.1 Caracterización del aceite de palma como materia prima El perfil de ácidos grasos del aceite de palma se determinó por RMN-1H (Tabla 1) siguiendo la metodología de Knothe (2005) y las modificaciones propuestas por Barraza et al (2016). También se cuantificó la cantidad de TAG, DAG, MAG y FFA presentes en el aceite crudo de palma, con el fin de conocer el estado inicial del sustrato (Tabla 2)

La presencia de FAME se pudo verificar por la aparición de un (s) a 3.66. La cuantificación del metil éster se calculó siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al. (2014) siguiendo modificaciones propuestas por Barraza (2016) (Tabla 2). Los parámetros utilizados en la toma de espectros de Resonancia tanto para el numeral 3.5.1 como para 3.5.3 se registran en el anexo B.

Tabla 1.

Determinación del perfil de ácidos grasos. Modificado de Knothe (2004).

Ácidos grasos	Desplazamiento químico (δ , ppm)	*Ecuación
α CH2 totales	2.31	$N_{\alpha\text{CH2 totales}} = A_{2.25-2.40}/2$
Linolénico	0.98	$N_{\text{C18:3}} = A_{0.96-1.0}/3$
Linoleico	2.77	$N_{\text{C18:2}} = 0.5*(A_{2.74-2.80} - 4N_{\text{C18:3}})$
Oleico	2.02	$N_{\text{C18:1}} = (A_{1.94-2.10}/4) - N_{\text{C18:2}} - N_{\text{C18:3}}$
Insaturados		$N_{\text{insat}} = N_{\text{C18:1}} + N_{\text{C18:2}} + N_{\text{C18:3}}$
Saturados		$N_{\text{sat}} = N_{\text{totales}} - N_{\text{insat}}$
		$\%_X = 100*N_X/N_{\alpha\text{CH2 totales}}$

*Los subíndices indican el barrido en ppm de cada señal (δ) o el tipo de ácido graso.

A: área, N: moles y N_x : moles de X compuesto.

3.6.3 Diseño experimental de la reacción de transesterificación Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo empleando una unidad enzimática utilizando 400 mg de aceite de palma africana en una relación molar con metanol de 1:9. El aceite junto con el metanol fue puesto en agitación constante (200 rpm) durante 30 min para garantizar una emulsión. La reacción se incubó durante 6 h en viales de 2.5 ml. Las condiciones de temperatura y pH de la reacción fueron definidos de acuerdo a los mejores valores obtenidos en el ensayo de actividad hidrolasa con *p*-NPB. Para evitar la inhibición con metanol, la adición de este se efectuó en 2 pasos. En el primero (0 h) se adicionó un tercio de la razón molar total de metanol; en el segundo (4 h) se adicionaron los dos tercios restantes.

Una vez concluida la reacción, la fase oleosa fue recuperada mediante centrifugación a 10000 g durante 10 minutos e incubada durante 1 h a 90 °C para eliminar los residuos del metanol. Posterior a esto, las muestras fueron llevadas a análisis RMN-¹H en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Sede UIS Guatiguará. (Los parámetros para cada una de las corridas del espectro de resonancia son presentados en el anexo A).

Tabla 2.

Cuantificación de MAG, DAG, TAG, FAA y FAME siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al. (2014 y 2015) y modificaciones de Barraza et al (2016).

Señal	Desplazamiento químico (δ , ppm)	Multiplididad	Tipo de protón	Numero de ¹ H que causan la señal	Compuesto	*Ecuación
2-MAG	4.93	m	HOCH ₂ - CH(OR)- CH ₂ OH	1	Grupo glicerilo en 2-MAG	$N_{2-MAG} = Pc * A_{4.90-4.96}$
1-MAG	3.94	m	ROCH ₂ - CHOH- CH ₂ OH	1	Grupo glicerilo en 1-MAG	$N_{1-MAG} = Pc * A_{3.90-3.98}$
1,2 DAG	5.08	m	ROCH ₂ - CH(OR')- CH ₂ OH	1	Grupo glicerilo en 1,2-DAG	$N_{1,2-DAG} = Pc * A_{5.05-5.12}$

Señal	Desplazamiento químico (δ , ppm)	Multiplicidad	Tipo de protón	Numero de ^1H que causan la señal	Compuesto	*Ecuación
TAG + 1,2 DAG	4.22 y 4.28	m	ROCH ₂ -CH(OR')-CH ₂ OR" + ROCH ₂ -CH(OR')-CH ₂ OH	3	Grupo glicerilo en TAG y 1,2- DAG	$N_{\text{TAG}} = (\text{Pc} * 2A_{4.26-4.36} - 2N_{1,2-\text{DAG}}) / 4$
FAME	3.67	s	CH ₃ -(CO)-CH ₂ -R	3	CH ₃ del grupo metoxi del ester	$N_{\text{FAME}} \alpha\text{CH}_3 = \text{Pc} * A_{3.65-3.675} / 3$
1,3 DAG	4.05-4.21	M	ROCH ₂ -CHOH-CH ₂ OR'	5	Grupo glicerilo en 1,3- DAG	$N_{1,3-\text{DAG}} = (\text{Pc} * A_{4.04-4.36} - 4N_{\text{TAG}} - 2N_{1-\text{MG}} - 2N_{1,2-\text{DAG}}) / 5$
FFA	2.31	M	HO-(CO)-CH ₂ - + Todos los αCH_2 de TAG, DAG, MAG y FAME	2	αCH_2 de FFA, TAG, DAG, MAG y FAEE	$N_{\text{FFA}} = (\text{Pc} * A_{2.25-2.40} - 6N_{\text{TAG}} - 4N_{1,2-\text{DAG}} - 4N_{1,3-\text{DAG}} - 2N_{\text{FAME}} - 2N_{1-\text{MG}} - 2N_{2-\text{MG}}) / 2$

*Los subíndices indican el área en ppm de cada señal o el tipo de compuesto. A= área, N= moles,

$N_x =$ moles de un compuesto x, $N_{\text{totales}} = \sum N_x$, Pc= constante de proporcionalidad.

4. Resultados

4.1 Diseño *in silico* de una versión soluble de BSLA

4.1.1 Construcción de modelos estructurales de la versión soluble BSLA El algoritmo CamSol de diseño racional permitió identificar tres posibles sitios adecuados para la sustitución o inserción de residuos en la secuencia nativa de BSLA (pdb: 2QXU) con efecto sobre la solubilidad de la enzima: la posición 42 comprendida por el aminoácido triptófano (W) donde identificó una

posible sustitución con el ácido glutámico (E); la posición entre los residuos glicina 153 y valina 154 donde identificó la posible inserción de ácido glutámico o de arginina (R); y la sustitución en la posición isoleucina (I) 158 por ácido glutámico. Las posibles variantes solubles de BSLA obtenidas mediante *CamSol design* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Variantes solubles de BSLA obtenidas mediante CamSol design.

Variante soluble	Mutaciones aplicadas
BSLA_SM1	W42E;G153_V154insEEE;I157E
BSLA_SM2	W42E;G151_V152insR
BSLA_SM5	W42E;G151_V152insEEE

Se construyeron modelos estructurales a partir de las secuencias obtenidas de las variantes solubles. Los valores de la desviación de la media cuadrática (*RMSD*) estimados del alineamiento entre la estructura nativa y los modelos estructurales obtenidos para cada modelador se presentan en la Tabla 4. Se observa que el valor promedio del *RMSD* obtenido con el modelador Phyre2 fue el más cercano a 0. Los modelos estructurales seleccionados para las pruebas de acoplamiento y dinámica molecular fueron los obtenidos con el modelador Phyre2. El perfil de solubilidad de la estructura cristalina de BSLA con las posiciones identificadas por *CamSol design* para incrementar la solubilidad de la enzima se representan en la Figura 3.

Tabla 4.

Valores de RMSD (Å) estimados para cada modelador estructural.

Variante soluble	I-Tasser	HHpred	Phyre2
BSLA_SM1	0.374	0.272	0.262
BSLA_SM2	0.336	0.282	0.272
BSLA_SM5	0.36	0.27	0.271
RMSD (\bar{x})	0.36	0.274	0.268

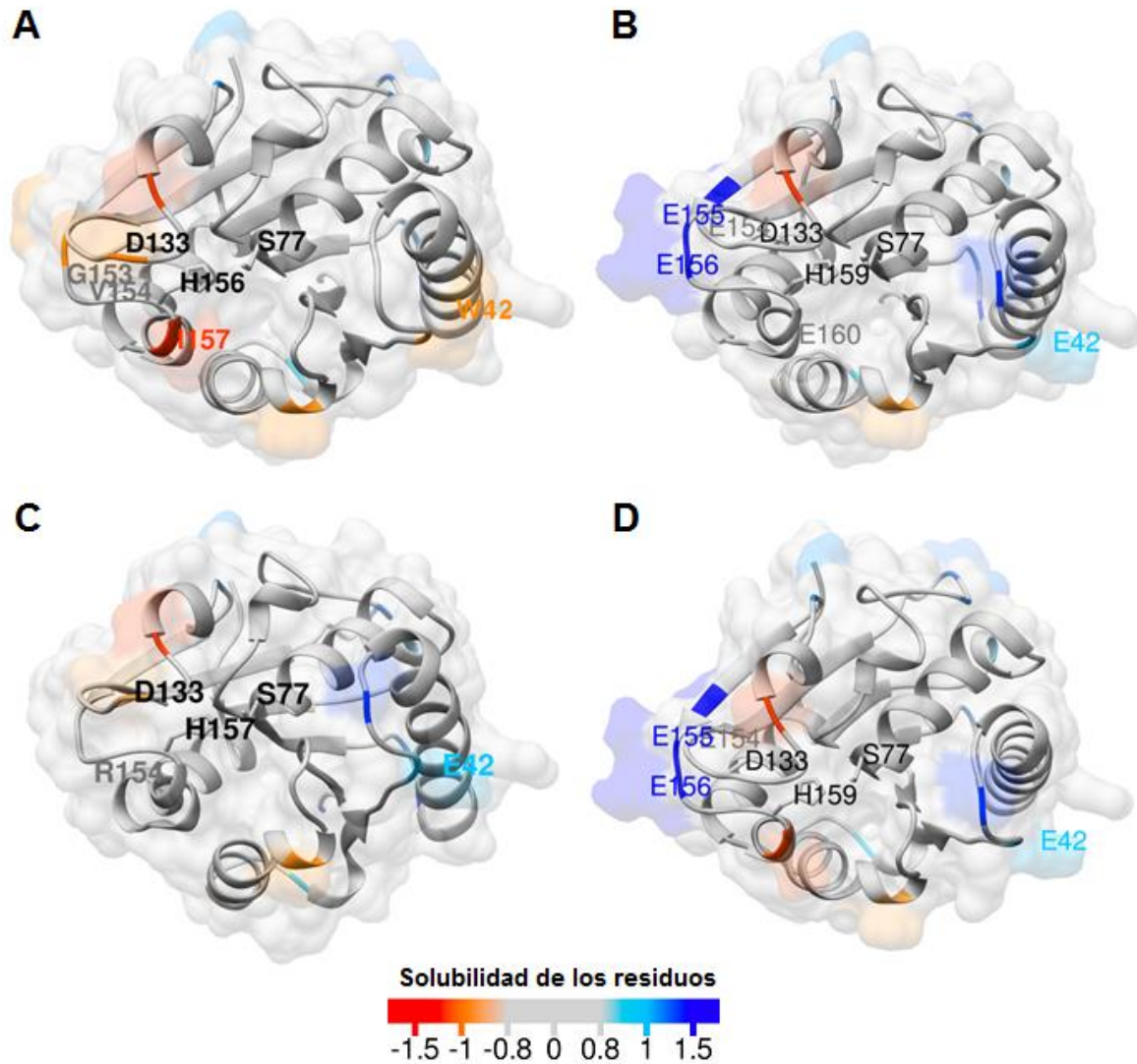


Figura 3. Perfil de solubilidad estructuralmente corregido de la estructura cristalina de BSLA y sus versiones solubles. A. la lipasa BSLA, B. BSLA_SM1, C. BSLA_SM2 y D. BSLA_SM5. Se presenta la triada catalítica de cada estructura (S77, D133, H156-157-159) y los residuos donde se identificaron los posibles sitios de sustitución o inserción de aminoácidos con mayor efecto en la solubilidad de la proteína. La escala de color representa el puntaje de solubilidad de los residuos donde valores mayores a 1 (azul) denotan regiones altamente solubles, mientras que valores inferiores a -1 (rojo) regiones con baja solubilidad.

4.1.2 Acoplamiento molecular (proteína-ligando) Los valores de energía libre de unión (ΔG) entre los modelos estructurales de la lipasa BSLA y sus versiones solubles (BSLA_SM1, BSLA_SM2 y BSLA_SM5) con el triacilglicerol (TAG) se presentan en la Tabla 5. En todas las réplicas llevadas a cabo se observó que la energía libre de unión tuvo valores negativos ($\Delta G < 0$). Un análisis de varianza de una vía determinó que existen diferencias significativas entre las energías libres de unión estimadas para cada modelo estructural con el TAG ($F(3, 36) = 39.55$, $p = 1.73 \times 10^{-11}$, $p < 0.005$). Un test de Tukey HSD indica que el valor promedio de la energía libre de unión estimada para la variante soluble BSLA_SM1 fue significativamente diferente ($p = 4.5 \times 10^{-6}$, $p < 0.005$) al obtenido para la enzima nativa. Esto también se aprecia en la versión soluble BSLA_SM2 ($p = 0.0001151$, $p < 0.005$). La versión soluble BSLA_SM5 no presentó diferencias significativas en su valor promedio estimado de energía libre de unión ($p = 0.9094027$, $p > 0.001$) respecto al obtenido para la enzima nativa.

Tabla 5.

Valores de energía libre de unión (Kcal/mol), estimados a partir de la interacción de los modelos estructurales y el ligando TAG.

Replica	BSLA	BSLA_SM1	BSLA_SM2	BSLA_SM5
1	-3.0	-2.28	-3.7	-3
2	-2.83	-2.26	-4.27	-2.05
3	-3.11	-2.27	-4.02	-2.86
4	-3.07	-2.03	-3.44	-2.93
5	-3	-2.63	-3.88	-3.43
6	-3.05	-1.97	-3.57	-3.56
7	-3.11	-2.91	-3.77	-3.3
8	-3.03	-1.77	-3.67	-2.76
9	-3.6	-2.1	-4.19	-2.94
10	-3.1	-2.23	-3.46	-3.19
$(\bar{x} \pm \delta)$	-3.097 ± 0.1945	-2.245 ± 0.3268	-3.797 ± 0.2894	-3.002 ± 0.4233

4.1.3 Dinámica molecular~ La estabilidad estructural de BSLA y sus versiones solubles BSLA_SM2 y BSLA_SM5 en un sistema acuoso y en un sistema bifásico fue estimada mediante la desviación de la media cuadrática (*RMSD*) de los átomos de la columna vertebral (N, C α , C) de cada estructura durante una trayectoria de 50 ns y 10 ns, respectivamente (Figura 4). En la dinámica molecular del sistema acuoso (Figura 4.A), se observa que la función *rmsd* permanece estable alrededor de los 0.2 nm para los modelos estructurales de BSLA y BSLA_SM2 y estable alrededor de los 0.18 nm para BSLA_SM5, los resultados obtenidos para la versión nativa demuestran valores estables de *rmsd* a 0.2 nm.

El análisis de dinámica molecular de los modelos estructurales en un sistema bifásico (Figura 4B), permite observar una estabilidad estructural de los modelos BSLA y BSLA_SM5 con valores de *rmsd* cercanos 0.18 nm. BSLA_SM2 obtuvo valores de *rmsd* dentro del rango 0.2-0.25 nm. Se obtuvo información adicional de la estabilidad de los modelos estructurales en los dos sistemas evaluados mediante el análisis de los elementos de la estructura secundaria (DSSP) a través del tiempo (Tabla 6; Figuras 4 y 5).

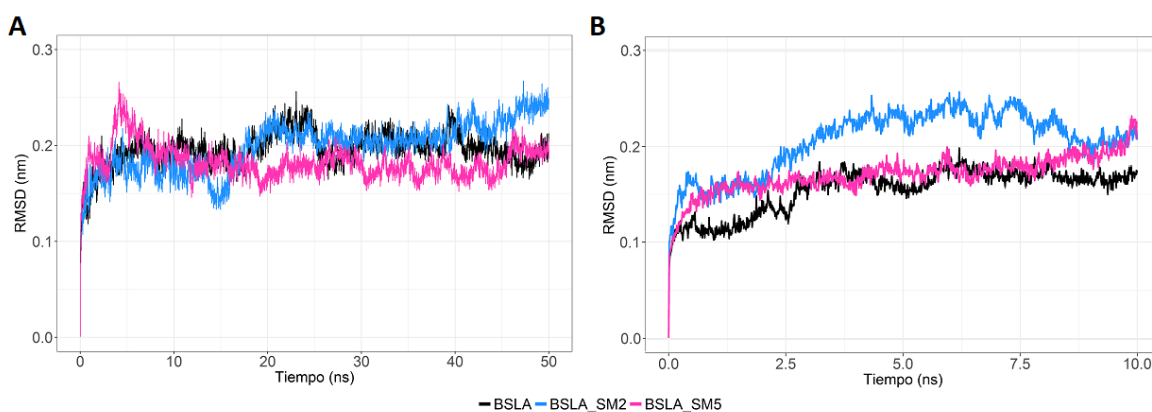


Figura 4. Desviación de la media cuadrática (*RMSD*) en función del tiempo de BSLA y sus versiones solubles. A. un sistema acuoso y B. un sistema bifásico compuesto por metanol y POP.

Tabla 6.

Promedio de residuos observados para las principales estructuras secundarias de BSLA, BSLA_SM2 y BSLA_SM5 en un sistema acuoso (sa) y en un sistema bifásico (sb).

Modelo	Bobina en espiral	lámina- β	Hélice- α	Puente- β
BSLA_SM2 (sa)	42.86 \pm 2.94	33.66 \pm 2.48	50.28 \pm 3.89	3.32 \pm 1.55
BSLA_SM2 (sb)	42.20 \pm 2.54	36.47 \pm 4.42	52.98 \pm 3.08	3.28 \pm 1.41
BSLA_SM5 (sa)	43.19 \pm 2.89	33.36 \pm 1.77	53.92 \pm 3.89	2.23 \pm 0.907
BSLA_SM5 (sb)	41.14 \pm 2.05	32.81 \pm 0.67	59.50 \pm 3.20	3.11 \pm 1.63

El análisis de las estructuras secundarias de las versiones solubles revela que las estructuras secundarias mantienen una composición residual constante a través del tiempo, tanto para el solvente acuoso como para el bifásico.

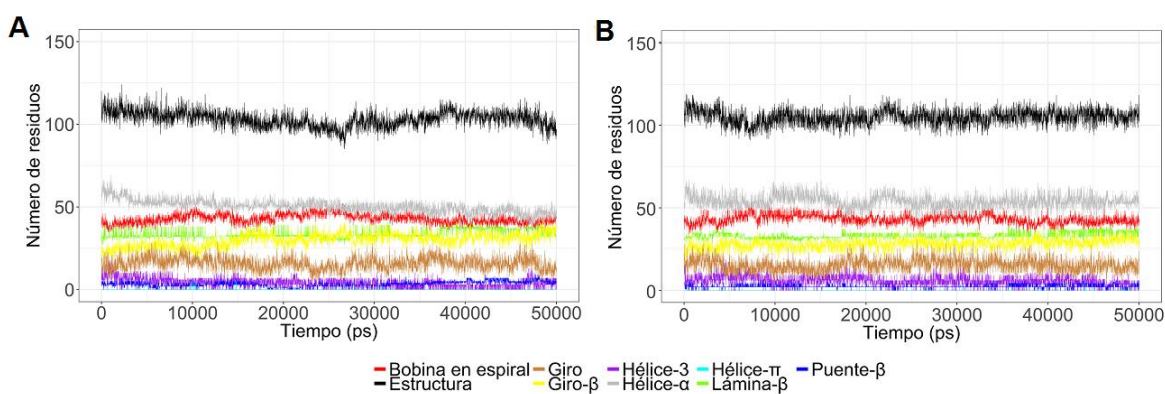


Figura 5. Evolución a través del tiempo de los elementos de la estructura secundaria de las versiones solubles en un sistema acuoso. A. BSLA_SM2 y C. BSLA_SM5. Estructura = Hélice- α , lámina- β , Puente- β , Giro.

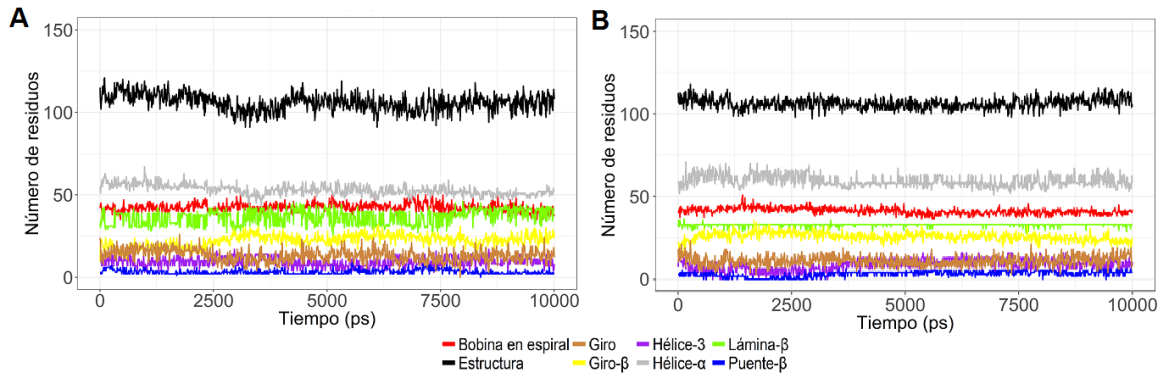


Figura 6. Evolución a través del tiempo de los elementos de la estructura secundaria de **A.** BSLA_SM2 y **B.** BSLA_SM5 en un sistema bifásico (metanol y POP). Estructura = Hélice- α , lámina- β , Puente- β , Giro.

4.2 Construcción de un vector de expresión con el gen de las versiones soluble BSLA_SM2 y BSLA_SM5

Los plásmidos pET-22b_BSLA_SM2 (5982 bp) y pET-22b_BSLA_SM5 (5988) son el producto de la recombinación del vector pET-22d (+) (5493 bp) y los genes de las versiones solubles de BSLA, BSLA_SM2 y BSLA_SM5. BSLA_SM2 y BSLA_SM5 son lipasas mutantes de 182 aminoácidos (19460 Da \cong 19.5 kDa) y 184 aminoácidos (19692 Da \cong 19.7 kDa) respectivamente. La Figura 7 resume los plásmidos recombinantes pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5. Los Anexos B y C muestran la traducción de los genes sintéticos de las lipasas BSLA_SM2 y BSLA_SM5, con el uso de codones para *E. coli*.

4.3 Transformación del hospedero de expresión

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5. Las cepas recombinantes fueron criopreservadas e incluidas en el cepario del Centro de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), sede UIS-Guatiguará.

4.4 Sobreexpresión de las versiones solubles de BSLA_SM2 y BSLA_SM5

El crecimiento de los recombinantes fue monitoreado con y sin inducción proteica (control negativo) a través de la variación de la absorbancia a 600 nm. En la Figura 8 se observa el crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada durante 6 horas. Las mediciones de absorbancia en función del tiempo fueron ajustadas a través de modelos lineales, donde se evaluó la diferencia en el crecimiento de *E. coli* transformada, mediante la variación de la pendiente de los modelos lineales. Se observan diferencias significativas entre las pendientes de los modelos lineales propuestos para *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET-22b_BSLA_SM2 cuando las bacterias son sometidas a inducción proteica mediante IPTG ($p=0.00102$, $p<0.05$). Este comportamiento también se aprecia en células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET-22b_BSLA_SM2, ($p= 0.00112$, $p<0.05$).

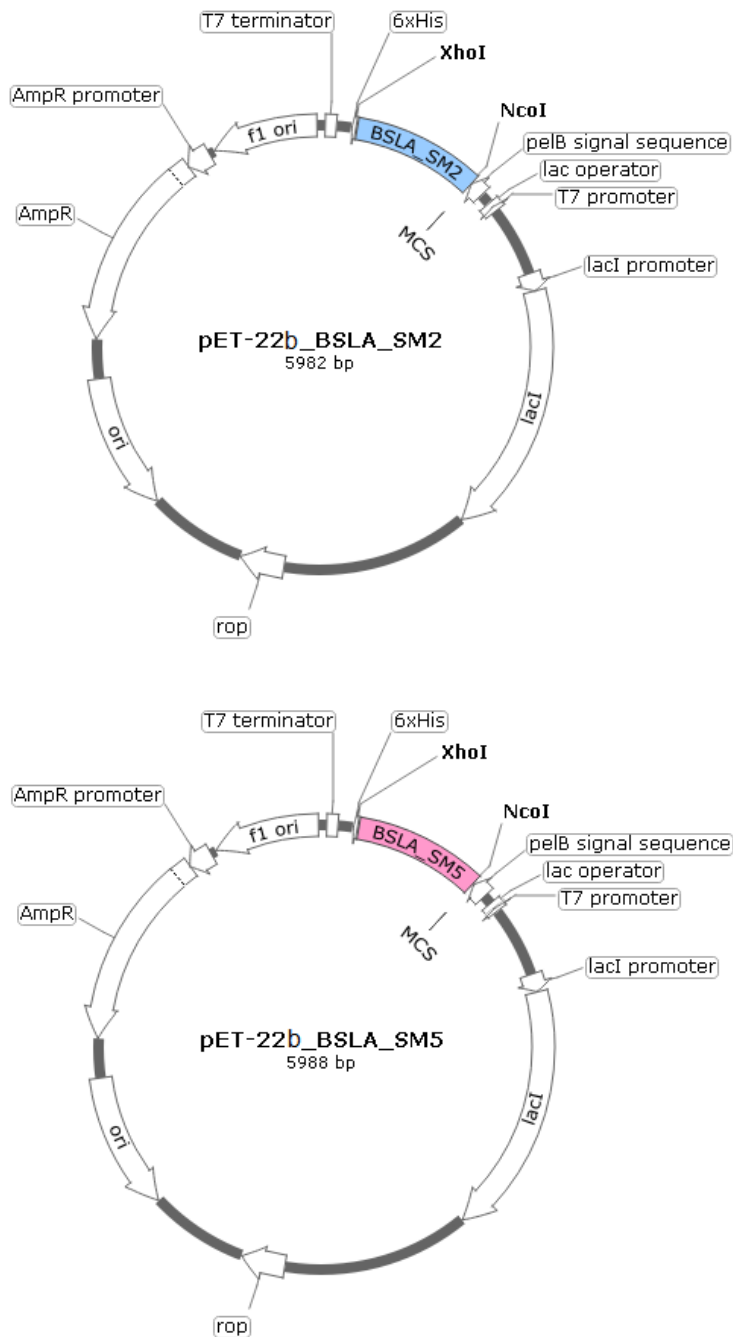


Figura 7. Plásmidos recombinantes pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5. Se muestran otros componentes del plásmido pET-22b (+): secuencia señal *pelB*, gen de resistencia a la ampicilina (*AmpR*), gen regulador *lacI*, el origen de replicación *ori* y el gen *rop*.

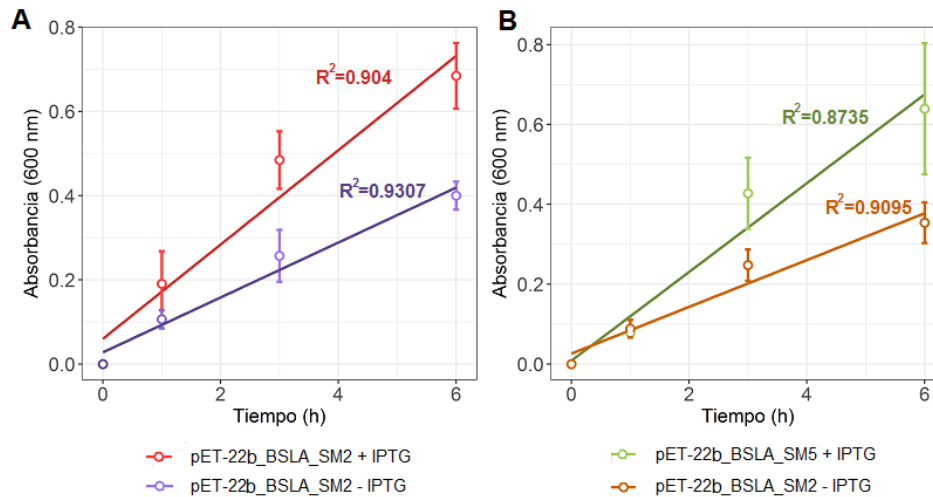


Figura 8. Crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con A. pET-22b_BSLA_SM2 y B. pET-22b_BSLA_SM5, en presencia (+) y ausencia (-) de IPTG. Las barras verticales representan el $\bar{X} \pm \delta$ de tres mediciones independientes.

4.4.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE Para comprobar la localización subcelular de BSLA_SM2 y BSLA_SM5, extractos crudos proteicos de las fracciones celulares: proteína celular total (PT); medio (FM); periplasma (FP); citoplasma soluble (FSC); citoplasma insoluble (FIC), fueron sometidos a separación electroforética mediante geles SDS-PAGE (Figura 9). Se observa la aparición de una banda intensa entre los 20-25 kDa. Ambas enzimas se localizan en mayor medida en la fracción del periplasma (FP). Así mismo un porcentaje de las enzimas recombinantes permanece en la fracción soluble del citoplasma (FSC) y en menor medida en la fracción insoluble del citoplasma (FIC). La expresión de las lipasas recombinantes fue monitoreada en la fracción del periplasma durante las 3 primeras horas de inducción (Figura 10). Se puede apreciar la aparición gradual de bandas alrededor de los 20-25 kDa, donde la banda de mayor intensidad en el gel normalizado se obtuvo a las 3 h.

4.4.2 Determinación de la actividad hidrolítica frente al *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) La expresión de las lipasas BSLA_SM2 y BSLA_SM5 fue a su vez monitoreada a través ensayos de actividad hidrolasa con *p*-NPB de extractos crudos proteicos de *E. coli*. Se observa que la mayor actividad relativa fue obtenida en la fracción periplasmática tanto para BSLA_SM2 como para BSLA_SM5 (Figura 11A). También se obtuvo en la fracción soluble del citoplasma alrededor del 60-65% de actividad residual respecto a la fracción del periplasma, para ambas enzimas. No se aprecia una actividad comparable en la fracción insoluble del citoplasma ni en la fracción del medio. La actividad hidrolasa de extractos crudos de la fracción del periplasma en diferentes tiempos de inducción con IPTG (Figura 11B), evidencia un incremento de la actividad hidrolasa a través del tiempo con un máximo de actividad a las 3 h para los dos extractos.

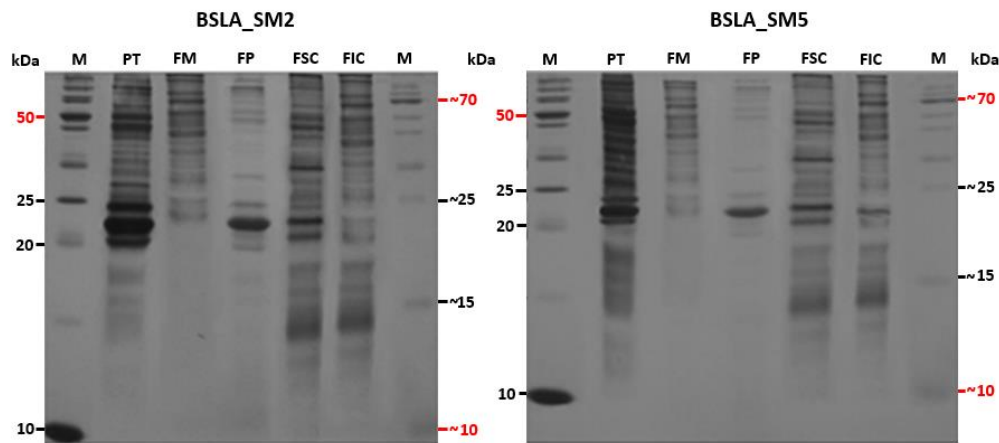


Figura 9. Localización subcelular de BSLA_SM2 y BSLA_SM5. Electroforesis SDS-PAGE de extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3), inducida con 0.4 mM IPTG después de 3 h, a 37 °C. Marcador (M) PageRuler™ #26614; fracciones celulares: proteína celular total (PT), fracción del medio (FM), fracción del periplasma (FP), fracción soluble del citoplasma (FSC), fracción insoluble del citoplasma (FIC). Marcador (M) PageRuler™ #26616.

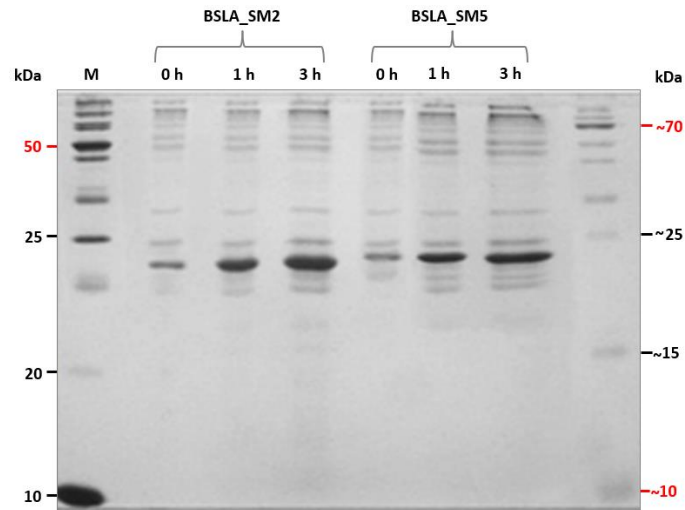


Figura 10. Producción de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 para cada tiempo de inducción (0, 1, 3 horas). Electroforesis SDS-PAGE de extractos crudos del periplasma de *E. coli* BL21 (DE3) inducida con 0.4 mM IPTG. Marcador (M) PageRuler™ #26614 (izq.) y marcador (M) PageRuler™ #26616 (der.).

4.4.3 Efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de las versiones solubles BSLA_SM2 y BSLA_SM5. El efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad hidrolasa de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 fue determinada en extractos crudos periplasmáticos (Figura 12). Los resultados obtenidos permiten observar la mejor actividad (100%) a 40 °C para las dos variantes solubles (Figura 12A). Los valores elevados de temperatura (55 °C) implican un decremento de alrededor de un 40% de la actividad hidrolasa de BSLA_SM2, mientras que BSLA_SM5 decrece totalmente su actividad hidrolasa a este valor de temperatura.

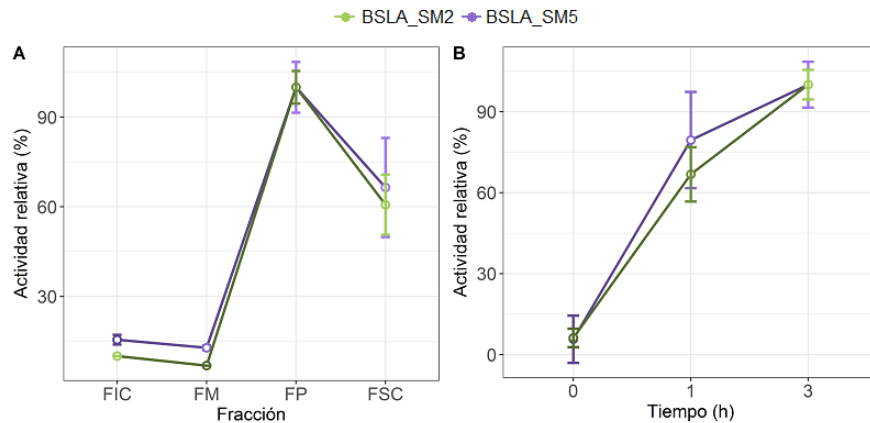


Figura 11. Actividad hidrolasa relativa de extractos crudos de *E. coli* BL21 transformados con los plasmidos pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5 frente al *p*-NPB. **A.** Actividad relativa obtenida a partir de las fracciones insoluble del citoplasma (FIC), medio (M), periplasma (FP) y soluble del citoplasma (FSC). **B.** Actividad relativa de extractos crudos periplasmáticos en diferentes tiempos de inducción. El 100 % de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación. Los datos representan el $\bar{X} \pm \delta$ de tres mediciones independientes.

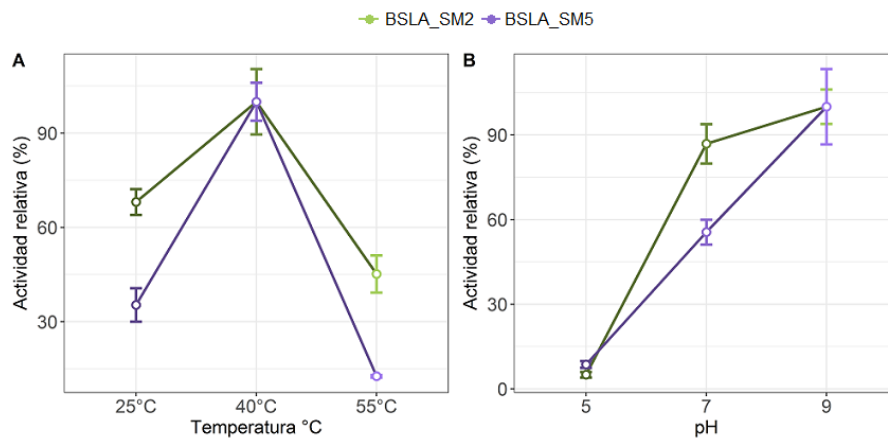


Figura 12. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) sobre la actividad hidrolasa de extractos crudos periplasmáticos de *E. coli* BL21 transformada con los plasmidos pET-22b_BSLA_SM2 y pET-22b_BSLA_SM5 frente al *p*-NPB. El 100 % de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación. Los datos representan el $\bar{X} \pm \delta$ de tres mediciones independientes.

A temperatura ambiente (25 °C) la lipasa BSLA_SM2 muestra alrededor de un 70% de actividad hidrolasa respecto al mejor valor de temperatura, mientras que bajo estas condiciones de temperatura BSLA_SM5 mantiene aproximadamente un 35% de su actividad hidrolasa respecto al mejor valor de temperatura. La variación en el pH sobre la actividad hidrolasa (Figura 12B), demuestra un valor óptimo de pH a valores altos (pH 9) para las dos enzimas modificadas. A su vez, BSLA_SM2 mantiene alrededor de un 90% de actividad hidrolasa respecto al valor mejor valor a valores neutros de pH (pH 7), mientras que BSLA_SM5 conserva aproximadamente un 55% de actividad hidrolasa respecto a su valor óptimo. Ambas enzimas demuestran una inactivación a valores de pH ácidos (pH 5).

4.5 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford

La concentración proteica estimada a partir extractos crudos periplasmáticos de *E. coli*, demuestra valores bajos de concentración en ambas lipasas después de 3 h de inducción. (<0.5 mg/mL) (Tabla 7). La actividad específica de los extractos crudos mantiene una relación lineal con la concentración proteica estimada ($R^2=0.92$).

Tabla 7.

Actividad específica estimada para extractos periplasmáticos (crudos y liofilizados) de BSLA_SM2 y BSLA_SM5.

Réplica	Pendiente (min ⁻¹)*	Concentración proteica (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)
BSLA_SM2 (1)	0.00068	0.295	0.94
BSLA_SM2 (2)	0.00088	0.326	1.10
BSLA_SM2 (3)	0.00067	0.303	0.89
BSLA_SM5 (1)	0.00099	0.412	0.97
BSLA_SM5 (2)	0.00092	0.345	1.08

Réplica	Pendiente (min ⁻¹)*	Concentración proteica (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)
BSLA_SM5 (3)	0.00078	0.308	1.03
BSLA_SM2 (liofilizado 1)	0.0052	0.612	3.45
BSLA_SM2 (liofilizado 2)	0.0057	0.722	3.21
BSLA_SM5 (liofilizado 1)	0.0059	0.671	3.57
BSLA_SM5 (liofilizado 2)	0.0054	0.638	3.44

*Pendiente estimada a partir de las curvas de absorbancia en ensayos de hidrólisis de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 bajo condiciones óptimas de reacción (40°C, pH=9).

4.6 Evaluación de la síntesis de FAME utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizador de la reacción de transesterificación.

La proporción molar de ácidos grasos presentes en el aceite de palma fue estimada mediante RMN-¹H. El porcentaje molar de ácidos grasos saturados (48.46%) e insaturados (51.54%) indica una relación 1:1 entre estos dos tipos de ácidos grasos. Adicionalmente se estimaron los porcentajes molares del ácido linolénico (1.18%), ácido linoleico (6.81%) y oleico (43.55%), con los cuales se estimó el peso molecular del aceite de palma, tomando como referencia el peso molecular de los triglicéridos que forman (Tabla 8).

4.6.1 Caracterización del aceite de palma como materia prima El compuesto presente en mayor proporción fue el TAG (68.62%). En menor proporción se detectó la presencia de diacilglicéridos (17.61%) y de ácidos grasos libres (13.77%) (Figura 13).

Tabla 8.

Perfil de ácidos grasos del aceite crudo de palma africana (Elaeis guineensis), estimado mediante RMN-¹H. Los datos representan el $\bar{X} \pm \delta$ de tres mediciones independientes.

Ácidos grasos	Porcentaje molar ($\bar{X} \pm \delta$)	Peso molecular estimado, $\bar{X} \pm \delta$ (g/mol)	Peso molecular teórico (g/mol)*	Error (%)
Linolénico (18:3)	1.18 ± 0.69			
Linoleico (18:2)	6.81 ± 4.19			
Oleico (18:1)	43.55 ± 0.91	847.02 ± 2.48	849,1929	0.25
Insaturados	51.54 ± 3.84			
Saturados (C:12:C18)	48.46 ± 3.83			

*Evaluado a partir de porcentaje y peso de triglicéridos (Rincón et al., 2009)

4.6.2 Identificación y cuantificación de FAME La presencia de FAME en reacciones de transesterificación se comprobó con la aparición del singlete a 3.67 ppm. Esta señal no se aprecia en el espectro del aceite de palma crudo (Figura 14). El porcentaje molar de los productos obtenidos a partir de la transesterificación enzimática se registran en la Tabla 9. Se observa la formación de FAME (1-3%) bajo las condiciones de reacción establecidas para ambas variantes solubles. También se detectó la presencia de productos de la hidrólisis del aceite de palma (1-MAG y 2-MAG).

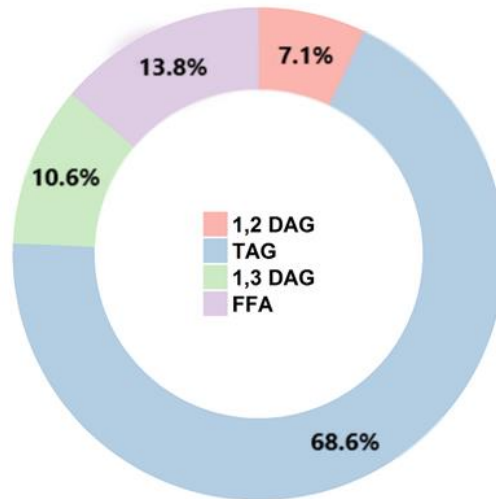


Figura 13. Proporción molar de los componentes presentes en el aceite crudo de palma africana.

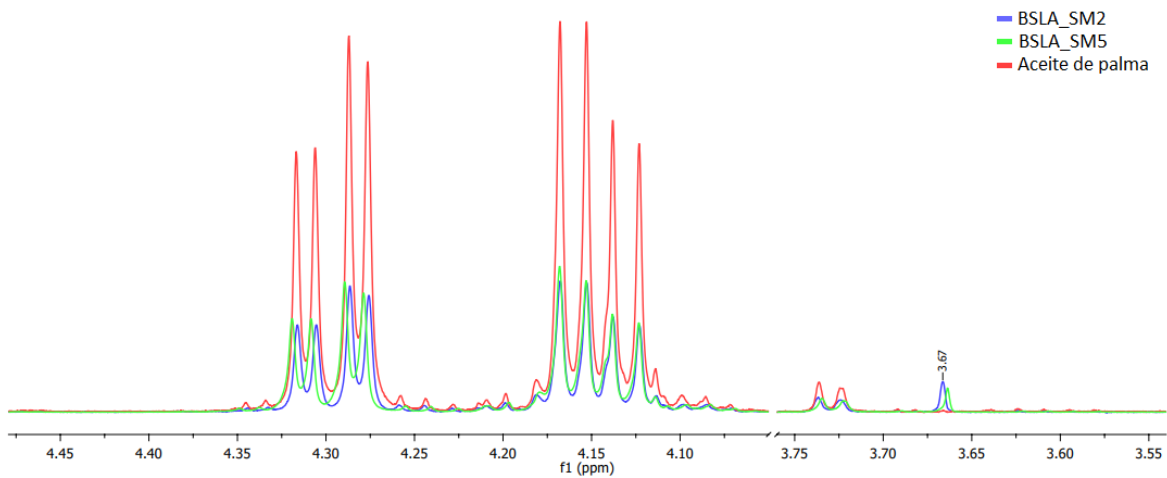


Figura 14. Identificación de FAME mediante RMN-¹H. Los espectros representan el producto de reacciones de transesterificación de aceite de palma con metanol en una relación molar (1:9), utilizando las enzimas BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizadores de la reacción. Se presenta el espectro del aceite de palma crudo (control).

Figura 15.

Productos finales de la transesterificación del aceite de palma con el metanol utilizando las enzimas BSLA_SM2 y BSLA_SM5 como catalizadores.

Ejecución	Porcentaje molar (%)						
	FAME	FFA	TAG	1,2-DAG	1,3-DAG	1-MAG	2-MAG
BSLA_SM2 (1)	2.3	14.1	66.7	6.2	8.9	1.7	0.2
BSLA_SM2 (2)	1.5	13.6	67.4	6.3	8.9	2.1	0.2
BSLA_SM5 (1)	1.6	11.7	70.4	5.7	8.9	1.5	0.3
BSLA_SM5 (2)	1.5	12.7	68.1	6.2	9.8	1.5	0.3
Aceite de palma	0	15.0	70.2	5.0	10.3	0	0

5. Discusión

La aplicación de lipasas bacterianas para procesos a escala industrial requiere la producción de grandes cantidades de proteína a bajo costo. Con el fin de expresar BSLA en *E. coli* de forma soluble y funcional sin requerir reconstitución con urea, este trabajo utilizó el diseño racional como herramienta para la producción de dos variantes solubles: BSLA_SM2 y BSLA_SM5. Estas variantes solubles demostraron ser activas en reacciones de hidrólisis y síntesis de ésteres.

El presente trabajo se desarrolló bajo dos etapas. La primera etapa consistió en el desarrollo *in silico* de las versiones solubles, teniendo en cuenta pruebas de acoplamiento y dinámica molecular. La segunda etapa se desarrolló *in vitro* con la sobreexpresión de las enzimas y la aplicación de estas en reacciones de transesterificación.

El diseño *in silico* partió de la construcción de modelos estructurales con el algoritmo CamSol de diseño racional. Las mutaciones propuestas comprenden principalmente la inserción o sustitución por ácido glutámico de residuos con efecto negativo en la solubilidad de la enzima. La

presencia de este aminoácido en la superficie de las proteínas se asocia con un fuerte aumento en la carga negativa superficial, disminuyendo la propensión de estas a precipitarse (Kramer et al., 2012; Trevino et al., 2007).

El modelador Phyre2, con el cual se construyeron los modelos estructurales empleados en este trabajo, fue seleccionado de acuerdo al criterio de similitud estructural entre los modelos estructurales generados por este modelador y la estructura cristalina de la enzima nativa. Esta aproximación tiene en cuenta los valores de *RMSD* obtenidos a partir de alineamientos estructurales, donde valores cercanos a 0 implican un mayor grado de ajuste de los modelos estructurales (Rayan, 2009).

El análisis de acoplamiento molecular revela que la estructura nativa y los modelos estructurales generados mantienen una interacción favorable con el TAG. Este tipo de interacción proteína-ligando ha sido reportada previamente para la enzima nativa por Senthilkumar et al. (2015). BSLA_SM2 registró un valor significativamente más negativo de energía libre de unión respecto a la enzima nativa, lo cual sugiere que esta variante puede tener un mayor potencial como catalizador. BSLA_SM1 registró valores de ΔG mayores, por este motivo no se llevaron a cabo simulaciones posteriores con esta última. Se deben tener en cuenta otros triglicéridos para evaluar de forma más detallada la interacción de los modelos estructurales con el aceite de palma.

La simulación de dinámica molecular demostró que las versiones solubles mantienen una elevada estabilidad estructural en un sistema acuoso, comparable a la estructura nativa. La dinámica molecular de los modelos estructurales en un sistema bifásico revela que BSLA_SM2 es susceptible a perder su conformación estructural frente a este sistema de solvente. El análisis de las estructuras secundarias indica que BSLA_SM2 tiende a perder su conformación estructural en los componentes del Giro γ y el Giro β . Es necesario ampliar el tiempo de simulación para los

modelos estructurales en un sistema bifásico y evaluar diferentes condiciones de temperatura para la simulación.

La sobreexpresión de las versiones solubles en *E. coli*, se concentró principalmente en la fracción periplasmática. Se aprecia una mayor tasa de crecimiento de las bacterias transformadas cuando estas son sometidas a inducción proteica mediada por IPTG. Es conocido que la expresión de proteínas recombinantes puede tener un efecto positivo en el metabolismo del hospedero (Rosano et al., 2014). La concentración proteica en extractos periplasmáticos fue relativamente baja para ambas enzimas. Esto es consistente con trabajos previos para la sobreexpresión de la enzima nativa en *E. coli* utilizando el vector pET-22b (Rahmen, 2015)

Las versiones solubles BSLA_SM2 y BSLA_SM5 demostraron actividad hidrolítica frente a *p*-NPB. Debido a que *E. coli* carece de lipasas que puedan hidrolizar lípidos (3.22×10^{-8} moles/g*min) (Nantel et al., 1973) o ésteres (Antonczak et al., 2009) de manera eficiente, cualquier actividad hidrolasa o lipasa debe provenir de la enzima recombinante. La actividad hidrolítica registrada se concentró en la FP y en la FSC, lo cual es compatible con lo observado en la electroforesis SDS-PAGE.

Las versiones solubles BSLA_SM2 y BSLA_SM5, presentaron una actividad hidrolasa favorable a 40°C y (Figura 7A). Estos resultados coinciden con el valor óptimo de actividad reportado para la versión nativa (35 °C – 40 °C, pH 9-10) (Lesuisse et al., 1993; Rajakumara et al., 2008). Interesantemente, BSLA_SM2 mantiene alrededor del 35% de su actividad al ser incubada a 55 °C, indicando que las mutaciones aplicadas pueden favorecer la termoestabilidad de esta variante.

La aparición del singlete a 3.67 ppm en los espectros de RMN de reacciones de transesterificación enzimática es una señal característica de presencia de FAME (Knothe, 2001;

Mello et al., 2008). Lo anterior demuestra la capacidad de las versiones solubles para sintetizar metil ésteres. No obstante, se obtuvo un bajo rendimiento en la producción de FAME y de productos derivados de la hidrólisis de triglicéridos. Esto puede deberse a diversos factores como: 1) la baja carga enzimática empleada en la reacción (1U), 2) efecto de las mutaciones aplicadas 3) exceso de agua en la reacción, 4) inhibición de la enzima mediada por el metanol, 5) tiempo corto de reacción (Norjannah et al., 2016). El bajo rendimiento de las enzimas mutantes en la síntesis de FAME podría ser mejorado utilizando proteína purificada para de esta forma aumentar la concentración de catalizador en la reacción.

Este trabajo proporciona una caracterización preliminar de dos enzimas con potencial para la producción de biodiesel. Pese a que se obtuvo un rendimiento bajo en la producción de FAME, la producción de biodiesel puede ser optimizada. En una fase posterior de este trabajo se debe implementar una metodología para evaluar la solubilidad de las enzimas purificadas

6. Conclusiones

El análisis *in silico* permitió obtener dos variantes solubles de BSLA mediante diseño racional. Las pruebas de dinámica molecular en un sistema de solvente bifásico, en conjunto con el análisis de acoplamiento molecular, demostraron ser eficaces al evaluar de forma preliminar la viabilidad de ambos mutantes en reacciones de transesterificación.

Se apreció un mayor crecimiento de las cepas recombinantes e inducidas con IPTG. El mejor tiempo para recuperar la proteína fue a 3 h de inducción.

Se demostró la actividad hidrolasa de los extractos crudos de las versiones solubles recombinantes frente al *p*-Nitrofenil butirato. BSLA_SM2 mantuvo parte de su actividad hidrolasa a 55 °C.

Se encontró que la producción de las versiones solubles en la fracción del periplasma fue relativamente baja (<0.5 mg/mL). Debido a esto, el proceso de liofilización fue indispensable para la aplicación de ambas enzimas en reacciones de transesterificación.

La producción de FAME por transesterificación enzimática, fue demostrada para ambas lipasas mutantes. El rendimiento estimado de la reacción de transesterificación e hidrólisis fue bajo para ambas versiones solubles.

7. Recomendaciones

Llevar a cabo simulaciones de acoplamiento molecular de las versiones solubles con sustratos adicionales al TAG.

Purificar ambas enzimas mutantes para evaluar la solubilidad respecto a la lipasa nativa. Lo anterior también permitiría aumentar el número de unidades enzimáticas para llevar a cabo pruebas de transesterificación.

Ampliar los puntos de medición de temperatura y pH en reacciones de hidrólisis de las versiones solubles frente al *p*-NPB. Es recomendable utilizar otros *p*-Nitrofenil-ésteres de diversas longitudes de cadena para evaluar la especificidad de las versiones solubles por el sustrato.

Ensayar diferentes relaciones molares de aceite palma y metanol en reacciones de transesterificación utilizando las versiones solubles de BSLA como catalizador.

Referencias Bibliográficas

- Acharya, P., Rajakumara, E., Sankaranarayanan, R., & Rao, N. M. (2004). Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase. *Molecular Biology*, 341, 1271–1281. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.059>
- Adamczak, M., & Krishna, S. H. (2004). Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 251–264. <http://doi.org/10.4061/2010/862537>.
- Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical Reviews*, 106(5), 1589–1615. <https://doi.org/10.1021/cr040426m>
- Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Gready, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, 26(5), 531–568. <https://doi.org/10.1002/med.20067>
- Barbosa, A. S., Lisboa, J. A., Silva, M. A. O., Carvalho, N. B., Pereira, M. M., Fricks, A. T., Soares, C. M. F. (2016). The novel Mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. *Quimica Nova*, 39(4), 415–422. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160042>
- Barraza J, Hernandez. J (2016). Expresión heteróloga de la lipasa A de *Serratia marcescens* (PDB: 2QUA) en *Escherichia coli* BL21 (DE3): uso de extractos crudos para la transesterificación enzimática del aceite de palma africana con etanol (biodiésel) (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative H-NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
- Bielecki, S. (2009). Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the

- process. *Renewable Energy*, 34, 1185-1194. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.11.013>
- Biermann, U., Bornscheuer, U., Meier, M. A. R., Metzger, J. O., & Schäfer, H. J. (2011). Oils and Fats as Renewable Raw Materials in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(17), 3854–3871. <https://doi.org/10.1002/anie.201002767>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/351491a0>
- Chennamsetty, N., Voynov, V., Kayser, V., Helk, B., & Trout, B. L. (2009). Prediction of Aggregation Prone Regions of Therapeutic Proteins. *Physical Chemistry B*. 114 (19), 6614–6624. <http://doi.org/10.1021/jp911706q>
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852–1858. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Cyclor, M., & Schrag, J. D. (1997). Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods in Enzymology*, 284(1992), 3–27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)84003-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)84003-7)
- Dartois, V., Baulard, a, Schanck, K., & Colson, C. (1992). Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1131(3), 253–260. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90023-S](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90023-S)
- Dartois, V., Coppee, J.Y., Colson, C., & Baulardt, A. (1994). Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1670–1673.
- De Bernardez Clark, E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(2), 157–163. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80109-2)

- Dill, K. a, & Shortie, D. (1991). Denatured states of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 60, 795-825. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.004051>
- Doi, R. H., Wong, S. L., & Kawamura, F. (1986). Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins. *Trends in Biotechnology*, 4(9), 232–235. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(86\)90116-2](https://doi.org/10.1016/0167-7799(86)90116-2)
- Du, W., Xu, Y., Liu, D., & Zeng, J. (2004). Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.04.004>
- Dutra, J. C. V, Da C. Terzi, S., Bevilaqua, J. V., Damaso, M. C. T., Couri, S., Langone, M. A. P., & Senna, L. F. (2008). Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 147(1–3), 63–75. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8068-0>
- Eggert, T., Brockmeier, U., Dröge, M. J., Quax, W. J., & Jaeger, K. E. (2003). Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: Regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiology Letters*, 225(2), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00536-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00536-6)
- Fang, Z., Zhou, P., Chang, F., Yin, Q., Fang, W., Yuan, J., Xiao, Y. (2014). Structure-based rational design to enhance the solubility and thermostability of a bacterial laccase Lac15. *PLoS ONE*, 9(7), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102423>
- Fedepalma. (2017). Entorno económico y desempeño del sector palmero en 2016 y perspectivas 2017, 68. Consultado en: [http://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Fedepalma/Semanario Palmero/30 de marzo/27032017_Contexto_Desempeño_2016_fin.pdf](http://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Fedepalma/Semanario_Palmero/30_de_marzo/27032017_Contexto_Desempeño_2016_fin.pdf)
- Fedosov, S. N., Brask, J., Pedersen, A. K., Nordblad, M., Woodley, J. M., & Xu, X. (2013). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 85–86, 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.011>
- Fjerbaek, L., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5),

1298–1315. <https://doi.org/10.1002/bit.22256>

Georgiou, G., & Valax, P. (1999). Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods in Enzymology*, 309(1975), 48–58. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09005-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09005-9)

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>

Hughes, S. R., Moser, B. R., Harmsen, A. J., Bischoff, K. M., Jones, M. A., Pinkelman, R., Caimi, P. (2011). Production of candida antarctica lipase b gene open reading frame using automated pcr gene assembly protocol on robotic workcell and expression in an ethanologenic yeast for use as resin-bound biocatalyst in biodiesel production. *Journal of Laboratory Automation*, 16(1), 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.04.002>

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

James, M., Murtola, T., Schulz, R., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS : High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X*, 1, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>

Kaur, J. (2017). Studies on recombinant lipase production by E. Coli: effect of media and bacterial expression system optimization. *Molecular Biology: Open Access*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.15406/ijmboa.2017.02.00008>

Kelly, L. A., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M., & Sternberg, M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>

Knothe, G. (2001). Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel. *Transactions of the ASAE*, 44(2): 193–200. <http://doi.org/10.13031/2013.4740> @2001.

Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86(10), 1059–1070. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.11.002>

- Korman, T. P., Sahachartsiri, B., Charbonneau, D. M., Huang, G. L., Beauregard, M., & Bowie, J. U. (2013). Dieselzymes: Development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-70>
- Kourist, R. H. (2014). Lipases as sustainable biocatalysts for the sustainable industrial production of fine chemicals and cosmetics. *JSM Biotechnology and Biomedical Engineering*, 2(1): 1029. <http://doi.org/10.5772/61261>.
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophysical Journal*, 102(8), 1907–1915. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.060>
- Kumari, V., Shah, S., & Gupta, M. N. (2007). Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy and Fuels*, 21(1), 368–372. <https://doi.org/10.1021/ef0602168>
- Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 216(1), 155–160. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18127.x>
- Leung, D. Y. C., Wu, X., & Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>
- Li, M., Su, Z. G., & Janson, J. C. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.08.023>
- Luque, R., Lovett, J. C., Datta, B., Clancy, J., Campelo, J. M., & Romero, A. A. (2010). Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. *Energy & Environmental Science*, 3(11), 1706. <https://doi.org/10.1039/c0ee00085j>
- Malde, A. K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P. C., Mark, A. E. (2011). An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository : Version 1 . 0, 4026–4037. <http://doi.org/10.1021/ct200196m>.

- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K. E., & Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31477–31483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704942200>
- Mello, V. M., Oliveira, F. C. C., Fraga, W. G., Claudia, J., & Suarez, P. A. Z. (2008). Determination of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel samples obtained by esterification using ¹ H-NMR spectroscopy, (5), 1051–1054. <https://doi.org/10.1002/mrc.2282>
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-petjingell, C., Sturtevant, J., & King, J. (1991). Global Suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science*, 253(5015), 54-8. <http://doi.org/10.1126/science.1648264>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Nieva-echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2014). A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *FRIN*, 66, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.031>
- Norjannah, B; Chyuan Onga ; Masjukia, H. H. (2016). Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Advances*, 6, 60034–60055. <https://doi.org/10.1039/C6RA08062F>
- Novagen. (2005). pET system manual. 11th edition
- Ocampo, S. (2009). Agroindustria y conflicto armado El caso de la palma de aceite. *Colombia Internacional*, 70, 169–190. Retrieved from <http://colombiainternacional.uniandes.edu.co/view.php/487/view.php%5Cn>
- Oicoechea, G. (2008). Characterization of Cod Liver Oil by Spectroscopic Techniques . New Approaches for the Determination of Compositional Parameters , Acyl Groups , and Cholesterol from ¹H Nuclear Magnetic Resonance and Fourier Transform Infrared Spectral Data. *Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9072–9079. <http://doi.org/>

10.1021/jf801834j

Para, R. (2015). Esterificación Y Transesterificación De Aceites Residuales Para Obtener Biodiesel. *Luna Azul*, (40), 25–34. <https://doi.org/10.17151/luaz.2015.40.3>

Parawira, W. (2009). Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2), 82–93. <https://doi.org/10.1080/07388550902823674>

Rahmen, N., Schlupp, C. D., Mitsunaga, H., Fulton, A., Aryani, T., Esch, L., Büchs, J. (2015). A particular silent codon exchange in a recombinant gene greatly influences host cell metabolic activity. *Microbial Cell Factories*, 14, 156. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0348-8>.

Rajakumara, E., Acharya, P., Ahmad, S., Sankaranaryanan, R., & Rao, N. M. (2008). Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784(2), 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.012>

Rincón, S., & Martínez, D. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria An Analysis of the Properties of Oil Palm in the Development of the its Industry Introducción. *PALMAS*, 30(2), 11–24.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27(4), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.008>

Roodveldt, C., Aharoni, A., & Tawfik, D. S. (2005). Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1.), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.001>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Serrano, L. (2004). Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*,

22(10):1302-6. <https://doi.org/10.1038/nbt1012>

- Ruiz, A. (2003). ¹H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *Lipid Science and Technology*, 105, 502–507. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300799>
- Sambrook, J., Russell, R.W.(2001). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold spring harbor laboratory press*, 2(8), 658-662. <http://doi.org/10.12691/education-2-8-14>
- Schrag, J. D., & Cygler, M. (1997). Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods in Enzymology*, 284(1973), 85–107. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)84006-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)84006-2)
- Singh, B., Bulusu, G., & Mitra, A. (2015). Understanding the thermostability and activity of *Bacillus subtilis* lipase mutants: Insights from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(2), 392–409. <https://doi.org/10.1021/jp5079554>
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(2), 244–248. <https://doi.org/10.1093/nar/gki408>
- Soininen, P. (2008). Quantitative ¹H NMR Spectroscopy - Chemical and Biological Applications. (Tesis doctoral), University of Kuopio.
- Song, Z., Wang, Y., Li, G., Tan, W., Yao, S. (2015). A novel ¹H NMR spectroscopic method for determination of glycidyl fatty acid esters coexisting with acylglycerols. *Lipid Science and Technology*, 117(7), 918-925. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400332>
- Sormanni, P., Aprile, F. A., & Vendruscolo, M. (2015). The CamSol Method of Rational Design of Protein Mutants with Enhanced Solubility. *Journal of Molecular Biology*, 427(2), 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.026>

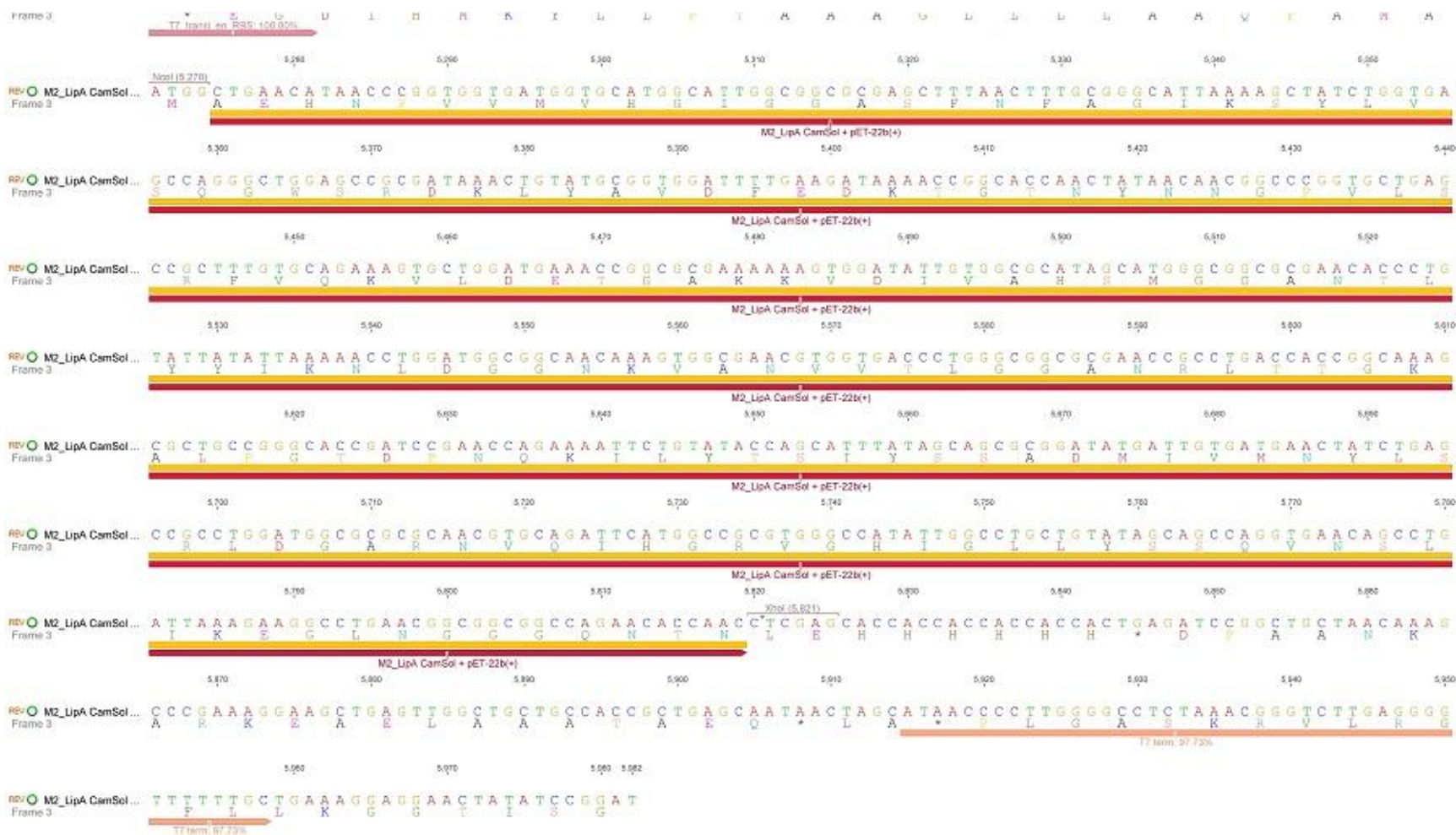
- Sotoft, L. F., Rong, B. G., Christensen, K. V., & Norddahl, B. (2010). Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. *Bioresource Technology*, 101(14), 5266–5274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.130>
- Steiner, K., & Schwab, H. (2012). Recent Advances in Rational Approaches for Enzyme Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209010. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209010>
- Stöckel, J., Döring, K., Malotka, J., Jähnig, F., & Dornmair, K. (1997). Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimeric class II major histocompatibility complex (MHC) molecules. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 248(3), 684–691. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00684.x>
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., & Farid, M. M. (2011). A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. *Enzyme Research*, 2011, 1–25. <https://doi.org/10.4061/2011/468292>
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2007). Amino acid contribution to protein solubility : Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *Molecular Biology*. 366(2), 449-60. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.026>
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00641-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00641-1)
- U.S. Energy Information Administration. (2016). Monthly Energy Review. Consultado en: <http://www.eia.gov/totalenergy/data/monthly>.
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>

- Ventura, S. (2005). Sequence determinants of protein aggregation: Tools to increase protein solubility. *Microbial Cell Factories*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-11>
- Waldo, G. S. (2003). Genetic screens and directed evolution for protein solubility. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00017-0)
- Xiao, M., Mathew, S., & Obbard, J. P. (2009). Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. *GCB Bioenergy*, 1(2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01009.x>
- Yang, H., Liu, L., Li, J., Chen, J., & Du, G. (2015). Rational Design to Improve Protein Thermostability: Recent Advances and Prospects. *ChemBioEng Reviews*, 2(2), 87–94. <https://doi.org/10.1002/cben.201400032>
- Yang, M., Yu, X., Zheng, H., Sha, C., Zhao, C., Qian, M., & Xu, Y. (2015). Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factory*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0225-5>
- Yang, Y., Niroula, A., Shen, B., & Vihinen, M. (2017). Sequence analysis PON-Sol : prediction of effects of amino acid substitutions on protein solubility. *Molecular Sciences*, 32(2), 2032–2034. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw066>
- Ying, M., & Chen, G. (2007). Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137(1), 793–803. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9098-3>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zhou, B., Xing, L., Wu, W., Zhang, X. E., & Lin, Z. (2012). Small surfactant-like peptides can drive soluble proteins into active aggregates. *Microbial Cell Factories*, 11, 2–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-10>

Apéndices**Apéndice A. Parámetros del equipo RMN1H en la detección-cuantificación de FAEE y perfil de ácidos grasos**

Espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz	
Densidad de flujo magnético (T)	9.4
Patrón de referencia	TMS
Programación de pulsos	zg30
Scans	8-16
Sonda (mm)	5
Temperatura (K)	298.15
Tiempo de adquisición (s)	5.45
Tiempo entre pulsos (s)	1
Ventana espectral (ppm)	15 (6009.62 Hz)
Tamaño de la muestra (mg)	8-12
Disolvente	CDCl ₃

Apéndice B. Traducción del gen de la versión soluble BSLA_SM2.



Apéndice C. Traducción del gen de la versión soluble BSLA_SM5.

