

Expresión heteróloga de la lipasa a de *Bacillus subtilis* (BSLA) en *Escherichia coli* BL21 (DE3): transesterificación enzimática mediante el uso de extractos crudos, aceite de palma y metanol.

Jeffersson Orlando Bautista Villabona

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

Director

Jorge Hernández Torres

Ph.D. en Ciencias

Co- directora

Oriana Danuta Serna Daza

BSc. Biología

Co- director

Jefferson Yadir Barraza Gómez

BSc. Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

A los profesores Jorge Hernández Torres, Oriana Danuta Serna Daza, y al investigador Jefferson Yadir Barraza Gómez por llevar a cabo la dirección de este trabajo y aportar el conocimiento necesario para su finalización.

Al Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular CINBIN por proporcionar los recursos necesarios que permitieron el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Supercomputación y Cálculo Científico de la Universidad Industrial de Santander SC3-UIS, por el acceso a los recursos de informáticos empleados en el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander y a la investigadora Mary Helena Torres por los servicios prestados.

A los demás compañeros que hicieron parte del CINBIN durante todo este proceso.

Este proyecto hace parte del macroproyecto 'EVALUACIÓN DE LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON ETANOL (BIODIÉSEL), 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	17
1.1 Objetivo General.....	17
1.2 Objetivos Específicos.....	17
2. Marco Teórico.....	18
2.1 Producción de biodiésel (FAME) mediante transesterificación enzimática.	18
2.2 Lipasas.	19
2.3 Lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i> (BSLA).....	20
2.4 Actividad esterasa y actividad transesterasa de BSLA usando aceite de palma y metanol. ...	21
2.5 Sobreexpresión recombinante de BSLA.	22
2.6 Expresión heteróloga, sistema de expresión y mecanismo de inducción.	24
2.7 Análisis de dinámica molecular	26
2.8 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN–1H)	26
3. Materiales y Métodos.....	27
3.1 Elección de la lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i>	27
3.2 Análisis de dinámica molecular	27
3.3 Construcción de un vector de expresión recombinante con el gen <i>LipA</i>	28
3.4 Transformación del hospedero de expresión	28

3.5 Sobreexpresión recombinante de BSLA.....	29
3.5.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE	29
3.6 Determinación de la actividad hidrolítica frente al <i>p</i> -Nitrofenil butirato (<i>p</i> -NPB)	29
3.6.1 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford y cálculo de actividad específica.	30
3.6.2 Determinación del efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de BSLA	31
3.7 Evaluación de la síntesis de FAME mediante transesterificación enzimática utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA como catalizador.	31
3.7.1 Concentración de las muestras.....	31
3.7.2 Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite crudo.....	31
3.7.3 Transesterificación enzimática.....	33
3.7.4 Identificación y cuantificación de FAME.....	34
3.8 Análisis estadístico de los resultados de cuantificación	34
4. Resultados.....	34
4.1 Análisis de dinámica molecular	34
4.1.1 Estabilidad estructural en un sistema acuoso.....	34
4.1.2 Sistema bifásico	36
4.2 Construcción de un vector de expresión recombinante con el gen <i>LipA</i>	37
4.3 Transformación del hospedero de expresión	38
4.4 Sobreexpresión recombinante de BSLA.....	39
4.4.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE	40
4.5 Determinación de la actividad hidrolítica frente al <i>p</i> -Nitrofenil butirato (<i>p</i> -NPB)	42
4.5.1 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford	44

4.5.2 Determinación el efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de BSLA	45
4.6 Evaluación de la síntesis de FAME mediante transesterificación enzimática utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA como catalizador.....	47
4.6.1 Concentración de las muestras.....	47
4.6.2 Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite crudo.....	48
4.6.3 Identificación y cuantificación de FAME.....	49
4.7 Análisis estadístico.....	51
5. Discusión.....	52
6. Conclusiones.....	56
7. Recomendaciones	57
Referencias Bibliográficas.....	58
Apéndices.....	69

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura tridimensional de la lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i> BSLA.	21
Figura 2. Formula de estimación de actividad específica a partir de la hidrólisis del p-NPB. (Quinn et al. 1982).	30
Figura 3. Trayectoria del RMSD de BSLA en un sistema acuoso durante 50 ns. Representando la estabilidad estructural de la enzima a lo largo del tiempo.	35
Figura 4. Análisis de la estabilidad estructural de la estructura secundaria de BSLA en el sistema acuoso durante 50 ns. Se pueden apreciar los diferentes componentes de la estructura secundaria y su estabilidad a través del tiempo.	36
Figura 5. Trayectoria RMSD de BSLA bajo un sistema bifásico durante 10 ns. Representando la estabilidad estructural de la enzima a lo largo del tiempo bajo un sistema compuesto por metanol y un TAG abundante en el aceite de palma.	36
Figura 6. Análisis de la estabilidad estructural de la estructura secundaria de BSLA en el sistema bifásico a lo largo de 10 ns. Se pueden apreciar los diferentes componentes de la estructura secundaria y su estabilidad a través del tiempo.	37
Figura 7. Construcción del vector de expresión recombinante para BSLA. El gen LipA se representa con la flecha roja, unido a la secuencia líder peIB y al Histag (azules) resaltando los sitios de restricción usados. También se representan otros componentes del vector como el gen	

de resistencia a ampicilina AmpR, el gen regulador lacI, el origen de replicación ori y el gen rop.

..... 38

Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET22b (+) BSLA. Se muestra el crecimiento de la cepa transformada en condiciones de inducción y no inducción a una DO de 600 nm. Cada curva representa el promedio de tres mediciones

independientes \pm desviación estándar (SD). 40

Figura 9. Gel de SDS-PAGE de las fracciones celulares obtenidas luego de 3h de inducción. Los marcadores utilizados (M) corresponden a: *PageRuler*TM #26614 unstained (200 kDa) y *PageRuler*TM #26616 prestained (180 kDa). Las fracciones celulares corresponden a: fracción total (TF); fracción del medio (MF); fracción de periplasma (PF); fracción de citoplasma soluble (CSF) y fracción de citoplasma insoluble (CIF). 41

Figura 10. Gel de SDS-PAGE de la fracción del periplasma para los tiempos de inducción monitoreados. (0, 1, 3, 6, 24 h de inducción) y control negativo (-): “no inducción”. Los marcadores utilizados (M) corresponden a *PageRuler* *PageRuler*TM #26614 (200 kDa) y

*PageRuler*TM #26616 (180 kDa) 42

Figura 11. Curvas de actividad hidrolasa de cada una de las fracciones celulares frente al p-NPB. Medio (MF), citoplasma soluble (CSF), citoplasma insoluble (CIF)) y periplasma (PF). Cada curva representa el promedio \square de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD)

representada por el área sombreada. 43

Figura 12. Curvas de actividad hidrolasa frente al p-NPB para la fracción de periplasma a las 0,1,3,6 y 24 h de inducción. Cada curva representa el promedio de tres mediciones

independientes \pm desviación estándar (SD). 44

Figura 13. Variación de la actividad hidrolasa frente a los cambios de pH, para la fracción de periplasma a las 3 horas de inducción. Cada curva representa el promedio \bar{x} de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).	46
Figura 14. Variación de la actividad hidrolasa frente a los cambios de temperatura, para la fracción de periplasma a las 3 h de inducción. Cada curva representa el promedio \bar{x} de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).	46
Figura 15. Actividad relativa de las muestras obtenidas para los extractos crudos de BSLA.	47
Figura 16. Proporción molar del aceite de palma crudo. Los valores representan promedio de tres mediciones independientes.....	49
Figura 17. Determinación de la síntesis de FAME mediante RMN- ¹ H. Se parecía la comparación entre el aceite crudo y un espectro luego de la reacción de transesterificación.	50
Figura 18. Modelo lineal para la correlación entre la relación molar y porcentaje de FAME obtenido. Donde Y= porcentaje de FAME; a= intercepto; b= pendiente de la recta; X= Relación molar empleada.	52

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Determinación de ácidos grasos según Knothe <i>et al.</i> 2004; Anderson <i>et al.</i> 2012. Tomada y modificada de Barraza <i>et al.</i> 2016. Donde: A= área de barrido; N= moles; N _x = moles de X compuesto.....	32
Tabla 2. Cuantificación de MAG, DAG, TAG, FAA y FAEE siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría <i>et al.</i> (2014 y 2015) y modificaciones de Barraza <i>et al.</i> (2016). Donde: A= área, N= moles, N _x = moles de un compuesto x, N _{totales} = $\sum N_x$, Pc= constante de proporcionalidad.	32
Tabla 3. Resultados de determinación de proteína total de los extractos crudos. Donde: la pendiente se obtuvo de la hidrólisis del <i>p</i> -NPB y la proteína total en mg representa la cantidad de enzima presente en 1 mL de extracto celular.	45
Tabla 4. Resultados de determinación de proteína total de algunos extractos crudos tras ser concentrados mediante liofilización. Donde: la pendiente se obtuvo de la hidrólisis del <i>p</i> -NPB y la proteína total en mg representa la cantidad de enzima presente en 1 mL de extracto celular liofilizado.	47
Tabla 5. Perfil de ácidos grasos presentes en muestras de aceite de palma crudo (<i>Elaeis guineensis</i>). Los resultados corresponden al promedio de tres mediciones independientes \pm SD.	48
Tabla 6. Cuantificación de los productos de transesterificación con extractos crudos de BSLA.	51

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Parámetros del equipo RMN–1H en la detección-cuantificación de FAME y perfil de ácidos grasos.....	69
Apéndice B. Traducción del gen LipA BSLA.....	70
Apéndice C. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre el porcentaje de FAME obtenido y las relaciones molares usadas.	71
Apéndice D. Resultados de la corrección de Bonferroni empleada como prueba a posteriori. Método: 95,0 % porcentaje Bonferroni	72

Resumen

TÍTULO: EXPRESIÓN HETEROLOGA DE LA LIPASA A DE *Bacillus subtilis* (BSLA) EN *Escherichia coli* BL21 (DE3): TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA MEDIANTE EL USO DE EXTRACTOS CRUDOS, ACEITE DE PALMA Y METANOL *

Autor: Jeffersson Orlando Bautista Villabona **

Palabras Claves: Biodiésel, lipasa, BSLA, extractos crudos, transesterificación enzimática, aceite de palma, metanol, FAME.

La síntesis química de biodiésel genera residuos contaminantes; una solución biotecnológica a este problema es la transesterificación enzimática usando lipasas. No obstante, para Colombia, escalarlo a nivel industrial resulta inviable dados los costos de adquisición de las lipasas importadas (U.S.\$ 1000-2000/kg). Una solución potencial a este problema es producir localmente lipasas en hospederos bacterianos. En este trabajo, se demostró la capacidad de la lipasa A de *Bacillus subtilis* (BSLA) para catalizar la transesterificación entre el aceite de palma africana y el metanol. Previamente, se evaluó in silico la estabilidad estructural de BSLA (código PDB 2qxu) en una mezcla de metanol y aceite de palma crudo. Posteriormente, se clonó el gen LipA en el vector pET22b y se indujo la sobreexpresión heteróloga en células de *Escherichia coli* transformadas, hasta alcanzar los máximos niveles de expresión. La producción recombinante de LipA se monitoreó mediante SDS-PAGE y por actividad hidrolítica sobre p-Nitrofenil butirato. Se realizaron ensayos de transesterificación usando extractos crudos de *E. coli* inducida con IPTG. Los resultados revelaron que BSLA cataliza reacciones de transesterificación, con una tasa de producción de 10.7% de metilésteres. Se concluyó que BSLA tiene potencial para producir biodiésel, aunque resta comparar su eficacia con las lipasas comerciales.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. Co-Director: Oriana Danuta Serna Daza, BSc. Biología. Co-Director: Jefferson Yadir Barraza Gomez, Bsc. Química

Abstract

TITLE: HETEROLOGOUS EXPRESSION OF *Bacillus subtilis* LIPASE A (BSLA) IN *Escherichia coli* BL21 (DE3): ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION USING CRUDE PALM OIL AND METHANOL*

AUTHOR: JEFFERSSON ORLANDO BAUTISTA VILLABONA**

KEYWORDS: Biodiésel, Lipase, BSLA, Raw extracts, Enzymatic transesterification, Palm oil, Methanol. FAME.

The production of biodiesel by enzymatic transesterification is a potential alternative to solve the problems involved in conventional synthesis. Despite this, the use of lipases on an industrial scale is limited by the high prices in developing countries such as Colombia. In fact, the import of 1 kg of lipase from *Candida antarctica* (CALB) may achieve U.S. \$ 1000. A possible solution to this problem is the local production of lipases. In this work, the heterologous expression of *Bacillus subtilis* lipase A (BSLA) was carried out in *Escherichia coli* BL21 (DE3), to demonstrate the ability of the enzyme to catalyze the transesterification of crude palm oil, using methanol as acyl acceptor. Initially, functional and structural stability predictions were made *in silico*, based on the 2qxu crystal structure registered in the PDB. Subsequently, a synthetic *LipA* gene was cloned in the pET22b (+) vector and an efficient expression system was standardized, with IPTG as the inducing agent. The best expression was obtained 3 h after induction. The recombinant production of the enzyme was verified, as well as the best conditions for its hydrolytic activity, which agreed with the literature. Finally, transesterification tests were carried out using crude extracts with ~1 U of LipA and the reaction parameters were established, depending on the molar ratio of the alcohol to the substrate. The results showed the translation capacity of BSLA, with FAME yields of 10.73% at a 9:1 of molar ratio for methanol: oil, pH 9 and 35 °C, for 6 h of reaction. It was concluded that LipA has a potential use as a biocatalyst in the production of biodiesel, although its effectiveness in comparison with other reference fungal and bacterial lipases has not yet been demonstrated.

* Research Work

** Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D Co- Director: Oriana Danuta Serna Daza, BSc. Biology. Co- Director: Jefferson Yadir Barraza Gómez, Bsc. Chemistry.

Introducción

La producción colombiana de aceite de palma ha venido aumentando desde la última década del siglo XX (Ocampo *et al.* 2009). Al cierre del año 2017 la producción alcanzó 1.632.667 ton, mostrando un aumento del 42% con respecto al 2016. De esta manera, Colombia se ha posicionado como el cuarto productor a nivel mundial (Fedepalma 2017; Naylor *et al.* 2017). Este crecimiento es debido a la demanda constante de grasas y aceites a nivel mundial, y la posibilidad de usar este tipo de productos como biocombustibles (Ocampo *et al.* 2009).

El biodiésel es un biocombustible formado a partir de monometilésteres (FAME- *Fatty Acid Methyl Esters*) o monoalquilésteres (FAAE), obtenidos a partir de aceites vegetales, el cual constituye una alternativa atractiva para reemplazar el diésel convencional. Esto se debe a que sus emisiones de CO₂ son más bajas, es obtenido a partir de fuentes biológicas renovables y es biodegradable (Luque *et al.* 2010). La producción mundial para 2016 alcanzó los 35 mil millones de litros, de los cuales 600 millones fueron producidos en Colombia (Naylor *et al.* 2017). Su síntesis normalmente se da mediante transesterificación alcalina de triacilgliceroles (TAG), empleando un alcohol como aceptor acilo (Szczesna *et al.* 2009). Sin embargo, la presencia inevitable de agua en la reacción conduce a la formación de ácidos grasos libres (FFA – *Free Fatty Acids*), productos no deseados que conllevan a una saponificación (Du *et al.* 2004) y no son convertibles en FAME (Leung *et al.* 2010). Esta contaminación trae como consecuencia el incremento de un número de pasos adicionales de purificación, lo que aumenta los gastos energéticos de producción y por ende mayores costos de operación.

Una alternativa promisorio frente a esta situación es llevar a cabo las reacciones de transesterificación con el uso de lipasas. Dado que pueden catalizar la transesterificación de TAG con alcoholes de cadena corta, al igual que los catalizadores básicos, las tasas de conversión son similares (~90-98%) (Van Gerpen 2005; Kumari *et al.* 2007). La ventaja de las lipasas radica en que pueden convertir al mismo tiempo TAG y FFA a FAME, incluso en presencia de grandes cantidades de agua (Hasan *et al.* 2006). Además, las lipasas pueden ser separadas fácilmente del glicerol residual y presentan una mayor compatibilidad con la materia prima, lo que les añade un valor agregado en el mercado (Lai *et al.* 2005; Kumari *et al.* 2007; Fjerbaek *et al.* 2009).

Sin embargo, el principal obstáculo radica en los altos costos de importación de la enzima (>1000 USD/kg), respecto a los catalizadores ácidos y alcalinos (Meher *et al.* 2006; Fjerbaek *et al.* 2009), por lo que la producción de biodiésel es actualmente el inviable. A pesar de esto, los costos de implementación de lipasas podrían mitigarse si se logra producir lipasas funcionales a nivel local.

En este contexto, el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología se encuentra realizando investigaciones relacionadas con la producción de lipasas recombinantes, que sean capaces de catalizar reacciones de transesterificación. Para ello, se han enfocado en la utilización de lipasas bacterianas que no necesiten maquinaria celular especializada como chaperonas y modificaciones postraduccionales y que cumplan con los estándares industriales para la síntesis de biodiésel.

Por lo anterior, el presente estudio busca establecer si la lipasa A de *Bacillus subtilis* es capaz de catalizar reacciones de transesterificación de aceite de palma africana (*Elaeis guineensis*), empleando metanol como aceptor acilo. Este constituye el primer paso para futuras investigaciones encaminadas al escalamiento industrial de producción de biodiésel mediante el uso de enzimas.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la actividad transesterasa de extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el gen *LipA* de *Bacillus subtilis* entre triglicéridos del aceite de palma africana y metanol como aceptor acilo.

1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la viabilidad de la BSLA como enzima promisorio mediante herramientas bioinformáticas.
2. Sobreexpresar la lipasa BSLA en *E. coli* BL21 (DE3).
3. Demostrar la actividad hidrolasa de los extractos crudos de BSLA recombinante frente al *para*-Nitrofenil butirato (*p*-NPB).
4. Determinar la variación de la actividad hidrolasa de BSLA recombinante en función del pH y la temperatura.
5. Comprobar la actividad transesterasa de los extractos crudos de BSLA recombinante utilizando aceite de palma africana y metanol.

2. Marco Teórico

2.1 Producción de biodiésel (FAME) mediante transesterificación enzimática.

El biodiésel es un combustible compuesto de ésteres metílicos o etílicos de ácidos grasos (FAME -*Fatty Acid Methyl Esters*- o FAEE -*Fatty Acid Ethyl Esters*-). Es obtenido a partir de fuentes renovables como los aceites vegetales (Van Gerpen 2005; Xiao *et al.* 2009). Uno de los aceites más usados en la producción de biodiésel es el aceite de palma africana (*Elaeis guineensis*), caracterizado por tener altos niveles de ácidos grasos saturados y TAG (Fjerbaek *et al.* 2009). La transesterificación es un proceso en el cual se produce un intercambio entre un éster (normalmente un TAG) y un alcohol (receptor de un grupo acilo), formando un FAME (Parawira 2009). En la reacción con TAG, se llevan a cabo una serie de reacciones reversibles en las que los productos intermedios son diacilgliceroles (DAG) o monoacilgliceroles (MAG) (Firdaus *et al.* 2016) y los productos finales, monoalquilésteres. Actualmente, el método más usado en la producción de biodiésel es la transesterificación química alcalina (Kay & Yasir 2012). No obstante, cuando los aceites vegetales contienen agua o altos niveles de FFA (*Free Fatty Acids*) —como el aceite de palma africana—, la reacción deriva en una saponificación (producto no deseado) y más FFA (Lai *et al.* 2005; Knothe 2005; Leung *et al.* 2010). Por ello, se requieren procesos adicionales para separar el biodiésel del agua, los jabones y los ácidos grasos libres (Leung *et al.* 2010).

Se ha investigado la producción enzimática de biodiésel mediante el uso de lipasas, las cuales catalizan la hidrólisis de ésteres *in vitro*. Estas pueden ser aplicadas en un amplio

rango de reacciones de bioconversión, incluyendo esterificación y transesterificación (Orçaire *et al.* 2006). La ventaja de emplear enzimas radica en la biocompatibilidad y en la aceptabilidad ambiental en los procesos biotecnológicos, conversión simultánea de TAG, DAG y MAG a FAME y menores temperaturas de reacción (Marchetti *et al.* 2007, Fjerbaek *et al.* 2009). No obstante, las lipasas también presentan desventajas, debido al decremento de la tasa de conversión con cada ciclo de uso y su estabilidad (Korman *et al.* 2013). Para superar estos problemas, se han diseñado reactores de biodiésel con reacciones en continuo, con adición del alcohol en múltiples pasos para evitar la desactivación de la enzima y la reducción de los tiempos de reacción (Gog *et al.* 2012) A pesar de estas mejoras, el escalamiento industrial continúa siendo inviable en muchos países (entre ellos Colombia), dados los costos de producción en comparación con la catálisis química (Eggert *et al.* 2002; Meher *et al.* 2006; Firdaus *et al.* 2016).

2.2 Lipasas.

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son una clase de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces éster de TAG, DAG o MAG para producir ácidos grasos libres. Son sintetizadas por animales, plantas y microorganismos (Treichel *et al.* 2010). Biotecnológicamente son relevantes gracias a: 1) capacidad de usar TAG, DAG, MAG y FFA en reacciones de hidrólisis y transesterificación; 2) baja inhibición del producto final de reacción; 3) rendimiento en medios no acuosos; 4) posibilidad de reutilización; 5) bajas temperaturas de reacción (Dutra *et al.* 2008; Bajaj *et al.* 2010); 6) la alta pureza con la que pueden ser obtenidas; y 7) no necesitan cofactores para catalítica (Dutra *et al.* 2008). Su sitio activo o triada catalítica consiste en una serina nucleofílica localizada en una región altamente conservada de un pentapéptido consenso (Gly-X-

Ser-X-Gly) (Eggert *et al.* 2000). De todas las lipasas estudiadas, las lipasas microbianas han mostrado mayor eficiencia en procesos industriales. Normalmente, los genes recombinantes de lipasas se han sobreexpresado en hongos hospederos como *Yarrowia lipolytica* o *Pichia pastoris*, dada la necesidad de la maquinaria eucariota para realizar modificaciones postraduccionales (glicosilación) con el fin de promover la estabilidad y funcionalidad de la enzima (Yang *et al.* 2015). Por esta razón, se busca sobreexpresar las lipasas en hospederos bacterianos eficientes y de bajo costo como *E. coli* (Blank *et al.* 2006; Boersma *et al.* 2008; Lara 2011).

2.3 Lipasa A de *Bacillus subtilis* (BSLA)

BSLA es una lipasa extracelular sintetizada por *Bacillus subtilis*, una bacteria Gram positiva aeróbica, comúnmente hallada en el suelo y en el agua (Eggert *et al.* 2001; Eggert *et al.* 2002; Eggert *et al.* 2003). Dicha enzima ya ha sido clonada con éxito mostrando actividad lipolítica (Lesuisse *et al.* 1993). BSLA posee un tamaño de 19.3 kDa capaz de hidrolizar ésteres de glicerol de longitud media y larga (Jaeger & Eggert 2002; Sánchez *et al.* 2002). Está compuesta por 181 aminoácidos, siendo la lipasa más pequeña reportada hasta el momento. Además, es de las pocas lipasas que no presenta dominio 'lid' o 'tapadera' facilitando su interacción con el sustrato sin necesidad de activación interfacial (van Pouderooyen *et al.* 2001). Su actividad óptima ocurre a 37 °C, pH 10. Muestra una mejora de actividad al adicionarse DMSO, máx. al 30%. En contraste, es inhibida por acetona e isopropanol en cualquier concentración. También presenta inhibición el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a concentraciones de 0.1 mM (70% de inhibición) y 1 mM (100%) (Lesuisse *et al.* 1993). BSLA puede ser estimulada con la adición de 10 mM Ca²⁺. La enzima hace parte de la familia de lipasas I, subfamilia 4 (lipasas y esterasas de cadenas

moderadamente termoestables). Presenta una estructura globular formada por seis hojas β paralelamente unidas a cinco α -hélices, con compactación mínima de giros α/β (Eggert *et al.* 2001; Eggert *et al.* 2002). Además, tampoco requiere glicosilación (Singh *et al.* 2015). Exhibe una alta similitud a la cutinasa y la acetilxilasa esterasa, en cuanto a su estructura y tamaño molecular (Kawasaki *et al.* 2002). La ausencia de dominio *lid* hace que BSLA interactúe fácilmente con un amplio rango de sustratos en los medios de reacción apolares (Dartois *et al.* 1994; Ying *et al.* 2007).

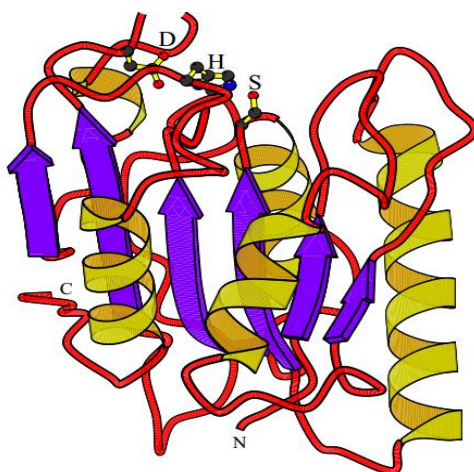


Figura 1. Estructura 3D de la lipasa A de *Bacillus subtilis* BSLA.

Triada catalítica: Asp (D), His (H); Ser (S). C y N representan los extremos carboxilo y amino terminales, respectivamente. Tomado de van Pouderooyen *et al.* 2001.

2.4 Actividad esterasa y actividad transesterasa de BSLA usando aceite de palma y metanol.

Las esterasas (EC 3.1.1.1) son un grupo diverso de hidrolasas de pequeños ésteres parcialmente solubles en agua, mientras que las lipasas hidrolizan TAG de cadenas largas insolubles en agua

(Jaegger *et al.* 1999; Mormeneo *et al.* 2008). Las esterases exhiben un comportamiento de tipo Michaelis–Menten, mientras que las lipasas usualmente presentan activación interfacial. Esta última consiste en un fuerte aumento de la actividad enzimática cuando los lípidos alcanzan el equilibrio entre el monómero, las micelas y los estados emulsionados. Pocas lipasas exhiben actividad esterasa (Mormeneo *et al.* 2008). BSLA ha sido clasificada como lipasa y a su vez como esterasa. Es capaz de hidrolizar ésteres de ácidos grasos con cadenas de diferentes longitudes, con preferencia por ésteres de ácidos grasos de longitud media (C:8 - C:14) (Dartois *et al.* 1992; Eggert *et al.* 2000). Dicha actividad esterasa se le atribuye a la variación en el motivo del pentapéptido Ala-His-Ser-Gln-Gly, en el que el residuo Ala se reemplaza por una Gly (Eggert *et al.* 2000). El sitio activo de BSLA está comprendido por los aminoácidos S77, D133 y H156 (**Figura 1**), y el oxianión está constituido por I12 y M78 (Singh *et al.* 2015). BSLA es muy estable en solventes hidrofóbicos orgánicos; su actividad se ve incrementada en presencia de 10-50% dietil éter, *n*-hexano, *n*-heptano, octano, ciclohexano, benceno y tolueno (Santaniello *et al.* 1993; Guncheva *et al.* 2011). Ying *et al.* 2007 mostraron la producción de biodiésel con BSLA; sin embargo, en su trabajo usaron aceite de cocina usado sin especificar su origen (animal o vegetal), ni su composición. Además, no usaron un mecanismo de expresión heteróloga ni establecieron las distintas variaciones en la actividad aciltransferasa de la enzima frente a cambios que afecten la enzima como temperatura, pH y relación molar.

2.5 Sobreexpresión recombinante de BSLA.

Pese a que LipA es secretada extracelularmente por *B. subtilis*, la expresión y estabilidad de la enzima se ven comprometidas dada la gran cantidad de proteasas que libera el hospedero nativo

(Chan *et al.* 2003; Guerrero-Olazarán *et al.* 2007). Se han empleado diversos vectores de secreción para BSLA como pBR322, YEplac112 y pUB110 (Brockmeier *et al.* 2006). El gen *LipA* ha sido sobreexpresado en organismos como *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *B. subtilis*, demostrando actividad hidrolasa en todos los hospederos ensayados (Sánchez *et al.* 2002). Además, se han establecido sitios de saturación en librerías de mutagénesis para BSLA, dando como resultado más de 3439 variantes de la proteína (Fulton *et al.* 2015). Es por ello que se ha optado por sobreexpresar *LipA* de manera heteróloga en *E. coli*, debido a que: 1) es un organismo bacteriano bien conocido a nivel genético; 2) permite usar gran variedad de vectores de expresión cepas con fines específicos; 3) presenta un rápido crecimiento y buena densidad celular en medios de crecimiento sin necesidades minerales complejas; 4) presenta cepas con deficiencia de proteasas como Lon y *OmpT*, *DegP* o *HtpR*, previniendo la degradación de proteínas extracelulares y foráneas como BSLA (Sugimura *et al.* 1988; Hannig *et al.* 1998; Guerrero-Olazarán *et al.* 2004; Terpe 2006).

La producción de LipA recombinante en *E. coli* presenta desventajas como: 1) el método de inducción y el medio de cultivo empleados afectan el rendimiento; 2) degradación de la proteína recombinante; y 3) dificultad para secretar proteínas insolubles al medio de cultivo (formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma) (Guerrero-Olazarán *et al.* 2004). No obstante, existen soluciones como: 1) la temperatura (>50 °C); 2) pH (a menor pH, menor estabilidad); 3) interacciones iónicas (Augustyniak *et al.* 2012; Augustyniak *et al.* 2013; Asoodeh *et al.* 2013). *E. coli* sigue siendo la mejor opción para sobreexpresar BSLA de forma heteróloga, ya que Rahmen *et al.* (2016) mostraron un efecto favorable en el metabolismo de *E. coli* BL21 (DE3) como organismo hospedero. Además, la producción de BSLA en *E. coli* posee una actividad específica de 0.13 U/mg, frente a *B. subtilis* (7×10^{-4} U/mg) en condiciones óptimas (Sánchez *et al.* 2002; Rahmen *et al.* 2016).

2.6 Expresión heteróloga, sistema de expresión y mecanismo de inducción.

Para la sobreexpresión heteróloga de enzimas recombinantes, se establece un sistema de expresión que consta del organismo hospedero y el vector de expresión. El hospedero bacteriano más usado es *E. coli* y la cepa BL21 debido a su deficiencia en proteasas como *OmpT* y *Lon*. Además, en sistemas de expresión como pET (Novagen®) dicha cepa posee ADN bacteriofágico (DE3) integrado, para permitir una evaluación correcta de la sobreexpresión (Sugimura *et al.* 1988; Novagen 2005). Por otra parte, el vector de expresión es un elemento móvil de ADN circular conocido como plásmido, el cual consta de una secuencia con los elementos necesarios para llevar a cabo funciones de autorreplicación y la expresión funcional de los genes que posee (entre ellos el gen de interés) y que posteriormente es incorporado dentro del hospedero mediante “transformación”. Seleccionando las células transformadas mediante el uso de antibióticos (normalmente ampicilina) (Voet *et al.* 2007). Dado que el vector de expresión contiene los genes que confiere resistencia a antibióticos, se garantiza que todas las células sobrevivientes contienen el plásmido recombinante (Voet *et al.* 2007; Curtis *et al.* 2008). Confirmada la transformación y estabilidad del vector recombinante, la cepa bacteriana se propaga en medio líquido. Finalmente, la expresión del gen recombinante se controla a voluntad adicionando moléculas inductoras al medio de cultivo. El sistema de expresión pET incorpora la región promotora T7 RNA polimerasa regulada por el promotor LacUV5, cuya actividad se induce con la adición de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (Novagen 2005). Este inductor puede presentar inconvenientes como: 1) costo; 2) toxicidad; 3) formación de cuerpos de inclusión (dependiendo de la concentración); 4) retraso en el crecimiento bacteriano; 5) aumento de la carga metabólica, generando lisis celular o muerte (Lee *et al.* 2008). Sin embargo, presenta la ventaja de no ser degradado por *E. coli*,

permitiendo que su concentración en el medio permanezca constante. Además, es transportado eficientemente al interior de la bacteria (Quiroga 2010). Por ello, los sistemas de expresión tienen bien definidas las cantidades óptimas de IPTG a usar. El medio de cultivo más empleado para el cultivo de *E. coli* es el Luria Bertani (LB), ya que permite un crecimiento bacteriano adecuado combinando nutrientes adecuados como son: triptona (fuente de nitrógeno), extracto de levadura (fuente de carbono, vitaminas y azúcares) y NaCl (fuente de iones para transporte y balance) a una temperatura óptima entre 25-37 °C (Sezonov *et al.* 2007).

Los vectores pET permiten diversas aplicaciones; algunos poseen la capacidad de exportar a una parte específica de la célula o medio de cultivo y otros están enfocados en la purificación, inmunoprecipitación y electrotransferencia de la proteína (Novagen®). Entre los primeros, se encuentra el vector pET22b (+), el cual es ampliamente usado en estudios de purificación y expresión de proteínas, permitiendo la exportación al periplasma de la proteína de interés con la ayuda del péptido señal *peIB* (Novagen, 2005). Es el vector más usado en estudios de sobreexpresión de proteínas que forman cuerpos de inclusión en el citoplasma, dado que muchas proteínas requieren la formación de puentes disulfuro estables para adquirir su conformación nativa, lo cual es posible en el espacio periplasmático (Held *et al.* 2003; Augustyniak *et al.* 2013; Rahmen *et al.* 2016). Actualmente, es el plásmido más empleado para la sobreexpresión de BSLA en *E. coli*, ya que, adicionalmente, permite un alto número de copias sin afectar el crecimiento celular del hospedero (Held *et al.* 2003; Rahmen *et al.* 2016).

2.7 Análisis de dinámica molecular

Uno de los aspectos más importantes en bioquímica es poder anticipar la estabilidad estructural de una proteína, en determinadas condiciones. Para ello, se han desarrollado herramientas de dinámica molecular, (DM – *Molecular Dynamics*) que permiten predecir el comportamiento de la molécula en condiciones específicas de temperatura, presión y fuerza iónica (Piana *et al.* 2014); para ello, existen programas de alto rendimiento como GROMACS y CHARMM, los cuales usan métodos numéricos de Newton y ecuaciones de movimiento, para calcular la interacción de las partículas de un sistema (Hess *et al.* 2008).

2.8 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN–¹H)

RMN es una técnica utilizada para determinar la estructura química de compuestos orgánicos. Existen distintos tipos de protones que pueden ser aplicados. El hidrógeno 1–nucleico es uno de los protones más usados; suele usarse en muestras donde el hidrógeno está presente naturalmente (Bruice 2004). El principio de esta técnica se basa en aprovechar el momento magnético de los spines atómicos que al ser cargados crean un campo magnético (Bruice 2004). Gracias al avance de la espectrofotometría es posible leer resonancias de compuestos complejos con concentraciones en el orden de 0.05 mM, en un desplazamiento químico corto de 10 ppm (Vliegthart *et al.* 1983). Esta técnica se ha convertido en una técnica poderosa para el análisis de combustibles, sin necesidad de llevar a cabo alguna separación física o tratamiento previo, logrando un análisis rápido y automatizado de múltiples muestras en tiempo muy cortos (Monteiro *et al.* 2009). Gracias a los diferentes grupos orgánicos presentes en las muestras de biodiésel, es posible evaluar su

composición dado que presentan picos de intensidad en regiones específicas del espectro (Portela *et al.* 2016). La información adquirida puede ser cuantificada y examinada a través de análisis estadísticos (Flores *et al.* 2012).

3. Materiales y Métodos

3.1 Elección de la lipasa A de *Bacillus subtilis*

Un análisis exploratorio realizado en el laboratorio seleccionó como potencial candidata para catalizar reacciones de transesterificación a la lipasa A de *Bacillus subtilis*, con base en su identidad estructural con la lipasa B de *Candida antártica*.

3.2 Análisis de dinámica molecular

La estabilidad estructural de BSLA se evaluó mediante simulaciones de dinámica molecular con el software GROMACS-5.0.7 (Abraham *et al.* 2015). Se trabajó con el modelo estructural 2qxu, alojado en la Protein Data Bank (PDB). Se estableció un sistema acuoso; para ello se seleccionó el campo de fuerza Gromos53a6. Se estableció una caja cúbica de simulación solvatada con moléculas de agua (modelo spc216), con una distancia de 1 nm entre la superficie de la proteína y el borde la caja. El sistema se equilibró durante 10 ns a una temperatura de 300 K y 1 bar de presión. Finalmente se evaluó la trayectoria de la proteína a través de la función RMSD (*Root*

mean square deviation of atomic positions) y el *análisis de estructuras secundarias DSSP (hydrogen bond estimation algorithm)* durante un intervalo de 50 ns.

También se evaluó la estabilidad de la enzima bajo las condiciones de reacción del biodiésel. Para esto, se estableció un sistema bifásico compuesto por una caja cuadrangular de dimensiones $X_{nm} * Y_{nm} * Z_{nm}$, en donde la mitad de la caja fue solvatada con moléculas de 1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerol POP (TAG presente más abundante en el aceite de palma) molID: “22627” ATB y la otra mitad con moléculas de metanol, molID: “15607” ATB. BSLA se ubicó en la mitad de la bifase. Los parámetros para el campo de fuerza y condiciones de equilibrio del sistema fueron los mismos usados en el sistema acuoso. La trayectoria de BSLA fue evaluada de igual manera mediante las funciones RMSD y DSSP, en un intervalo de 10 ns.

3.3 Construcción de un vector de expresión recombinante con el gen *LipA*

Se llevó a cabo la traducción inversa para el gen *LipA*, basándose en la secuencia proteica 2qxu de la PDB, teniendo en cuenta el uso de codones para *E. coli*. Un gen sintético (Epoch Life Science Inc.) se clonó el gen en el vector pET-22b (+) usando los sitios de restricción NcoI y XhoI. La precisión de la construcción fue verificada mediante secuenciación por electroforesis capilar por la empresa Macrogen Inc (Corea).

3.4 Transformación del hospedero de expresión

Para la expresión heteróloga de BSLA se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen Germany), mediante el protocolo de choque térmico en presencia de $CaCl_2$ (Sambrook *et al.* 2006).

3.5 Sobreexpresión recombinante de BSLA

La sobreexpresión recombinante de BSLA se llevó a cabo usando medio Luria Bertani (LB) pH 7, suplementado con 100 µg/mL ampicilina (Novagen 2005); Yun *et al.* 2013). Se monitoreó el crecimiento del cultivo en baño maría a 37 °C y 180 rpm. La inducción se llevó a cabo usando 2 mM IPTG a una DO_{600} entre a 0.5-1.0 (Funke *et al.* 2003). Se monitorearon las curvas de crecimiento mediante un *análisis de covarianzas* (ANCOVA) usando R. V 3.2.2 (R Core Team 2015). Se partió de 25 mL para llevar a cabo la extracción de las fracciones celulares a las 0, 1, 3, 6 y 24 h de inducción (Novagen 2005; Sambrook *et al.* 2006).

3.5.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE Se verificó la localización subcelular de BSLA y el mejor tiempo de expresión mediante visualización de proteínas según el sistema Laemmli (tris-glicina), usando geles 20% SDS-PAGE. La tinción se llevó a cabo según el protocolo de revelado largo con nitrato de plata (Chevallet *et al.* 2006).

3.6 Determinación de la actividad hidrolítica frente al *p*-Nitrofenil butirato (*p*-NPB)

Dado que el organismo hospedero carece de lipasas capaces de hidrolizar TGAs (Nantel *et al.* 1973; Antonczack *et al.* 2009) los análisis de actividad hidrolasa permiten establecer de manera definitiva la expresión funcional de la enzima. La actividad hidrolasa se determinó antes de llevar a cabo pruebas de transesterificación con las fracciones obtenidas para fracción total, medio, periplasma, citoplasma soluble y citoplasma insoluble (Augustyniak *et al.* 2012; Augustyniak *et al.* 2013; Yun *et al.* 2013).

El monitoreo del aumento en la absorbancia se realizó a 410 nm (Quinn et al. 1982; Lacazio et al. 2000; Rahmen et al. 2016), usando como sustrato para-Nitrofenil butirato (*p*-NPB) 0.4mM (pKa=7.15, a 25°C; $\epsilon = 1477 M^{-1}/ cm^{-1}$, a pH= 7.25) en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH= 7. Para la medición se usaron 100 μ L de *p*-NPB, 1900 μ L de buffer y 20 μ L de extracto crudo. La cinética de la reacción fue monitoreada durante 300 s (Rahmen et al. 2016).

3.6.1 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford y cálculo de actividad específica. Se calculó la concentración proteica de los extractos crudos por el método colorimétrico de Bradford (Curtis et al. 2008), con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón (nc-iubmb 1979), usando concentraciones de 0.0-1.0 mg/mL. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 595 nm (Bradford 1976), con 33.3 μ L de extracto crudo en 2 mL de solución (factor de dilución: 60.06).

Se implementó la fórmula para el cálculo de actividad específica usada de la hidrólisis de *p*-NPB (Quinn et al. 1982) (**Figura 2**) (tomado de Barraza et al. 2016), determinando las unidades específicas de BSLA presentes en los extractos crudos.

$$\text{Actividad específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = m \frac{10^6}{\epsilon_{400}} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{FD}{C_{prot}} * \frac{1L}{1000 mL}$$

Donde:

m= Pendiente (min^{-1})

ϵ_{400} = Coeficiente de extinción molar de *p*-nitrofenol ($14775 M^{-1} cm^{-1}$ 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 μ mol de *p*-NPB a 25 °C en 1 min

Figura 2. Fórmula de estimación de actividad específica a partir de la hidrólisis del *p*-NPB. (Quinn et al. 1982).

3.6.2 Determinación del efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de BSLA Se realizaron mediciones de actividad hidrolasa sobre *p*-NPB en gradientes de pH (5, 7 y 9), a temperaturas de (25, 30, 35, 40, 45 y 50 °C). Cada una de las pruebas se realizó de manera independiente y por triplicado.

3.7 Evaluación de la síntesis de FAME mediante transesterificación enzimática utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA como catalizador.

3.7.1 Concentración de las muestras Se concentraron los extractos crudos mediante liofilización y se resuspendieron en 150 µL de 100 mM Tris-HCl pH 9 + 10% DMSO, con el fin de evitar la hidrólisis preferencial por exceso de agua, logrando así una concentración de ≈ 1 U/mg.

3.7.2 Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite crudo Se determinó el perfil de ácidos grasos del aceite de palma mediante RMN-¹H, siguiendo la metodología de Knothe *et al.* (2004) y las modificaciones propuestas por Barraza *et al.* 2016.

De igual manera, se llevó a cabo la cuantificación de TAG, DAG, MAG y FAA del sustrato en estado inicial previo a la reacción, siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría *et al.* 2014 & 2015 y tomando en cuenta las modificaciones propuestas por Barraza *et al.* 2016 (**Tabla 2**) (Nieva-Echevarría *et al.* 2014; Nieva-Echevarría *et al.* 2015; Barraza *et al.* 2016).

Tabla 1.

Determinación de ácidos grasos según Knothe et al. 2004; Anderson et al. 2012. Tomada y modificada de Barraza et al. 2016. Donde: A= área de barrido; N= moles; N_x= moles de X compuesto.

Ácidos Grasos	Desplazamiento químico (δ , ppm)	¹ Ecuación.
α CH ₂ totales	2.31	$N_{\alpha\text{CH}_2 \text{ totales}} = A_{2.25-2.40}/2$
Linolénico	0.97	$N_{\text{C18:3}} = A_{0.94-1.0}/3$
Linoleico	2.77	$N_{\text{C18:2}} = 0.5*(A_{2.74-2.80} - 4N_{\text{C18:3}})$
Oleico	2.02	$N_{\text{C18:1}} = (A_{1.94-2.10}/4) - N_{\text{C18:2}} - N_{\text{C18:3}}$
A. insaturados		$N_{\text{insat}} = N_{\text{C18:1}} + N_{\text{C18:2}} + N_{\text{C18:3}}$
A. saturados		$N_{\text{sat}} = N_{\text{totales}} - N_{\text{insat}}$
Porcentaje molar (%)		$\% X = 100*N_X/N_{\alpha\text{CH}_2 \text{ totales}}$

Tabla 2.

Cuantificación de MAG, DAG, TAG, FAA y FAEE siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al. (2014 y 2015) y modificaciones de Barraza et al. (2016). Donde: A= área, N= moles, N_x= moles de un compuesto x, N_{totales}= $\sum N_x$, Pc= constante de proporcionalidad.

Señal	Desplazamiento químico (Δ , ppm)	Multiplicidad	Tipo de protón	Numero de ¹ H que causan la señal	compuesto	formula
2- MAG	4.93	M	HOCH ₂ - CH(OR)- CH ₂ OH	1	Grupo glicérico en 2- MAG	$N_{2\text{-MAG}} = Pc * A_{4.90-4.96}$
1- MAG	3.94	M	ROCH ₂ - CHOH- CH ₂ OH	1	Grupo glicérico en 1- MAG	$N_{1\text{-MAG}} = Pc * A_{3.90-3.97}$
1,2 DAG	5.08	M	ROCH ₂ - CH(OR)- CH ₂ OH	1	Grupo glicérico en 1,2- DAG	$N_{1,2\text{-DAG}} = Pc * A_{5.05-5.12}$
TAG + 1,2 DAG	4.22 y 4.28	M	ROCH ₂ - CH(OR)- CH ₂ OR" +	3	Grupo glicérico	$N_{\text{TAG}} = (Pc * 2A_{4.26-4.36} - 2N_{1,2\text{-DAG}}) / 4$

Señal	Desplazamiento químico (Δ , ppm)	Multiplicidad	Tipo de protón	Numero de ^1H que causan la señal	compuesto	formula
			$\text{ROCH}_2\text{-CH(OR')-CH}_2\text{OH}$		en TAG y 1,2- DAG	
FAME	3.67	S	$\text{CH}_3\text{-(O)-R-}$	3	αCH_3 del metil éster	N FAME $\alpha\text{CH}_3 = \text{Pc}^*\text{A}$ $3.65\text{-}3.68/3$
1,3 DAG	4.05-4.21	M	$\text{ROCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OR'}$	5	Grupo glicérico en 1,3- DAG	N 1,3-DAG = $(\text{Pc}^*\text{A}_{4.04\text{-}4.36} - 4\text{N}_{\text{TAG}} - 2\text{N}_{1\text{-MG}} - 2\text{N}_{1,2\text{-DAG}})/5$
FAA	2.31	M	$\text{HO-(CO)-CH}_2\text{-}$ + Todos los αCH_2 de TAG, DAG, MAG y FAEE	2	αCH_2 de FFA, TAG, DAG, MAG y FAEE	N FFA = $(\text{Pc}^*\text{A}_{2.25\text{-}2.40} - 6\text{N}_{\text{TAG}} - 4\text{N}_{1,2\text{-DAG}} - 4\text{N}_{1,3\text{-DAG}} - 2\text{N}_{\text{FAME}} - 2\text{N}_{1\text{-MG}} - 2\text{N}_{2\text{-MG}})/2$
					Porcentaje molar (%)	%X = $100*(\text{N}_X/\text{N}_{\text{Totales}})$

3.7.3 Transesterificación enzimática Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo empleando 1 U y relaciones molares de metanol-aceite de palma de 3:1, 6:1 y 9:1. Las reacciones fueron llevadas a cabo durante 6 h a una temperatura y agitación constantes de 35 °C y 250 rpm. Cada una de las pruebas se realizó por triplicado y de manera independiente, con excepción de la relación molar donde sólo se hizo una réplica.

Tras este periodo, se recuperó la fase oleosa mediante centrifugación a 10000 g. Posteriormente, se incubó la fase oleosa a 90 °C durante 1 h con el fin de eliminar residuos de agua y metanol. Finalmente, para el monitoreo se empleó Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- ^1H), servicio contratado con el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Industrial de Santander. Los parámetros se especifican en el **Anexo A**.

3.7.4 Identificación y cuantificación de FAME La síntesis de FAME, posterior a la transesterificación, se verificó con la aparición de un singlete a 3.67 ppm. La cuantificación del metil éster fue determinada al igual que el sustrato (**Tabla 2**).

3.8 Análisis estadístico de los resultados de cuantificación

Se evaluaron las diferencias entre los distintos niveles de concentración molar con respecto al porcentaje de conversión de FAME, mediante la implementación de un análisis de varianza (ANOVA), el cual fue explicado implementando una correlación lineal. Se implementó una corrección de Bonferroni como prueba *a posteriori* debido a N diferencial de la relación molar 9:1. Estos análisis fueron llevados con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVII 17.2.00. (2009).

4. Resultados

4.1 Análisis de dinámica molecular

4.1.1 Estabilidad estructural en un sistema acuoso La trayectoria molecular de BSLA mostró que no existe una desviación atómica sustancial RMSD tras un periodo de 50 ns, revelando una desviación de residuos que oscila entre ~ 0.1-2.5 nm (1-2.5 Å) (**Figura 3**), donde la trayectoria se hace estable tras 30 ns de simulación. Al inicio de la trayectoria (t=0 ns) el RMSD equivale a 1 Å,

lo cual indica que estos cambios se dieron durante los pasos de parametrización del sistema. Al examinar la trayectoria después de $t= 50$ ns, la desviación es de 0.15 \AA . La magnitud de RMSD indica que no existen cambios estructurales significativos ($<0.5 \text{ nm}$).

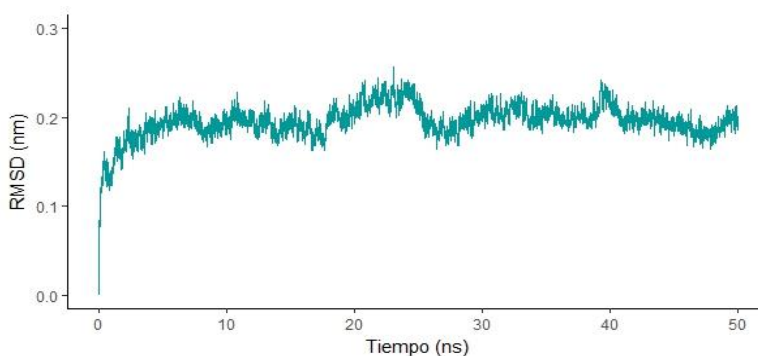


Figura 3. Trayectoria del RMSD de BSLA en un sistema acuoso durante 50 ns.

Al examinar la desviación de residuos de la estructura secundaria de BSLA, vemos un DSSP estable en donde los componentes estructurales secundarios de la enzima se estabilizan tras 15 ns y que la región con mayor tendencia a sufrir cambios estructurales es un giro (**Figura 4**). Esto podría deberse a la exposición estructural del giro que presenta la estructura terciaria de BSLA. A pesar de esto, BSLA sigue manifestando una estabilidad estructural adecuada. Lo cual provee una base adecuada para los análisis posteriores subsecuentes.

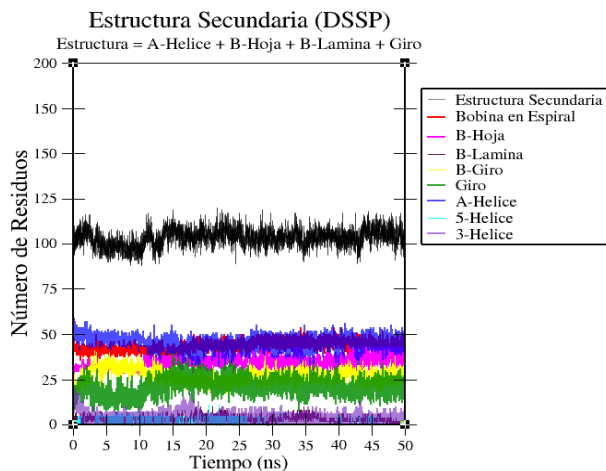


Figura 4. Análisis de la estabilidad estructural de la estructura secundaria de BSLA en el sistema acuoso durante 50 ns.

4.1.2 Sistema bifásico La trayectoria de la DM para el sistema bifásico mostró que BSLA exhibe un comportamiento un tanto más estable con respecto al sistema acuoso. La desviación atómica del RMSD varía entre ~ 1 y 2 \AA ($\Delta 1 \text{ \AA}$) a lo largo de los 10 ns, mostrando que la estructura se estabiliza tras 4 ns de DM (**Figura 5**).

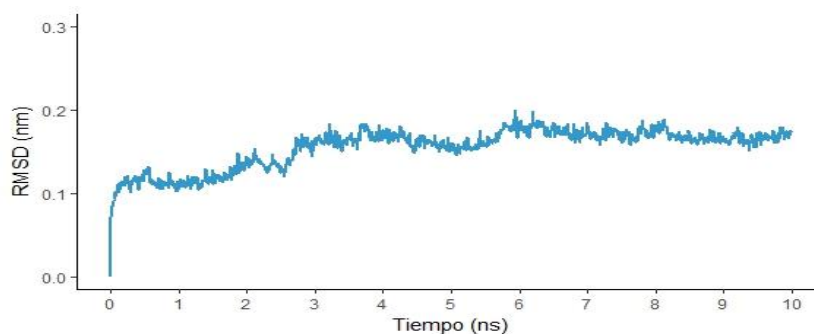


Figura 5. Trayectoria RMSD de BSLA bajo un sistema bifásico durante 10 ns. Sistema compuesto por metanol y un TAG abundante en el aceite de palma.

El análisis DSSP por su parte evidencia que la estructura secundaria de la proteína y sus componentes se mantienen altamente estables a lo largo de toda la MD (**figura 6**). Indicando así que, bajo las condiciones simuladas, los residuos que comprenden las estructuras secundarias de BSLA no presentan desviaciones sustanciales que impliquen deformación o alteración estructural de la enzima. Finalmente, en estos resultados junto con los del sistema acuoso otorgan una base bioinformática sólida para evidenciar la estabilidad en la expresión heteróloga y la transesterificación enzimática de BSLA.

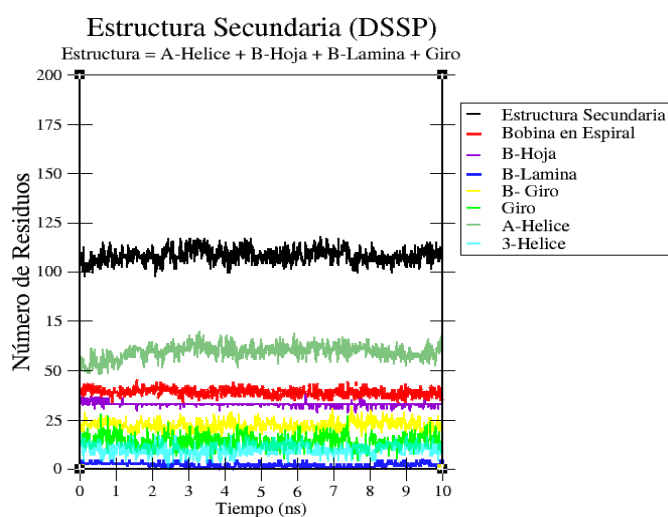


Figura 6. Análisis de la estabilidad estructural de la estructura secundaria de BSLA en el sistema bifásico a lo largo de 10 ns.

4.2 Construcción de un vector de expresión recombinante con el gen *LipA*

El plásmido pET22b(+)_BSLA (5979 bp) es el producto recombinante del vector de expresión pET22b(+) (5493 bp) y el gen *LipA* de *Bacillus subtilis*, el cual codifica para una proteína de 181 aminoácidos (19.3 kDa), unida a una etiqueta His-tag para futuras purificaciones mediante

columnas de afinidad. El vector también cuenta con la secuencia líder *peIB* (65 bp), encargada de exportar la proteína al periplasma de *E. coli*, la cual está unida al extremo N-terminal de la enzima. Los sitios de restricción usados para la clonación fueron *Nco* I (CCATGG) y *Xho* I (CTGGAG) (**Anexo B**) En resumen, la construcción en sentido 5'→3' fue: *peIB*+*BSLA*+*Histag* (22.4 kDa), acoplada en el MCS como se puede apreciar en la **Figura 7** junto con la dirección de la transcripción y las distintas regiones del vector.

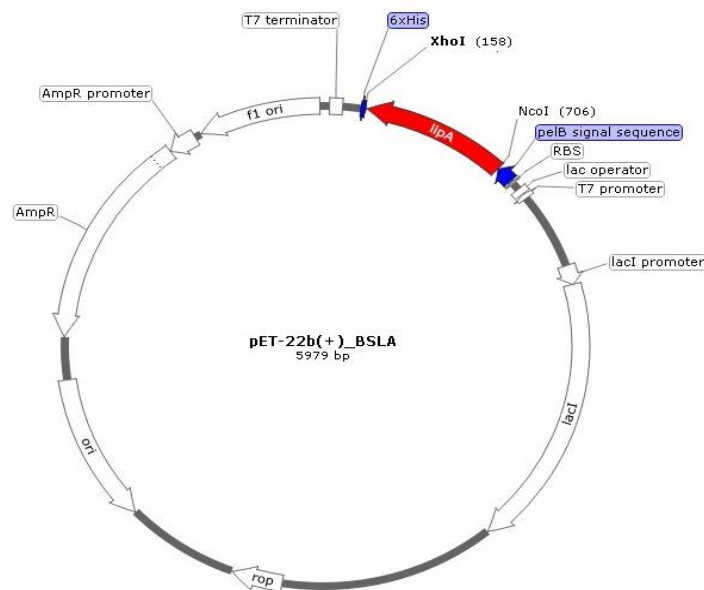


Figura 7. Construcción del vector de expresión recombinante para *BSLA*. El gen *LipA* se representa con la flecha roja, unido a la secuencia líder *peIB* y al *Histag* (azules) resaltando los sitios de restricción usados. También se representan otros componentes del vector como el gen de resistencia a ampicilina *AmpR*, el gen regulador *lacI*, el origen de replicación *ori* y el gen *rop*.

4.3 Transformación del hospedero de expresión

Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), mediante el protocolo de choque térmico en presencia de CaCl_2 (Sambrook & Russell 2006). La selección de colonias transformadas

se hizo sobre placas de agar con ampicilina gracias al gen de resistencia *Amp^R* de pET22b(+). Las cepas recombinantes fueron criopreservadas en 20% glicerol para su posterior uso y almacenamiento en el cepario del laboratorio.

4.4 Sobreexpresión recombinante de BSLA

Para evaluar la sobreexpresión de BSLA se llevó a cabo un análisis de covarianzas ANCOVA con los datos de absorbancia obtenidos a las 0,1,3, 6 y 24 h, con el fin de identificar el efecto del agente inductor sobre el crecimiento de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET22b(+)_BSLA (**Figura 8**). Para ello, se midió la densidad óptica a 600 nm de los cultivos inducidos con IPTG y los cultivos no inducidos. La inducción se llevó a cabo a una DO entre 0.5-1.0 (fase exponencial temprana de la división celular) y a 37 °C. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento bacteriano de *E. coli* BL21(DE3) no se vio afectado por el agente inductor, ya que no existen diferencias significativas entre las pendientes de los tratamientos ($p=0.09567$). Es decir, el agente inductor no ejerce ningún efecto sobre la cepa. Lo anterior, pone en manifiesto, la autoinducción del vector gracias al gen de resistencia al antibiótico con el que cuentan los vectores pET. evidenciando un crecimiento uniforme a lo largo del periodo de crecimiento del cultivo bajo condiciones de inducción y no inducción.

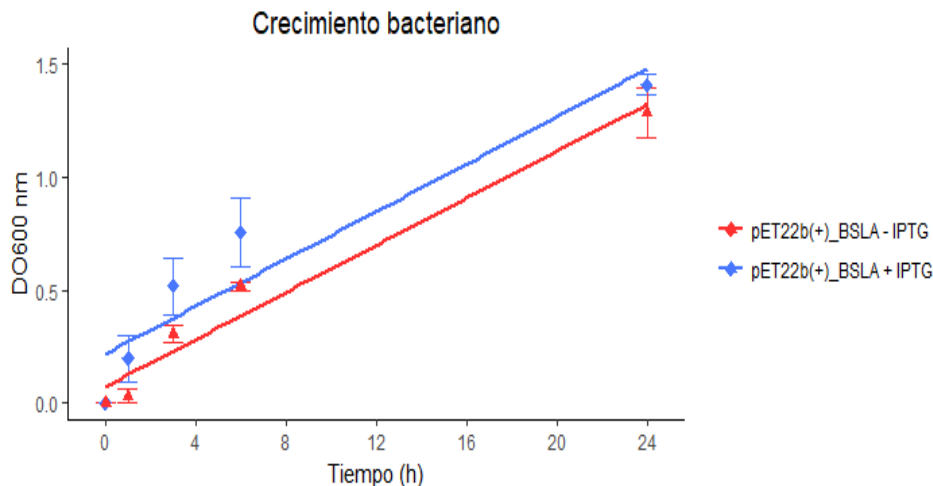


Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET22b (+) BSLA. Se muestra el crecimiento de la cepa transformada en condiciones de inducción y no inducción a una DO de 600 nm. Cada curva representa el promedio de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).

Por otra parte, no se pudo evaluar el efecto del plásmido no recombinante en el crecimiento de la cepa, ya que no se contaba con el vector en el laboratorio.

4.4.1 Visualización mediante electroforesis SDS-PAGE La separación de proteínas mediante SDS-PAGE mostró que las células expresaban la enzima recombinante. La fracción celular total (TF) mostró una banda intensa alrededor de 25 kDa, correspondiendo con los 22.4 kDa de BSLA+peIB+Histag. Al examinar de cerca cada una de las fracciones celulares restantes, vemos que en su mayoría la enzima se localiza en la fracción periplasmática (PF) (**Figura 9**), en donde se ve una banda de alta intensidad, como se esperaba gracias al diseño del vector. No obstante, también se aprecia que existe una menor concentración de la enzima en las fracciones citoplasmática soluble (CSF) e insoluble (CIF). Finalmente, la fracción del medio (MF) exhibe un remanente de la enzima.

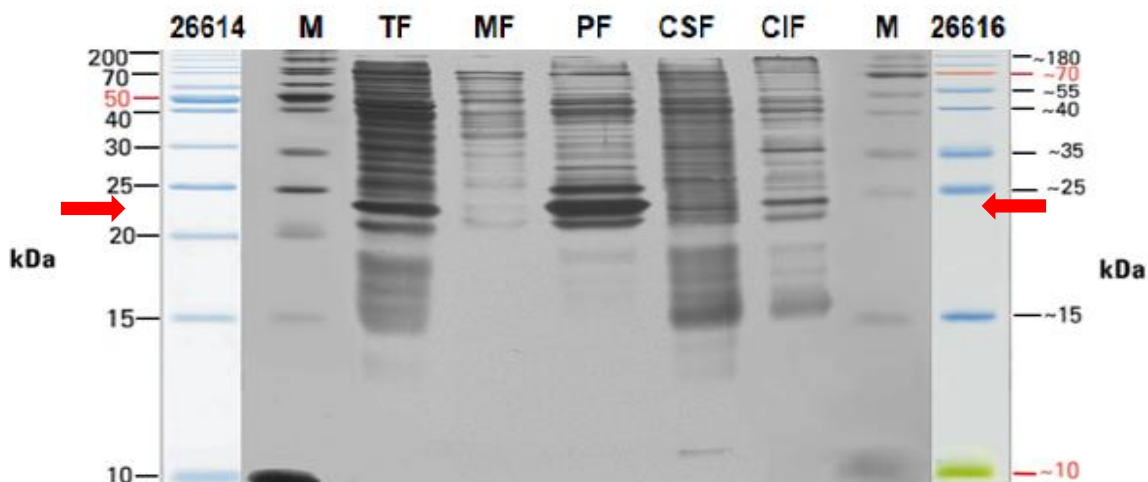


Figura 9. Gel de SDS-PAGE de las fracciones celulares obtenidas luego de 3h de inducción. Los marcadores utilizados (M) corresponden a: *PageRuler*TM #26614 unstained (200 kDa) y *PageRuler*TM #26616 prestained (180 kDa). Las fracciones celulares corresponden a: fracción total (TF); fracción del medio (MF); fracción de periplasma (PF); fracción de citoplasma soluble (CSF) y fracción de citoplasma insoluble (CIF).

Tras comprobar la localización subcelular de la enzima se determinó la hora de mayor expresión. Los resultados obtenidos indican que la mejor expresión se da a 3 h de inducción. Los resultados indican que desde el momento de la inducción existe un aumento en la concentración celular de BSLA hasta la tercera hora y un posterior descenso de ésta, tras este punto (Figura 10).

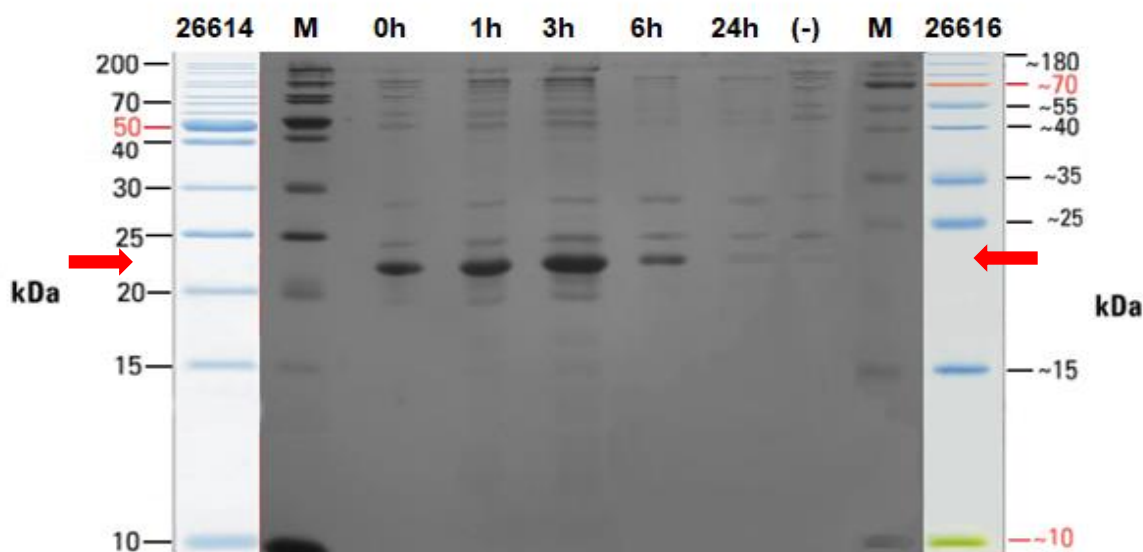


Figura 10. Gel de SDS-PAGE de la fracción del periplasma para los tiempos de inducción monitoreados. (0, 1, 3, 6, 24 h de inducción) y control negativo (-): “no inducción”. Los marcadores utilizados (M) corresponden a PageRuler *PageRuler*TM #26614 (200 kDa) y *PageRuler*TM #26616 (180 kDa)

4.5 Determinación de la actividad hidrolítica frente al *p*-Nitrofenil butirato (*p*-NPB)

Debido a que *E. coli* BL21 (DE3) carece de lipasas eficientes capaces de llevar a cabo la hidrólisis de esteres de glicerol, los análisis de actividad hidrolasa permiten corroborar definitivamente los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE corresponden a la presencia de BSLA recombinante. La **Figura 11** muestra los resultados obtenidos para cada una de las fracciones celulares extraídas. La fracción de periplasma, donde se esperaba que se estuviese exportando la enzima presentó una mayor actividad hidrolasa con respecto a las demás fracciones ($A = 0.2884$), corroborando los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE de la **Figura 9**.

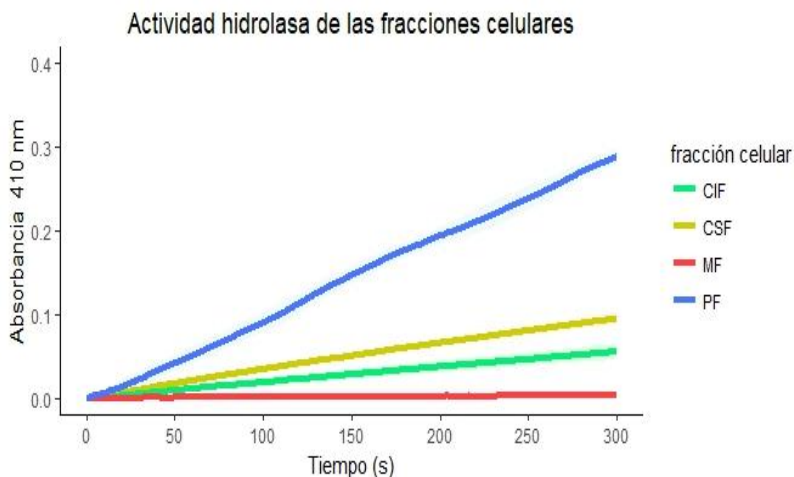


Figura 11. Curvas de actividad hidrolasa de cada una de las fracciones celulares frente al p-NPB. Medio (MF), citoplasma soluble (CSF), citoplasma insoluble (CIF) y periplasma (PF). Cada curva representa el promedio \square de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD) representada por el área sombreada.

Una vez se evidenció la correcta expresión de BSLA hacia el periplasma, se procedió a monitorear la mejor hora de actividad tras la inducción. Las pruebas de hidrolasa muestran la mejor actividad a las 3 h de inducción (**Figura 12**), concordando con la **Figura 10**, en donde se presenta un aumento en la producción de la enzima hasta la tercera hora de inducción y un descenso en las horas siguientes.

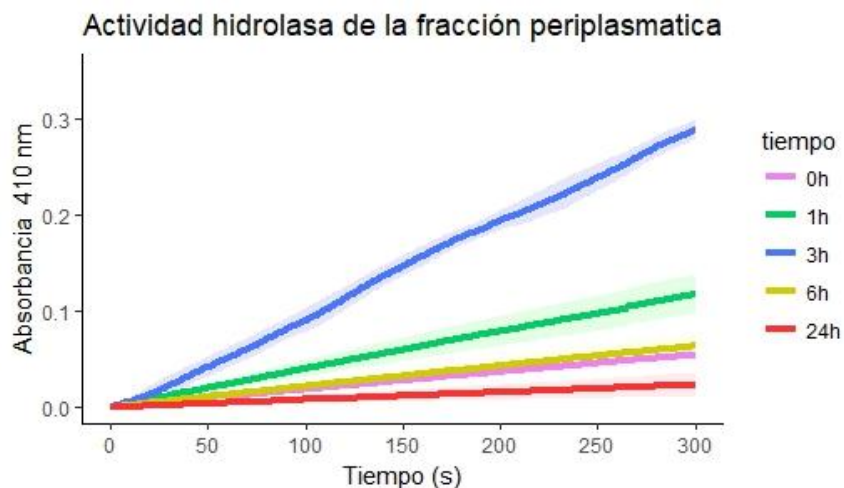


Figura 12. Curvas de actividad hidrolasa frente al *p*-NPB para la fracción de periplasma a las 0,1,3,6 y 24 h de inducción. Cada curva representa el promedio de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).

4.5.1 Determinación de la concentración de proteína por el ensayo de Bradford La concentración de proteína obtenida para los extractos crudos arrojó cantidades de enzima entre 0.47-1.07 U/mg (**Tabla 3**). Al evaluar las pendientes obtenidas mediante hidrólisis, se observa que la inclinación de éstas (tasa de degradación del sustrato) es baja. Esto indica que la cantidad de BSLA es muy poca en relación con la proteína total, por lo que se hace necesario aumentar la concentración de proteína en relación con el volumen, para llevar a cabo las pruebas de transesterificación.

Tabla 3.

Resultados de determinación de proteína total de los extractos crudos. Donde: la pendiente se obtuvo de la hidrólisis del p-NPB y la proteína total en mg representa la cantidad de enzima presente en 1 mL de extracto celular.

Muestra	Pendiente <i>m</i>	Proteína total <i>mg</i>	Actividad específica <i>U/mg</i>
Extracto crudo 1	0.0007	0.269	1.07
Extracto crudo 2	0.0005	0.26	0.79
Extracto crudo 3	0.0004	0.349	0.47

4.5.2 Determinación el efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolasa de BSLA

Efecto del pH

Las variaciones de pH en las mediciones de actividad hidrolítica ponen de manifiesto la preferencia de la enzima por un ambiente alcalino (**Figura 13**), siendo capaz de hidrolizar a una tasa mucho más alta. No obstante, cabe resaltar que el sustrato utilizado solo permitió hacer mediciones hasta pH 9, dado que después de ese punto la reacción entre el pH y el sustrato conlleva a autohidrólisis del *p*-NPB.

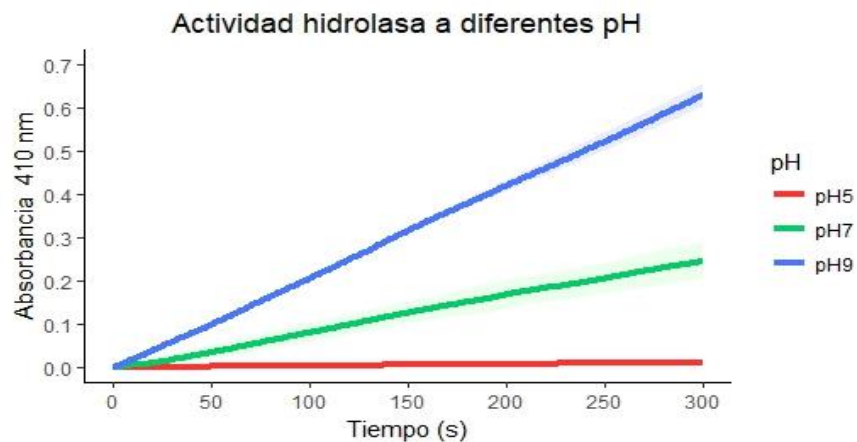


Figura 13. Variación de la actividad hidrolasa frente a los cambios de pH, para la fracción de periplasma a las 3 horas de inducción. Cada curva representa el promedio \square de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).

Efecto de la temperatura

Los resultados demostraron que la capacidad hidrolítica de BSLA dependen en mayor medida de la temperatura con respecto al pH. Las variaciones de temperatura muestran un incremento significativo en la tasa de hidrólisis del *p*-NPB a 35 °C (Figura 14), en donde la enzima alcanza su punto máximo de actividad, siendo éste el más marcado de todos los puntos monitoreados.

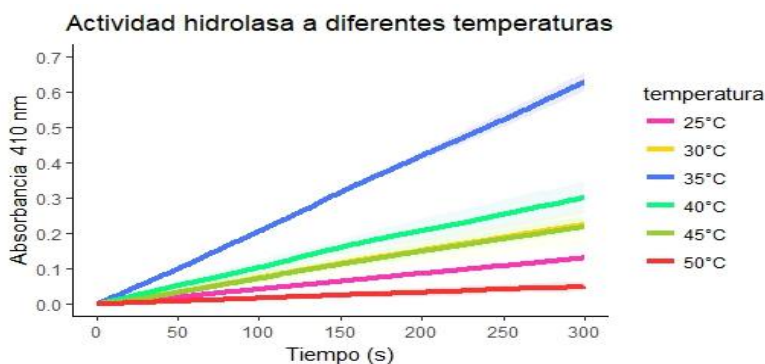


Figura 14. Variación de la actividad hidrolasa frente a los cambios de temperatura, para la fracción de periplasma a las 3 h de inducción. Cada curva representa el promedio \square de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).

4.6 Evaluación de la síntesis de FAME mediante transesterificación enzimática utilizando extractos crudos de la expresión de BSLA como catalizador.

4.6.1 Concentración de las muestras La concentración de las muestras mostró una activación de BLSA superior a la exhibida por los extractos crudos en sus mejores condiciones (**Figura 15**), logrando concentrar la enzima ~ 4 veces más (2.56-3.69 U/mg) (**Tabla 4**). Gracias a esto se logró obtener ~ 1 U/300 μ L de extracto liofilizado, cantidad suficiente para llevar a cabo las reacciones de transesterificación (**Tabla 4**).

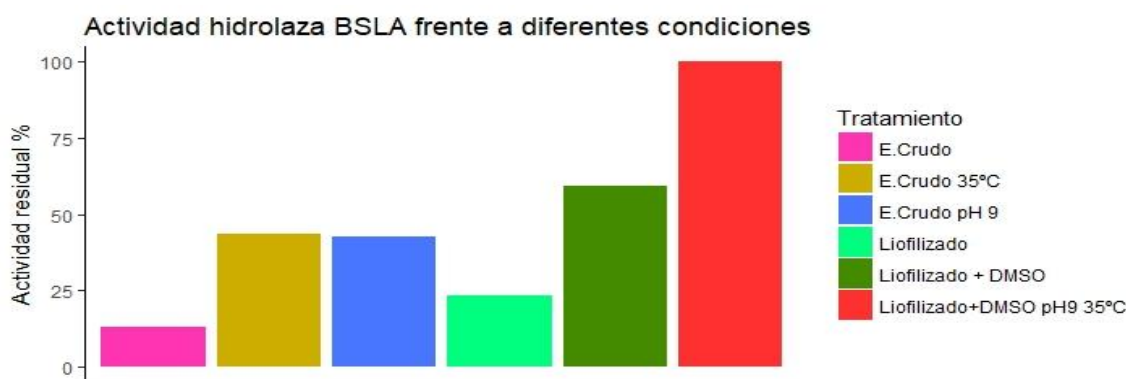


Figura 15. Actividad relativa de las muestras obtenidas para los extractos crudos de BSLA.

Tabla 4.

Resultados de determinación de proteína total de algunos extractos crudos tras ser concentrados mediante liofilización. La pendiente se obtuvo de la hidrólisis del p-NPB y la proteína total en mg representa la cantidad de enzima presente en 1 mL de extracto celular liofilizado.

Muestra	Pendiente <i>m</i>	Proteína total <i>mg</i>	Actividad específica <i>U/mg</i>
Liofilizado 1	0.0064	0.712	3.69
Liofilizado 2	0.0061	0.748	3.34
Liofilizado 3	0.006	0.758	3.25
Liofilizado 4	0.0059	0.81	2.99

Muestra	Pendiente <i>m</i>	Proteína total <i>mg</i>	Actividad específica <i>U/mg</i>
Liofilizado 5	0.006	0.75	3.28
Liofilizado 6	0.006	0.93	2.65
Liofilizado 7	0.0061	0.83	3.01
Liofilizado 8	0.0058	0.84	2.83
Liofilizado 9	0.0047	0.754	2.56

4.6.2 Determinación del perfil de ácidos grasos del aceite crudo Se determinó la proporción molar de los ácidos grasos del aceite de palma crudo a través de RMN-¹H. Los resultados obtenidos muestran una proporción equitativa de ácidos grasos saturados (51.85 %) e insaturados (48.15 %) (**Tabla 5**). De igual manera, fue determinado el perfil de ácidos grasos linolénico (C 18:3), linoleico (C 18:2) y oleico (C 18:1), con proporciones de 0.67%, 5.67% y 41.81 % respectivamente (**Tabla 5**).

Tabla 5.

Perfil de ácidos grasos presentes en muestras de aceite de palma crudo (Elaeis guineensis). Los resultados corresponden al promedio de tres mediciones independientes \pm SD.

Ácidos grasos	Porcentaje molar \pm SD	Peso molecular promedio \pm SD (g/mol)	Peso molecular Teórico (g/mol)	Error (%)
Linolénico (18:3)	0.67 \pm 0.23			
Linoleico (18:2)	5.67 \pm 1.58			
Oleico (18:1)	41.81 \pm 1.56			
Insaturados	48.15 \pm 3.07	844.51 \pm 2.31	849.1929	\pm 0.55
Saturados (C12:C18)	51.85 \pm 3.07			

La cuantificación de acilglicéridos también fue determinada mediante RMN-¹H. Los resultados mostraron que la mayor composición del aceite está dada por TAG (70.02%), mientras que los DAG corresponden a un 16,78 % distribuido en 1,2 DAG (6.70%) y 1,3 DAG (10.08%).

Por otro lado, los FFA representaron un 13.2% de la composición del aceite crudo (**Figura 16**).

No se detectó presencia de MAG en las muestras analizadas.

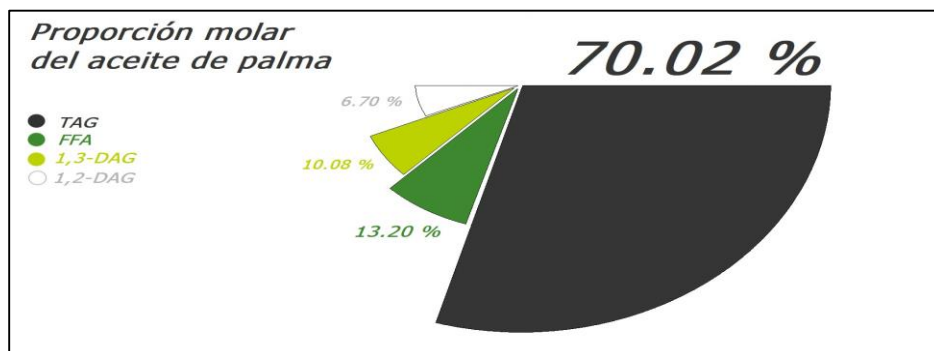


Figura 16. Proporción molar del aceite de palma crudo. Los valores representan promedio de tres mediciones independientes.

4.6.3 Identificación y cuantificación de FAME La producción de metil esterres se evaluó mediante la aparición de un singlete (s) a 3.67 ppm, señal causada por los hidrógenos αCH_3 del compuesto estimado (Anderson *et al.* 2012) (**Figura 17**). Los resultados de RMN- ^1H , Evidencian una disminución en las señales de TAG (4.28 ppm) y 1,3-DAG (4.22ppm), en contraste con el aumento de 1,2-DAG (5.08) y la aparición de 1-MAG (3.94) y 2-MAG (4.93) (**Tabla 6**).

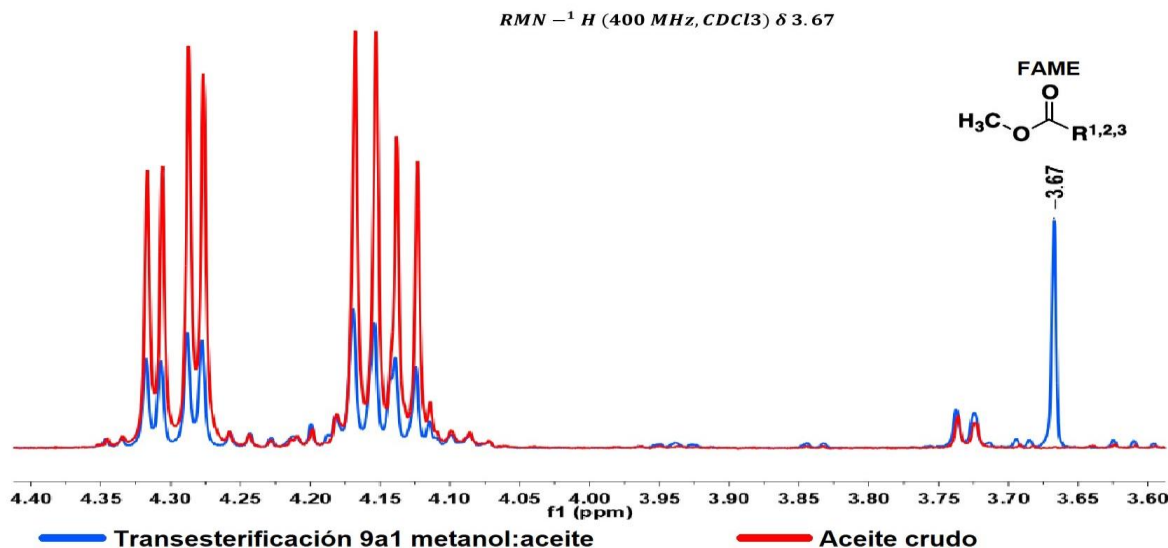


Figura 17. Determinación de la síntesis de FAME mediante RMN- ^1H . Se pareció la comparación entre el aceite crudo y un espectro luego de la reacción de transesterificación.

El incremento en la síntesis de FAME demostró ser mayor a medida que aumentaba la relación molar entre el metanol y el aceite de palma. De igual manera, la disminución de TAG y 1,3-DAG fue mayor a medida que aumentó la relación molar, pasando de valores de $\sim 70.02\%$ y 10.08% , respectivamente en el aceite crudo, a valores del 27.03% y 5.53% para la concentración molar 9:1 (**Tabla 6**). Por otro lado, la proporción de FFA fue similar entre el aceite crudo y los ensayos, con excepción de la relación molar 9:1, donde descendió a la mitad, y un ensayo de relación molar 6:1 donde aumentaron hasta 43.88% (**Tabla 6**).

La proporción de conversión a FAME es similar a la aparición y aumento de MAG y 1,2 DAG; esto indica que a medida que se lleva a cabo la reacción de transesterificación también lo hace la hidrólisis de acilglicéridos. No obstante, esta conversión pone en manifiesto su estereoespecificidad sn-3 bajo las condiciones de reacción establecidas.

Tabla 6.

Cuantificación de los productos de transesterificación con extractos crudos de BSLA.

Reacción #	Unidades enzimáticas (U/mg)	Relación molar Metanol: Aceite	Porcentajes Molares (%)							
			2-MAG	1-MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	TAG	FAA	FAME	Total
1	1	3:1	0	0	3.68	9.61	68.08	17.75	0.88	100
2	1	3:1	0	0	4.49	8.67	71.11	15.07	0.66	100
3	1	3:1	0	0	4.07	8.37	72.74	13.88	0.94	100
4	1	6:1	0	1.28	5.31	8.78	68.86	13.32	2.45	100
5	1	6:1	0.5	1.59	4.96	8.83	66.35	15.42	2.35	100
6	1	6:1	0.61	9.86	3.82	6.19	32.1	43.88	3.54	100
7	1	9:1	0.64	15.12	32.18	5.53	27.03	8.77	10.73	100

4.7 Análisis estadístico

El modelo lineal establecido logra explicar el aumento en la proporción de FAME con respecto a la relación molar en un 80.78%, para un intervalo de confianza del 95%. El coeficiente de correlación (0.8988) indica que el incremento en la tasa de conversión está sujeto a la cantidad de metanol usada en la reacción. De manera que a mayor número de moles de metanol, mayor síntesis de metil ésteres (**Figura 18**).

Por otro lado, el análisis de varianza (ANOVA) revela que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (relaciones molares) y el porcentaje de FAME sintetizado tras la transesterificación ($P=0.0001$) (**Anexo C**). La correlación de Bonferroni empleada como prueba a posteriori permite ver que la proporción molar de metil ésteres es distinta para cada una de las relaciones molares manejadas en este estudio (**Anexo D**).

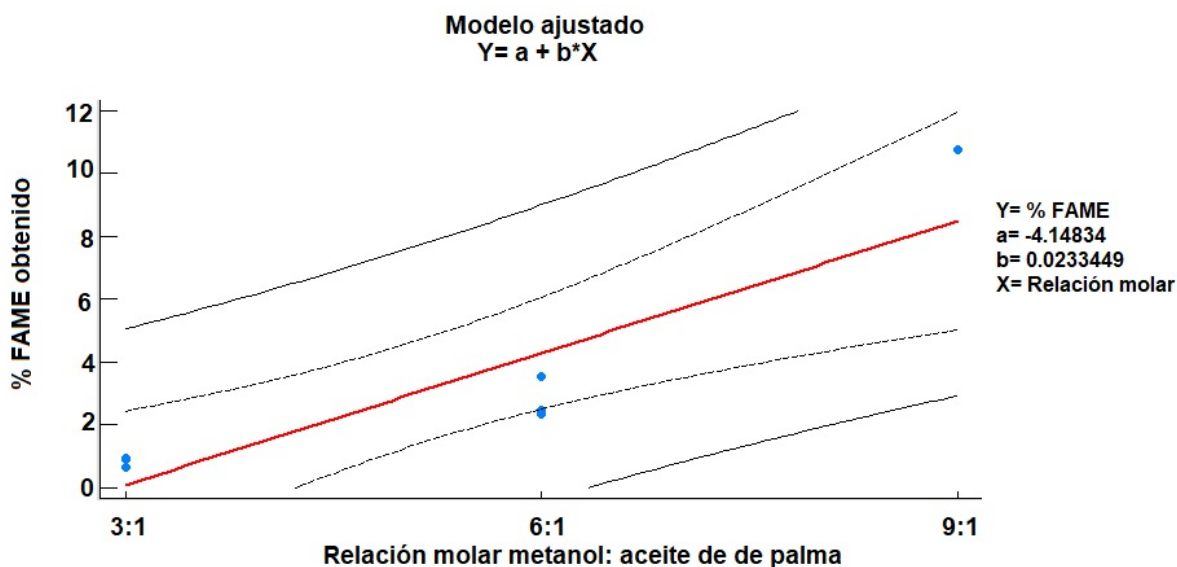


Figura 18. Modelo lineal para la correlación entre la relación molar y porcentaje de FAME obtenido. Donde Y= porcentaje de FAME; a= intercepto; b= pendiente de la recta; X= Relación molar empleada.

5. Discusión

La demanda de biocombustibles y el aumento en la producción de aceite de palma hacen necesaria la producción local sostenible, usando lipasas. Este estudio inicial investiga la viabilidad de BSLA para llevar a cabo la transesterificación del aceite de palma usando metanol, con el uso de extractos crudos. Se evalúa la viabilidad de la enzima bajo condiciones de expresión y de reacción a través de un diseño *in silico* seguido de ensayos de expresión *in vitro*. Finalmente, se corrobora la expresión mediante la detección de la actividad hidrolasa y se evalúan diferentes condiciones para llevar a cabo reacciones de transesterificación. Con base en este estudio y en el de Ying *et al.* 2007,

es válido concluir que BSLA promete ser una alternativa bacteriana al uso de lipasas comerciales empleadas a escala industrial. De los análisis realizados surgen los siguientes argumentos:

El diseño *in silico* muestra que no existen desviaciones atómicas sustanciales bajo la función RMSD para ninguno de los dos análisis. En ambos, la posición inicial del RMSD = 0.1 nm (1 Å), debido a la parametrización (Salleh *et al.* 2012). Finalmente, la desviación atómica de residuos bajo las condiciones establecidas en la DM fue de 0.15 Å para el sistema acuoso y de 1 Å en el caso del sistema bifásico. La magnitud de RMSD indica que no existen cambios estructurales significativos para BSLA (<0.5 nm) (Salleh *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2014; Senthilkumar *et al.* 2015). Estos resultados concuerdan con otros análisis de DM para BSLA realizados por Kamal *et al.* 2013 y otorgan una base bioinformática sólida para esperar estabilidad en la expresión heteróloga y la transesterificación enzimática de BSLA bajo las condiciones planteadas.

La sobreexpresión de la enzima fue funcional; la proteína se visualizó a la altura de 22.4 kDa y su expresión fue mayor en la fracción del periplasma, obteniéndose cantidades de enzima en promedio de ~0.77 U/mg en los extractos crudos. No obstante, también fue visible en menor intensidad en las fracciones CSDF, CIF y MF, indicando que existe una tendencia por parte de BSLA a acumularse en cuerpos de inclusión, posiblemente debido a una sobreproducción enzimática en el espacio periplasmático, que al saturarse impide el paso de más enzima. La proteína restante se acumula en la fracción insoluble citoplasmática o es liberada al medio (van Pouderooyen *et al.* 2001; Rahmen *et al.* 2016). La máxima expresión de BSLA se da luego de 3 h de inducción, por lo que se adoptó este tiempo para realizar los demás ensayos.

El nivel de expresión obtenido en este estudio permite obtener concentraciones de BSLA mayores a la reportada por otros estudios (ew.g., Rahmen *et al.* 2016); sin embargo, la enzima obtenida encuentra muy diluida. Para los ensayos de transesterificación se optó por concentrarla

mediante liofilización y diálisis. Cabe resaltar que el método usado corresponde a un proceso físico que elimina el exceso de líquido de la muestra. En consecuencia, las muestras siguen siendo extractos crudos, razón por la cual también aumentó la cantidad de proteína total (**Tabla 4**).

La evaluación de la hidrólisis del *p*-NPB en las fracciones celulares, permitió el mayor nivel de descomposición del sustrato para la fracción del periplasmática PF (A= 0.289) (**Figura 11**) y una actividad hidrolítica menor, pero de igual manera considerable para las fracciones de citoplasma soluble CSF (A = 0.094) y citoplasma insoluble CIF (0.055). De esta manera estos resultados confirman los visualizados en la electroforesis.

Las variaciones de pH y temperatura concuerdan con lo reportado en la literatura, con un óptimo a pH 9, (A= 0.629) (**Figura 13**), y 35 °C (A= 0.628) (**Figura 14**), evidenciando pérdida de actividad a temperaturas por encima de 40 °C. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se señala que la pérdida de actividad es producto de la una oligomerización lineal de la estructura secundaria, como mecanismo de defensa contra la agregación irreversible (Lesuisse *et al.* 1993; Rajakumara *et al.* 2008; Kübler *et al.* 2015).

Las muestras de aceite de palma usadas para evaluar la síntesis de FAME mediante transesterificación enzimática presentaban proporciones equitativas en la composición de ácidos grasos saturados (51.85%) e insaturados (48.15%) (**Tabla 5**). Estos últimos, compuestos en su mayoría por ácidos: oleico (41.81%), linoleico (5.67 %) y linolénico (0.67 %). La cuantificación de ácidos grasos muestra una composición mayoritaria de TAG (70.02%) y porcentajes de DAG y FFA del 16.78 % y 20 % respectivamente, mientras que no se detectó la presencia de MAG (**Figura 16**), coincidiendo con reportado en la bibliografía (Rincón & Martínez 2009; Ramos *et al.* 2009; Barraza *et al.* 2016).

Los perfiles de RMN-¹H analizados, confirman la síntesis de metil ésteres mediante la aparición del singlete en 3.67 ppm, señal característica de este compuesto (Knothe 2000; Mello *et al.* 2008; Anderson *et al.* 2012). Los porcentajes molares de TAG del aceite fueron degradados hasta en un 43 %, convirtiéndose en derivados como DAG, MAG y FFA, FAME y glicerol.

Se evidenció un comportamiento sn-3 por parte de BSLA, corroborando su capacidad catalítica como lipasa y sus estereoespecificidad. Por otro lado, en este trabajo se evidencia una conversión de FAME de hasta 10.73% usando una relación molar (9:1), con únicamente ~1U enzimática, fmostrando además que la conversión aumenta con respecto a la relación molar entre el alcohol y el sustrato (Maceiras *et al.* 2009).

Es prematuro hacer comparaciones con otras lipasas comerciales, debido a la gran cantidad de líquido en el que se encuentra diluida la enzima, dado que paralelamente a la transesterificación se lleva a cabo un proceso de hidrólisis que desfavorece la síntesis de FAME (**Tabla 6**). Adicionalmente, el rendimiento en la síntesis de FAME es susceptible a mejoramientos futuros, en donde se tenga en cuenta: los niveles bajos de enzima, volúmenes de agua en la reacción, purificación de la proteína y el uso de solventes orgánicos que mejoren la interacción de la reacción.

Pese a esto, BSLA demostró ser un biocatalizador potencial en la implementación de producción local de biodisel usando aceite de palma como materia prima. debido a su estabilidad estructural y capacidad catalítica. El paso a seguir será sin duda la purificación de BSLA para calcular su actividad específica y poder compararla con otras lipasas de referencia.

6. Conclusiones

En este trabajo se determinó la actividad transesterasa de extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el gen *LipA* de *Bacillus subtilis* entre triglicéridos del aceite de palma africana y metanol como aceptor acilo.

Se determinó la actividad de BSLA mediante análisis *in silico* y, posteriormente, se realizaron ensayos *in vitro*. La sobreexpresión de la enzima y la determinación de su actividad fueron llevadas a cabo con éxito.

También se llevaron a cabo reacciones de transesterificación usando $\sim 1U$ enzimática, y se realizaron variaciones en la relación molar de la reacción.

Los resultados arrojan valores de síntesis de FAME del 10.73% usando una relación molar 9:1 de metanol: aceite, demostrando el potencial uso de BSLA como modelo de producción a escala local. Sin embargo, deben mejorarse las condiciones de transesterificación en función de la relación molar, exceso de líquidos, tiempos de reacción, así como la concentración de la enzima, para que en un futuro se pueda establecer con una producción de biocatalizadores a bajo costo que permitan una alta síntesis de FAME.

7. Recomendaciones

Se recomienda purificar BSLA, con el fin de aumentar el número de unidades enzimáticas para llevar a cabo pruebas de transesterificación.

Llevar a cabo reacciones extra aumentando la carga enzimática.

Disminuir el volumen de resuspensión de la enzima, para mejorar la tasa de conversión de FAME evitando la hidrólisis.

Probar relaciones molares más altas de metanol: aceite de palma para determinar mejores conversiones.

Implementar el uso de solventes orgánicos en la reacción de transesterificación para mejorar la solubilidad entre el alcohol y el sustrato y su interacción con la enzima.

Estimar el tiempo de reacción para obtener 100 % de conversión de FAME.

Desarrollo de variantes solubles de la enzima que eviten la formación de cuerpos de inclusión.

Referencias Bibliográficas

- Abraham, M. Murtolad, T. Schulz, R. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 19–25.
- Anderson, L. A. & Franz, A. K. (2012). Real-time monitoring of transesterification by ^1H NMR spectroscopy: catalyst comparison and improved calculation for biodiésel conversion. *Energy & Fuels*, 26(10), 6404-6410.
- Antonczak, A. K. Simova, Z. & Tippmann, E. M. (2009). A critical examination of *Escherichia coli* esterase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28795-28800.
- Arnold, F. H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409(6817), 253.
- Asoodeh, A. & Ghanbari, T. (2013). Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85, 49-55.
- Augustyniak, W. Brzezinska, A. A. Pijning, T. Wienk, H., Boelens, R. Dijkstra, B.W. & Reetz, M. T. (2012). Biophysical characterization of mutants of *Bacillus subtilis* lipase evolved for thermostability: factors contributing to increased activity retention. *Protein Science*, 21(4), 487-497.
- Augustyniak, W. Wienk, H. Boelens, R. & Reetz, M. T. (2013). ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of wild-type *Bacillus subtilis* Lipase A and its mutant evolved towards thermostability. *Biomolecular NMR assignments*, 7(2), 249-252
- Bajaj, A. Lohan, P. Jha, P. N. & Mehrotra, R. (2010). Biodiésel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9-14.

- 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.
- Blank, K. Morfill, J. Gump, H. & Gaub, H. E. (2006). Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 125(4), 474-483.
- Boersma, Y. L. Pijning, T. Bosma, M. S. van der Sloot, A. M. Godinho, L. F. Dröge, M. J. & Quax, W. J. (2008). Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chemistry & biology*, 15(8), 782-789.
- 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.
- Brockmeier, U. Wendorff, M. & Eggert, T. (2006). Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. *Current microbiology*, 52(2), 143-148.
- Bruice, P. Y. *Organic Chemistry 4th Edition*. Irene Lee Case Western Reserve University Cleveland, OH. 2004.
- Chan, Y. H. Cheng, C. H. & Chan, K. M. (2003). Recombinant goldfish growth hormones (gfGH-I and-II) expressed in *Escherichia coli* have similar biological activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(4), 613-624.
- Chevallet, M. Luche, S. & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 1(4), 1852.
- Curtis, H. & Schnek, A. (2008). *Curtis. Biología. Ed. Médica Panamericana*.
- 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 (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1131(3), 253-260.

- Dartois, V. Coppee, J. Y. Colson, C. & Baulard, A. (1994). Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 60(5), 1670-1673.
- Dutra, J. da C. Terzi, S. & Vaz Bevilaqua, J. (2008). Lipase Production in Solid-State Fermentation Monitoring Biomass Growth of *Aspergillus niger* Using Digital Image Processing. *Appl Biochem Biotechnol*, 147:63–75.
- 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(3), 125-129.
- 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.
- Eggert, T. Pencreac'h, G. Douchet, I. Verger, R. & Jaeger, K. E. (2000). A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *European Journal of Biochemistry*, 267(21), 6459-6469.
- Eggert, T. van Pouderooyen, G. Dijkstra, B. W. & Jaeger, K. E. (2001). Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three- dimensional structure. *FEBS letters*, 502(3), 89- 92.
- Eggert, T. van Pouderooyen, G. Pencreac'h, G. Douchet, I. Verger, R. Dijkstra, B. W. & Jaeger, K. E. (2002). Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26(1), 37-46.
- Fedepalma (2017). *Con récord en producción de aceite de palma, sector palmero colombiano cierra 2017 con balance positivo*. [online] Available at: <http://web.fedepalma.org/con-record-en-produccion-de-aceite-de-palma-sector-palmero-colombiano-cierra-2017-con-balance-positivo> [Accessed 4 Apr. 2018].
- Firdaus, M. Y. Guo, Z. & Fedosov, S. N. (2016). Development of kinetic model for biodiesel production using liquid lipase as a biocatalyst, esterification step. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 52-61.

- Fjerbaek, L. Christensen, K. V. & Norddahl, B. (2009). A review of the current state of biodiésel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and bioengineering*, 102(5), 1298-1315.
- Flores I. S, Godinho M. S, De Oliveira, A. E, Alcantara G. B, Monteiro M. R, Menezes S. M. C, & Lião L. M (2012). Discrimination of biodiésel blends with ¹H NMR spectroscopy and principal component analyses. *Fuel*, 99, 40-44.
- Fulton, A. Frauenkron- Machedjou, V. J. Skoczinski, P. Wilhelm, S. Zhu, L. Schwaneberg, U. & Jaeger, K. E. (2015). Exploring the protein stability landscape: *Bacillus subtilis* lipase A as a model for detergent tolerance. *ChemBioChem*, 16(6), 930-936.
- Funke, S. A. Eipper, A. Reetz, M. T. Otte, N. Thiel, W. Van Pouderoyen, G. & Eggert, T. (2003). Directed evolution of an enantioselective *Bacillus subtilis* lipase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(2), 67-73.
- Gog, A. Roman, M. Toşa, M. Paizs, C. & Irimie, F. D. (2012). Biodiésel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39(1), 10-16.
- Guerrero-Olazarán, M. Cab-Barrera, E. Galán-Wong, L. J. & Viader-Salvadó, J. M. (2004). Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la aplicación en Acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 16-19.
- Guncheva, M. & Zhiryakova, D. (2011). Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 1-21.
- Hannig, G, & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*, 16(2), 54-60.
- Harris, J. L. & Craik, C. S. (1998). Engineering enzyme specificity. *Current opinion in chemical biology*, 2(1), 127-132.
- Hasan, F. Shah, A. Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol*, 39, 235–251.

- Held, D. K. Yaeger & R. Novy (2003). New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli*. *inNovations*18: 4-6.
- Helmholtz-muenchen.de (2018). Visible body: pET-22b(+) Vector. Munich, Germany. Novagen Publishing TB038 12/98. Recuperado de https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-22b_map.pdf.
- Hess, B. Kutzner, C. Van Der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*, 4(3), 435-447.
- Jaeger, K. E. Dijkstra, B. W. & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 315-351.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397.
- Jorgensen, W. L. (1991). Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science*, 254(5034), 954-956.
- Kay, K. H. & Yasir, S. M. (2012). Biodiésel production from low quality crude *Jatropha* oil using heterogeneous catalyst. *APCBEE Procedia*, 3, 23-27.
- Kamal, M. Z. Ali, J. & Rao, N. M. (2013). Binding of bis-ANS to *Bacillus subtilis* lipase: a combined computational and experimental investigation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(8), 1501-1509.
- Kawasaki, K. Kondo, H. Suzuki, M. Ohgiyai, S. & Tsuda, S. (2002). Alternate conformations observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase determined at 1.3 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(7), 1168-1174.
- Knothe, G. (2000). Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(5), 489-493.

- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiésel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel processing technology*, 86(10), 1059-1070.
- Knothe, G. & Kenar, J. A. (2004). Determination of the fatty acid profile by ¹H- NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(2), 88-96.
- Korman, T. Sahachartsiri, B. Charbonneau, D. (2013). Dieselzymes: development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiésel production by directed evolution. *Biotechnology for Biofuels*, 6:70.
- Kumar, V. Yedavalli, P. Gupta, V. & Rao, N. M. (2014). Engineering lipase A from mesophilic *Bacillus subtilis* for activity at low temperatures. *Protein Engineering, Design & Selection*, 27(3), 73-82.
- Kumari, V. Shah, S. & Gupta, M. N. (2007). Preparation of biodiésel by lipasecatalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy & Fuels*, 21(1), 368-372.
- Kübler, D. Ingenbosch, K. N. Bergmann, A. Weidmann, M. & Hoffmann-Jacobsen, K. (2015). Fluorescence spectroscopic analysis of the structure and dynamics of *Bacillus subtilis* lipase A governing its activity profile under alkaline conditions. *European Biophysics Journal*, 44(8), 655-665.
- Iacazio, G. Périssol, C. & Faure, B. (2000). A new tannase substrate for spectrophotometric assay. *Journal of microbiological methods*, 42(3), 209-214.
- Lai, C. C. Zullaikah, S. Vali, S. R. & Ju, Y. H. (2005). Lipase- catalyzed production of biodiésel from rice bran oil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(3), 331-337.
- Lara, Á. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223.
- Lee, S. K. & Keasling, J. D. (2008). Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. *Protein expression and purification*, 61(2), 197-203.

- 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. *The FEBS Journal*, 216(1), 155-160.
- Leung, D. Y. Wu, X. & Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiésel production using catalyzed transesterification. *Applied energy*, 87(4), 1083-1095.
- Luque, R. & Lovett, J. (2010). Biodiésel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. *Energy Environ*, 3, 1706–1721.
- Maceiras, R. Vega, M. Costa, C. Ramos, P. & Márquez, M. C. (2009). Effect of methanol content on enzymatic production of biodiésel from waste frying oil. *Fuel*, 88(11), 2130-2134.
- Marchetti, J. M. Miguel, V. U. & Errazu, A. F. (2007). Possible methods for biodiésel production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 11(6), 1300-1311.
- Mello, V. M. Oliveira, F. C. Fraga, W. G. do Nascimento, C. J. & Suarez, P. A. (2008). Determination of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiésel samples obtained by esterification using ¹H- NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46(11), 1051-1054.
- Meher, L. C. Sagar, D. V. & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiésel production by transesterification—a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 10(3), 248-268.
- Monteiro, M. R, Ambrozín A. R. P, da Silva Santos M, Boffo E. F., Pereira-Filho E. R, Lião L. M, & Ferreira A. G. (2009). Evaluation of biodiésel–diesel blends quality using ¹H NMR and chemometrics. *Talanta*, 78(3), 660-664.
- Mormeneo, M. Andrés, I. Bofill, C. Díaz, P. & Zueco, J. (2008). Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(3), 437-445.
- Morris, G. Huey, R. Lindstrom, W. Sanner, M. Belew, R. Goodsell, D. Olson, A. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry*, 16: 2785-91.

- Nantel, G. & Proulx, P. (1973). Lipase activity in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 316(2), 156-161.
- Naylor, R. L., & Higgins, M. M. (2017). The rise in global biodiésel production: Implications for food security. *Global Food Security*.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and molecular biology (nc-iubmb). (1979). Units of Enzyme Activity. *The FEBS Journal*, 97(2), 319–320.
- Novagen. (2005). *pET system manual. 11th edition*
- Ocampo Valencia, S. & Gleiser Dobrzynski, D. (2009). Agroindustria y conflicto armado. Colombia, ogot: Uniandes.
- Orçaire, O. Buisson, P. & Pierre, A. C. (2006). Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiésel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(3), 106-113.
- Parawira, W. (2009). Biotechnological production of biodiésel fuel using biocatalysed transesterification: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 29(2), 82-93.
- Piana, S, Klepeis, J. L, & Shaw, D. E. (2014). Assessing the accuracy of physical models used in protein-folding simulations: quantitative evidence from long molecular dynamics simulations. *Current opinion in structural biology*, 24, 98-105.
- Portela N. A, Oliveira E. C, Neto A. C, Rodrigues R. R, Silva S. R, Castro E. V, & Filgueiras P. R (2016). Quantification of biodiésel in petroleum diesel by 1H NMR: evaluation of univariate and multivariate approaches. *Fuel*, 166, 12-18.
- Quinn, D. M. Shirai, K. Jackson, R. L. & Harmony, J. A. (1982). Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of water-soluble *p*-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. *Biochemistry*, 21(26), 6872-6879.
- Quiroga, C. (2010). Optimización del cultivo de *Escherichia coli* para la producción de cutinasas recombinantes (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile

- R Core Team. (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- Rahmen, N. Büchs, J. & Jaeger, K. E. (2016). Characterization of recombinant protein production in *Escherichia coli* and its influence on host cell metabolic activity (No. RWTH-2016-01972). *Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik*.
- 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 (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(2), 302-311.
- Ramos, M. J. Fernández, C. M. Casas, A. Rodríguez, L. & Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, 100(1), 261-268.
- Rincón, S. M. & Martínez, D. M. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Revista Palmas*, 30(2), 11-24.
- Salleh, A. B. Rahim, A. S. M. A. Rahman, R. N. Z. R. A. Leow, T. C. & Basri, M. (2012). The role of Arg157Ser in improving the compactness and stability of ARM lipase. *Journal of Computer Science & Systems Biology*, 5(2), 39.
- Sánchez, M. Prim, N. Rándež-Gil, F. Pastor, F. I. & Diaz, P. (2002). Engineering of baker's yeasts, *E. coli* and *Bacillus* hosts for the production of *Bacillus subtilis* lipase A. *Biotechnology and bioengineering*, 78(3), 339-345.
- Santaniello, E. Ferraboschi, P. & Grisenti, P. (1993). Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme and microbial technology*, 15(5), 367. 382.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3932.
- Senthilkumar, B. Meshachpaul, D. Sethumadhavan, R. & Rajasekaran, R. (2015). Selection of effective and highly thermostable *Bacillus subtilis* lipase A template as an industrial biocatalyst-A modern computational approach. *Frontiers in biology*, 10(6), 508-519.

- Sezonov, G. Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Singh, B. Bulusu, G. & Mitra, A. (2015). Understanding the thermostability and activity of *Bacillus subtilis* lipase mutants: insights from molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(2), 392-409.
- Statgraphics Centurion, X. V. I. (2009). Statpoint technologies. INC. versión, 16, 17.
- Sugimura, K. & Higashi, N. (1988). A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 170(8), 3650-3654.
- Szczesna, M. Kubiak, A. (2009). Enzymatic biodiésel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, 34, 1185–1194.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 211-222.
- Treichel, H. de Oliveira, D. & Mazutti, M. (2010). A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol*, 3, 182–196.
- Van Gerpen, J. (2005). Biodiésel processing and production. *Fuel processing technology*, 86(10), 1097-1107.
- van Pouderoyen, G. Eggert, T. Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *Journal of molecular biology*, 309(1), 215-226.
- Vliegthart, J. F, Dorland L. & van Halbeek, H. (1983). High-resolution, ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (Vol. 41, pp. 209-374). Academic Press.
- Voet, D. Voet, J. G. & Pratt, C. W. (2007). Degradación de nucleótidos. *Fundamentos de Bioquímica, 2a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana.*

- Xiao, M. Mathew, S. (2009). Biodiésel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. *GCB Bioenergy*, 1, 115–125.
- Yang, M. Yu, X. W. 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 factories*, 14(1), 1.
- Ying, M. & Chen, G. (2007). Study on the production of biodiésel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing *Bacillus subtilis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 137(1-12), 793-803.
- Yun, H. S. Park, H. J. Joo, J. C. & Yoo, Y. J. (2013). Thermostabilization of *Bacillus subtilis* lipase A by minimizing the structural deformation caused by packing enhancement. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(11), 1223- 1229.
- Zha, D. Eipper, A. & Reetz, M. T. (2003). Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution. *ChemBioChem*, 4(1), 34-39.

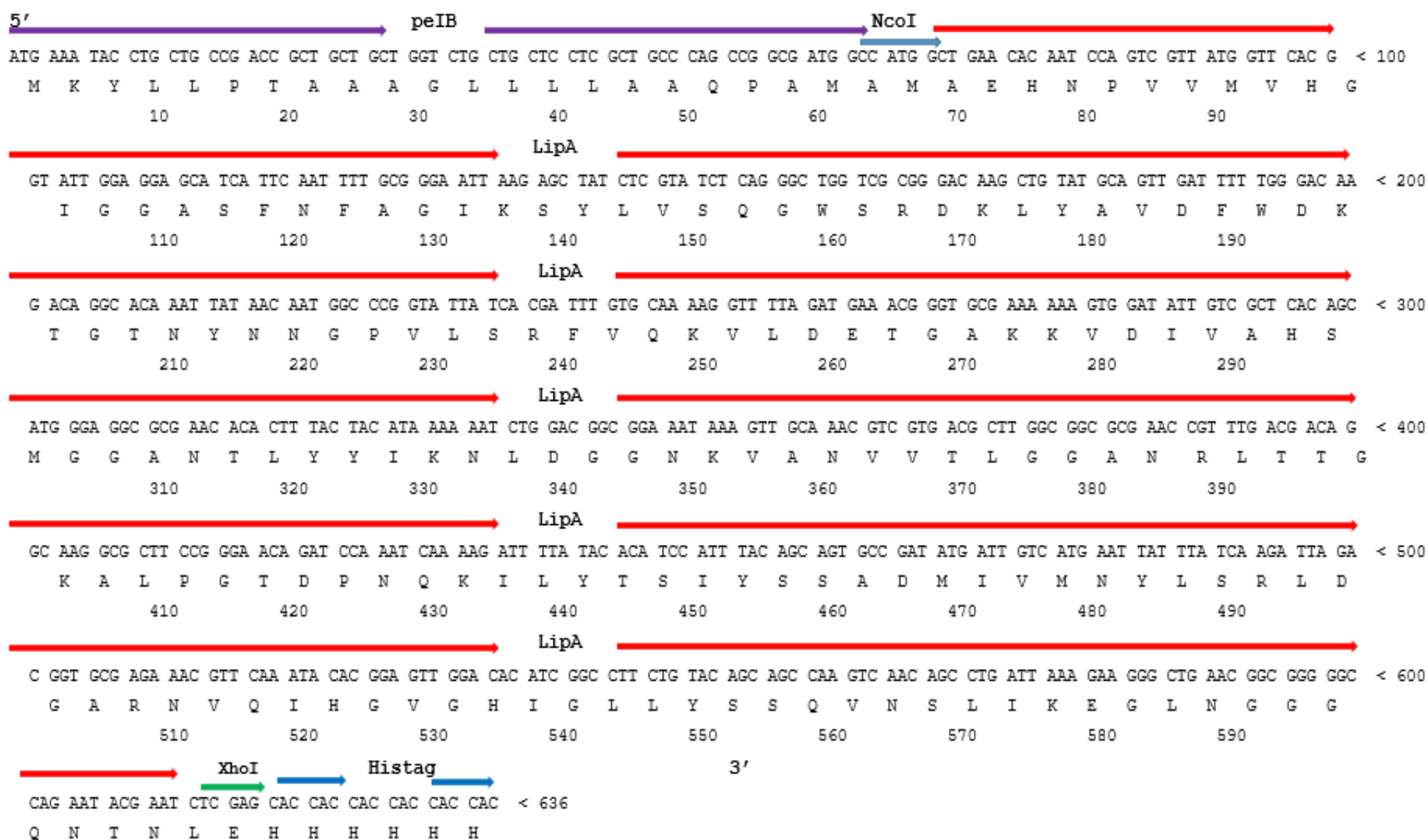
Apéndices

Apéndice A. Parámetros del equipo RMN-¹H en la detección-cuantificación de FAME y perfil de ácidos grasos

<i>Spectrophotometer Bruker Advance III 400 MHz</i>	
1H-frequency	400.19 MHz
Magnetic flux density (T)	9.4
Reference pattern	TMS
Pulse programming	Zg30
Number of scans	8-16
Probe (mm)	5
Temperature (k)	298.15
Response time (s)	5.45
Pulse time (s)	1
Spectral window (ppm)	15 (6009.62 Hz)
Sample size (mg)	8-12
Solvent	<i>CDCl</i> ₃

Apéndice B. Traducción del gen LipA BSLA.

Traducción gen lipA *Bacillus subtilis* en el vector pET22b(+).



Apéndice C. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre el porcentaje de FAME obtenido y las relaciones molares usadas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	74,025	2	37,0125	161,83	0,0001
Intra grupos	0,914867	4	0,228717		
Total (Corr.)	74,9399	6			

Apéndice D. Resultados de la corrección de Bonferroni empleada como prueba a posteriori.

Método: 95,0 % porcentaje Bonferroni

<i>Relación molar</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>	
3:1	3	0,826667	X	
6:1	3	2,78		X
9:1	1	10,73		X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
3:1 - 6:1	*	-1,95333	1,54663
3:1 - 9:1	*	-9,90333	2,18726
6:1 - 9:1	*	-7,95	2,18726