



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FOSFOLIPASA
DE *Brevibacillus thermoruber* HT42 AISLADO DE LA
ZONA GEOTERMAL LOS HUMEROS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

Q.C. JONATHAN LARA SÁNCHEZ

DIRECTORES:

**DRA. ROSA MARÍA OLIART ROS
DRA. CAROLINA PEÑA MONTES
DR. RODOLFO QUINTANA CASTRO**

H. Veracruz

12 de junio de 2021



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO.

Instituto Tecnológico de Veracruz
Subdirección Académica
División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

H. Veracruz, Ver., 17/junio/2020
OFICIO No. ITV/DEPI/222/2020

Asunto: Autorización de impresión

C. JONATHAN LARA SÁNCHEZ
PRESENTE

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Clonación y caracterización de una fosfolípasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42 aislado de la zona geotermal Los Humeros"

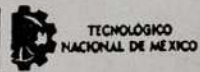
Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente

BENIGNO ORTIZ MUÑIZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST.

ROSA MARÍA OLIA RT ROS
PRESIDENTE



CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ
SECRETARIO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MIRNA L. SUÁREZ QUIROZ
VOCAL

CAROLINA PEÑA MONTES
SUPLENTE

RODOLFO QUINTANA CASTRO
SUPLENTE 2



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



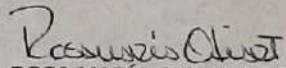
Instituto Tecnológico de Veracruz
Subdirección Académica
División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"


El presente trabajo de tesis titulado "Clonación y caracterización de una fosfolípasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42 aislado de la zona geotermal Los Humeros" presentado por el (la) C. Jonathan Lara Sánchez, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

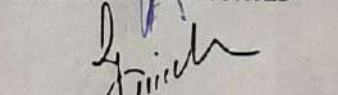
DIRECTOR


ROSA MARÍA OLIART ROS

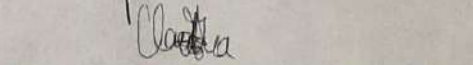
CO-DIRECTORA


CAROLINA PEÑA MONTES

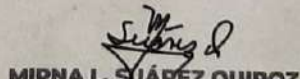
CO-DIRECTOR


RODOLFO QUINTANA CASTRO

REVISOR


CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ

REVISOR


MIRNA L. SUÁREZ QUIROZ



Cajz, Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500
www.veracruz.tecnim.mx



DEDICATORIA.

En primera instancia a Dios, porque en tiempos que no podía más, siempre me encomendé a él.

En segundo lugar y no menos importante, a mi familia, mis papas y mis hermanos, que siempre a pesar de la distancia, estuvieron conmigo, me dieron ánimos en tiempos difíciles, y un apoyo incondicional.

A Viviana que, en el camino de la maestría, nos conocimos y siempre recibí un apoyo y cariño especial.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que sin su apoyo no hubiera podido iniciar y terminar esta travesía del conocimiento científico.

Al Tecnológico de Veracruz, por abrirme las puertas de sus instalaciones y cobijarme en el transcurso de la maestría.

A la Doctora Rosi, que siempre me recibió con los brazos abiertos en el Laboratorio de Bioquímica de la UNIDA, por sus consejos, enseñanzas, paciencia, porque siempre tenía una solución ante los problemas y por la gran persona que es.

A la Doctora Carolina, que siempre me tendió la mano, y se preocupó por mí en tiempos que no salían las pruebas. Una excelente doctora.

Al Doctor Rodolfo, más que llamarlo como doctor, lo considero un amigo, porque además de regañarme, siempre me dio buenos consejos y asesorías.

A la Doctora Graciela, porque al pedirle un consejo, siempre tenía tiempo, por sus asesorías, regaños, además de que fue una excelente compañera en el laboratorio y siempre se preocupó para que salieran las pruebas.

En general, a todos porque siempre tuvieron palabras de apoyo, de ánimo y una buena platica para olvidar a veces el estrés de la maestría y aunque no menos importante a todos los regaños, que tomándolos de manera positiva hacen crecer y mejorar a uno como persona.

1. RESUMEN

Lara-Sánchez, Jonathan. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Tecnológico Nacional del México/Instituto Tecnológico de Veracruz. **Junio, 2020. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FOSFOLIPASA DE *Brevibacillus thermoruber* HT42 AISLADO DE LA ZONA GEOTERMAL LOS HUMEROS.** Directores: Oliart-Ros, Rosa María, Peña-Montes, Carolina y Quintana-Castro, Rodolfo.

El estudio de los microorganismos extremófilos ha contribuido a avances tecnológicos e industriales debido a que estos organismos y sus enzimas pueden soportar las condiciones drásticas que a menudo prevalecen en el ámbito industrial y biotecnológico. Actualmente, se ha estudiado una gran variedad de enzimas producidas por extremófilos con diversas de aplicaciones, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevas extremoenzimas con propiedades específicas. Las enzimas que hidrolizan a los fosfolípidos, llamadas fosfolipasas, han sido aplicadas con éxito en la industria de panadería, biosíntesis y modificación de lípidos, refinación de aceites comestibles y en productos farmacéuticos, sin embargo, son pocos los reportes de fosfolipasas de extremófilos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue la clonación y caracterización de una fosfolipasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42 para su aplicación biotecnológica. Se analizaron *in silico* dos secuencias de aminoácidos (PLA-HT y PLC-HT) que codifican para posibles fosfolipasas, y se encontró que PLC-HT está relacionada con una proteína de transporte en la membrana y no presenta sitio activo, por lo cual fue descartada. Se seleccionó una posible fosfolipasa A₂ (PLA-BT) en la que se identificó el canal oxianión y un sitio activo formado por una diada catalítica (Ser38-Asp183), característico de fosfolipasas citolíticas. Esta enzima fue clonada y expresada en *E. coli* BL21 DE3*pLysS*, con una actividad de 332.7 μKat, y se encontró que la proteína recombinante PLA-BT es una enzima termófila (60 °C)-alcalófila (pH 8) con peso molecular de 35.5 kDa, que posiblemente forma dímeros, y con preferencia por sustratos *p*-NF-ésteres.

Abstract

Lara-Sánchez, Jonathan. Master of Science in Biochemical Engineering. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Tecnológico Nacional del México/Instituto Tecnológico de Veracruz. **June, 2020. CLONING AND CHARACTERIZATION OF A PHOSPHOLIPASE OF *Brevibacillus thermuruber* HT42 ISOLATED FROM THE LOS HUMEROS GEOTHERMAL AREA. Directors:** Oliart-Ros, Rosa María, Peña-Montes, Carolina y Quintana-Castro, Rodolfo.

The study of extremophilic microorganisms has contributed to technological and industrial advances because these organisms and their enzymes can withstand the drastic conditions that often prevail in the industrial and biotechnological field.

Currently, a wide variety of enzymes produced by extremophiles have been studied with various applications, which has stimulated the search for new extreme enzymes with specific properties. The enzymes that hydrolyze phospholipids, called phospholipases, have been successfully applied in the bakery industry, biosynthesis and lipid modification, refining of edible oils, and in pharmaceuticals, however, there are few reports of phospholipases from extremophiles.

Therefore, the objective of the present work was the cloning and characterization of a *Brevibacillus thermoruber* HT42 phospholipase for its biotechnological application. Two genes (*pla-ht* and *plc-ht*) that code for possible phospholipases were analyzed *in silico*. It was found that PLC-HT might be a membrane transport protein and lacks an active site, for which it was discarded. A possible phospholipase A2 (PLA-BT) was selected in which the oxyanion channel was identified and an active site formed by a catalytic dyad (Ser38-Asp183), characteristic of cytolytic phospholipases. This enzyme was cloned and expressed in *E. coli* BL21 DE3pLysS, with an activity of 332.7 μ Kat. The recombinant protein PLA-BT was found to be a thermophilic (60 °C) -alkalophilic enzyme (pH 8) with a molecular weight of 35.5 kDa, which possibly forms dimers, with a preference for medium chain substrates.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Organismos extremófilos.....	3
2.2 Microorganismos termófilos.....	4
2.3 Fosfolipasas y sus sustratos.....	6
2.4 Aislamiento de fosfolipasas.....	8
2.5 Estructura y función de las fosfolipasas.....	10
2.5.1 Fosfolipasa A ₁ (EC 3.1.1.32).....	10
2.5.2 Fosfolipasa A ₂ (EC 3.1.1.4).....	12
2.5.3 Fosfolipasa B (EC 3.1.1.5).....	13
2.5.4 Fosfolipasa C (EC. 3.1.4.3).....	15
2.5.5 Fosfolipasa D (EC.3.1.1.4).....	16
2.6 Aplicaciones de las fosfolipasas.....	17
2.7 Fosfolipasas de microorganismos extremófilos.....	19
2.8 Fosfolipasas en Arqueas.....	19
2.9 Fosfolipasas en bacterias.....	20
2.10 <i>Brevibacillus thermoruber</i>	21
3 JUSTIFICACIÓN	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5 METODOLOGÍA	25
5.2 Análisis de traducción <i>in silico</i> de los genes de fosfolipasa y selección del gen.....	25
5.3 Análisis bioinformático de las posibles fosfolipasas de acuerdo con la secuencia de aminoácidos.....	27
5.4 Obtención del gen de interés.....	29
5.4.1 Extracción de DNA genómico.....	29

5.4.2	Diseño de oligonucleótidos para el gen de interés.....	30
5.4.3	Amplificación por PCR del gen de fosfolipasa.....	30
5.4.4	Determinación del tamaño del fragmento de PCR por electroforesis en geles de agarosa.	31
5.4.5	Purificación del gen amplificado.....	32
5.5	Clonación y expresión del gen de estudio.....	32
5.5.1	Vector de clonación	32
5.5.2	Digestión de los productos de PCR y vector de expresión pET28a (+).....	33
5.5.3	Ligación del producto de PCR y el vector.....	33
5.5.5	Preparación de células electrocompetentes de <i>E.coli</i> BL21 DE3 <i>pLysS</i> ...	34
5.6	Transformación.....	35
5.6.1	Transformación de las células competentes.....	35
5.6.2	Confirmación de inserción del gen por PCR de colonia.....	35
5.6.3	Inducción para la producción de la fosfolipasa recombinante.	36
5.6.4	Lisis celular para la recuperación de la fosfolipasa recombinante.....	36
5.6.5	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	36
5.6.6	Análisis de la actividad fosfolipasa <i>In situ</i>	37
5.6.7	Western Blot de la fosfolipasa recombinante.....	37
5.7	Caracterización de la enzima recombinante.	38
5.7.1	Ensayo de actividad enzimática en <i>p</i> -NP-ésteres.	38
5.7.2	Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	39
5.7.3	Evaluación del efecto del pH sobre la actividad enzimática	39
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1	Evaluación de la actividad fosfolipasa de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42 .	40
6.2	Análisis <i>in silico</i> de los genes de fosfolipasa y selección de dos genes de estudio.	40
6.3	Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PLA-BT	42
6.4	Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PLC-BT.....	44
6.5	Análisis de la proteína PLA-BT.....	46
6.5.2	Modelación de la estructura secundaria y terciaria de PLA-BT.....	50
6.5.3	Análisis de las interacciones proteína-proteína de PLA-BT.....	55

6.6	Análisis de la proteína PLC-BT	57
6.6.2	Modelación de la estructura secundaria y terciaria de PLC-BT.....	59
6.6.3	Análisis de las interacciones proteína-proteína de PLC-BT.	61
6.7	Extracción de DNA genómico de <i>Brevibacillus thermoruber</i>	63
6.7.2	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>pla-bt</i>	63
6.7.3	Amplificación por PCR y purificación del gen <i>pla-bt</i>	64
6.7.4	Confirmación del producto de PCR por secuenciación.	65
6.8.	Clonación y expresión del gen de estudio.	65
6.8.3	Inducción para la producción de la proteína PLA-BT.....	66
6.8.4	Western blot de la proteína PLA-BT.....	68
6.8.5	Análisis de la actividad fosfolipasa <i>in situ</i>	69
6.9	Caracterización de la PLA-BT recombinante en <i>p</i> -NP-ésteres.....	70
6.9.2	Determinación de la preferencia de sustrato	70
6.9.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad de PLA-BT.	71
6.9.4	Efecto del pH sobre la actividad de PLA-BT.	71
7.	CONCLUSIONES	73
7	BIBLIOGRAFÍA	74
8	APÉNDICES	84
	Apéndice A	84
	Apéndice B	87

LISTA DE TABLAS.

TABLA 2.1 Clasificación y ejemplos de extremófilos.	3
TABLA 2.2. Clasificación de los microorganismos de acuerdo con su temperatura de crecimiento.	5
TABLA 2.3. Enzimas de organismos extremófilos y sus aplicaciones.	5
TABLA 2.4. Clasificación de las fosfolipasas de acuerdo con la IUBMB.	7
TABLA 2.5. Clasificación y fuente de fosfolipasas. Adaptada de Borrelli, 2015.	9
TABLA 2.6 Superfamilia de fosfolipasas A ₂	12
TABLA 2.7. Sustratos empleados para la determinación de los tipos de fosfolipasa.	14
TABLA 2.8. Genes de la familia de las fosfolipasas D en eucariotas y procariotas.	17
TABLA 2.9. Aplicaciones industriales de diferentes fosfolipasas comerciales.	18
TABLA 2.10. Clasificación taxonómica de <i>Brevibacillus thermoruber</i>	21
TABLA 5.1. Composición de la mezcla de reacción para la PCR.	31
TABLA 5.2. Condiciones de reacción para PCR del gen <i>pla-bt</i>	31
TABLA 6.1. Fosfolipasas en el genoma de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42.	41
TABLA 6.2. Clasificación de las fosfolipasas de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42 de acuerdo con el Pfam.	42
TABLA 6.5. Residuos potenciales con las probabilidades más altas de pertenecer al sitio activo.	54
TABLA 6.6. Resumen de las proteínas relacionadas funcionalmente con PLA-HT.	57
TABLA 6.7. Residuos potenciales con las probabilidades más altas de pertenecer al sitio activo.	61
TABLA 6.8. Resumen de las proteínas relacionadas funcionalmente con PLC-HT.	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Posición de hidrólisis de las fosfolipasas (PL).	7
FIGURA 2.2. Estructura de fosfolipasas A1. a) modelo homólogo de PLA1 de veneno de serpiente. b) fosfolipasa pancreática de cobayo (GPLRP2). c) otras fosfolipasas de membrana (OMPLA).	11
FIGURA 2.3. Estructura de diferentes fosfolipasas A2 secretadas. a) pancreática de cerdo. b) líquido sinovial humano. c) veneno de cobra. d) A. mellifera. e) S. violaceoruber.	13
FIGURA 2.4 Estructura de las isoenzimas de PI-PLC, caracterizadas por un patrón y función en sus diferentes dominios.	15
FIGURA 2.5. Reacciones catalizadas por la fosfolipasa D.	16
FIGURA 5.1. Mapa del vector pET-28a (+)	33
FIGURA 6.1. Caja de Petri con medio LB+yema de huevo al 10%.	40
FIGURA 6.2. Alineación de la secuencia de aminoácidos de PLA-BT en la plataforma Blastp.	44
FIGURA 6.3. Alineación de los aminoácidos de la proteína PLA-BT por medio de la herramienta PFAM.	44
FIGURA 6.4. Alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteína PLC-BT en la plataforma Blastp.	46
FIGURA 6.5. Resumen de las características de la PLA-BT en diferentes bases de datos del PDB.	48
FIGURA 6.6. Representación gráfica de la distribución taxonómica de la familia de fosfolipasas similares a patatina (PF01734).	49
FIGURA 6.7. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PLA-BT de acuerdo con la base de datos PSIPREED.	50
FIGURA 6.8. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PLA-BT de acuerdo con la plataforma PDBsum.	51
FIGURA 6.9. Diagrama de la topología de la estructura secundaria similar a PLA-BT de acuerdo a la plataforma PDBsum.	52

FIGURA 6.10. Modelaje de la alineación estructural de la proteína objetivo (PLA-BT) y la estructuralmente idéntica de PDB (4FYA.A). Espiral: alfa-hélice; flecha: hoja beta.	53
FIGURA 6.11. Modelo predictivo para la estructura terciaria de la proteína PLA-BT obtenida con el servidor RaptorX.....	54
FIGURA 6.12. Sitios de unión a ligando y sitio activo de PLA-BT.....	55
FIGURA 6.13. Diagrama de la interacción proteína-proteína de la PLA-BT (BAH43284.1) con otras proteínas del microorganismo.	56
FIGURA 6.14. Representación gráfica de la distribución taxonómica de la familia de proteínas de función desconocida (PF13803).	58
FIGURA 6.15. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PLC-BT de acuerdo con la base de datos PSIPREED.	59
FIGURA 6.16. Diagrama de la topología de la estructura secundaria de la PLC-BT. Cilindros color rojo: alfa-hélices, flechas: hojas beta; cuadros amarillos: extremos amino (N) y carboxilo (C).	60
FIGURA 6.17. Modelo de la estructura terciaria de la proteína PLC-BT obtenida con el servidor RaptorX.....	60
FIGURA 6.18. Diagrama de la interacción proteína-proteína de la PLC-BT (JAQG01000029_gene2448) con otras proteínas del microorganismo.	62
FIGURA 6.19. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de DNA genómico.	63
FIGURA 6.20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación del gen <i>pla-bt</i> por PCR.....	64
FIGURA 6.21. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de colonia del gen <i>pla-bt</i>	66
FIGURA 6.22. Separación en SDS-PAGE de las proteínas producidas por E. coli BL21 DE3 pLysS transformada con el vector pET28a (+)- <i>pla-bt</i>	67
FIGURA 6.23. Western Blot de las proteínas producidas por BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)- <i>pla-bt</i>	68
FIGURA 6.24. Caja LB-YH con lecitina para evaluación de la actividad fosfolipasa	69

FIGURA 6.25 Efecto de longitud de cadena en la actividad fosfolipasa de la PLA-BT recombinante	70
FIGURA 6.26 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PLA-BT recombinante. El sustrato utilizado fue laurato <i>p</i> -nitrofenilo (<i>p</i> NPL), a pH 6.5.	71
FIGURA 6.27 Efecto del pH sobre la actividad de PLA-BT recombinante. El sustrato utilizado fue laurato <i>p</i> -nitrofenilo (<i>p</i> NPL), a 60°C.	72

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

PL	Fosfolipasa
PC	Fosfatidilcolina
PLA1	Fosfolipasa A1
PLA2	Fosfolipasa A2
PLB	Fosfolipasa B
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
<i>pla-ht</i>	Gen de fosfolipasa A ₂ de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42
<i>plc-ht</i>	Gen de posible fosfolipasa C de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42
PLA-HT	Proteína tipo fosfolipasa A ₂ de <i>Brevibacillus thermoruber</i> HT42
LB-YH	Medio LB, enriquecido con yema de huevo estéril al 10 %
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la clasificación de la Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), las fosfolipasas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar enlaces tipos éster (EC 3.1); están dentro de la superfamilia de las lipasas y mega familia de las hidrolasas. Constituyen un grupo diverso de enzimas con respecto a su función, secuencia de aminoácidos, y requerimientos, y están consideradas como enzimas ubicuas por estar presentes en los tres dominios de la vida.

Se han descrito cinco tipos de fosfolipasas A₁, A₂, B, C y D, que cumplen funciones específicas en la célula, y resultan atractivas biotecnológicamente para la modificación/producción de nuevos fosfolípidos. Por su amplia capacidad hidrolítica, han sido aplicadas en la industria de alimentos, nutraceúticos, grasas y aceites, cosméticos, productos agrícolas y farmacéuticos, entre otros (García y Cardona, 2009).

La mayoría de las fosfolipasas estudiadas provienen de organismos mesófilos, que tienen limitaciones de aplicación en ciertos procesos que se llevan a cabo a elevadas temperaturas, pHs, y/o presiones. Esto ha generado la búsqueda de nuevas fosfolipasas, a través de ingeniería de proteínas o de evolución dirigida, o aislándolas a partir de organismos que habitan en medios ambientes extremos, llamados extremófilos (Song *et al.*, 2005; Ramrakhiani y Chand, 2011). Las enzimas que producen los extremófilos, llamadas extremoenzimas, actúan de manera óptima en las condiciones extremas de los organismos que las producen, lo que les da ventajas biotecnológicas en comparación con aquellas que provienen de organismos mesófilos. En el caso particular de las fosfolipasas de extremófilos, éstas han sido poco estudiadas. Se han reportado principalmente fosfolipasas de arqueas (*Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix* y *Thermotoga lettingae*) (Kawarabayasi *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2015), y en bacterias, se ha descrito las fosfolipasas termófilas de *Serratia sp.* y de *Thermus sp.* (Fu *et al.*, 2008; Navas *et al.*, 2018).

La bacteria termófila *Brevibacillus thermoruber* HT42 fue aislada del suelo en la zona geotérmica de Los Humeros, Puebla. A partir de la secuenciación de su genoma, se detectaron 4,117 genes de los cuales 157 codifican para hidrolasas, entre los que se

distinguen cinco genes que codifican para posibles fosfolipasas (Vázquez-Tinajero, 2017).

En el presente trabajo se eligieron dos de esos genes, y se analizaron *in silico* para conocer la naturaleza de las proteínas que codifican, sus posibles funciones y la pertinencia de profundizar en su estudio. Se eligió el gen que codifica para una posible fosfolipasa A₂ para ser clonado y caracterizar bioquímicamente a la enzima, en la búsqueda de fosfolipasas con funciones novedosas de aplicación biotecnológica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Organismos extremófilos

Los organismos extremófilos fueron descritos por primera vez por McElroy en 1974, en referencia a ciertos microorganismos que son capaces de vivir en ambientes extremos (McElroy, 1974). Actualmente se conoce una gran variedad de hábitats naturales como aguas termales, zonas volcánicas, lagos salados y zonas polares, entre otros, en donde existen condiciones tanto físicas y químicas que se consideran extremas desde el punto de vista antropocéntrico, que son capaces de albergar microorganismos extremófilos (Oliart-Ros *et al.*, 2016). Los organismos que viven en estos ambientes pertenecen principalmente a los dominios Arquea y Bacteria (Margulis, 2007).

Los microorganismos extremófilos se clasifican de acuerdo con la condición extrema en la que habitan (Tabla 1): altas o bajas temperaturas, medios ácidos o alcalinos, altas presiones osmóticas o atmosféricas, ambientes con alta radiación o desecación, entre otros. Estos microorganismos tienen la capacidad de vivir a estos hábitats ya que poseen adaptaciones estructurales y bioquímicas específicas para cada condición (Gomes, 2004; Ramírez *et al.*, 2006).

TABLA 1 Clasificación y ejemplos de extremófilos.

Parámetro ambiental	Tipo	Definición	Ejemplos
Temperatura	Hipertermófilos	Crecimiento >80 °C	<i>Pyrolobus fumari</i> , 113 °C
	Termófilos	Crecimiento 45-80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	Mesófilos	15 – 45 °C	<i>Homo sapiens</i>
	Psicrófilos	< 15 °C	<i>Psychrobacter</i> , algunos insectos.
Radiación			<i>Deinococcus radiodurans</i> .
Presión	Barófilos	Presión mayor a 1 atm	Desconocido
	Piezófilos	Presión normal	Microbios 130 MPa
Gravedad	Hipergravedad	>1g	Desconocido
	Hipogravedad	<1g	desconocido
Vacío		Tolerantes al vacío	Tardígrado, insectos, microbios, semillas
Desecación	Xerófilos	Anhidrobiótico	<i>Artemia salina</i> ; nemátodos, microbios, hongos.
Salinidad	Halófilos	Presencia de sal de 2 a 5 M NaCl	<i>Halobacteriaceae</i> , <i>Dunaliella salina</i>
	Alcalófilos	pH >9	<i>Natronobacterium</i>

pH	acidófilos	pH bajo	<i>Bacillus, Spirulina spp.</i>
Tensión de oxígeno	Anaeróbico	No toleran O ₂	<i>Methanococcus jannaschii.</i>
	Microaerófilo	Algunos tolerantes a O ₂	<i>Helicobacter pylori</i>
Condiciones Químicas	Aeróbico	Requieren O ₂	<i>H. sapiens</i>
	Gases metales	Pueden tolerar altas concentraciones de metales (metalotolerantes).	<i>C. caldarium</i> <i>Ferroplasma acidamanus</i>

Se han estudiado diversos grupos de extremófilos y se ha generado conocimiento respecto a su fisiología y metabolismo, en particular de sus enzimas, a las que se denominan extremoenzimas, ya que tienen el valor agregado de poder tener usos en procesos industriales en condiciones extremas en comparación con sus contrapartes mesófilos (Madigan *et al.*, 1997; Van Den Burg, 2003; Morozkina *et al.*, 2010). Gracias a los avances en las técnicas de clonación y expresión de genes, se han podido obtener en suficiente cantidad y estudiar extremoenzimas producidas por microorganismos extremófilos de difícil cultivo (Rossi *et al.*, 2003; Van Den Burg, 2003; Elleuche *et al.*, 2014).

2.2 Microorganismos termófilos

Los microorganismos termófilos se caracterizan por tener una temperatura óptima de crecimiento mayor a 45 °C, en contraste con las bacterias mesófilas que crecen de manera óptima entre 25 y 40 °C (Gomes, 2004). Se han encontrado tanto arqueas como bacterias que tienen la capacidad de crecimiento a temperaturas altas (Niehaus *et al.*, 1999). Algunas características que les permiten vivir en estas condiciones son ciertas modificaciones en la composición de la membrana, con ácidos grasos de cadena larga, incremento de la concentración de electrolitos, y modificaciones de la molécula de DNA que incrementan su estabilidad. En el dominio de las arqueas, por ejemplo, las cadenas isoprenoides de sus membranas impiden su desnaturalización a elevadas temperaturas y presiones (Koga, 2012).

TABLA 2. Clasificación de los microorganismos de acuerdo con su temperatura de crecimiento.

Temperatura	Descripción
Hipertermófilos	Temperatura óptima de crecimiento por encima de los 80 °C; temperatura máxima entre 110 y 113 °C
Termófilos	Temperatura óptima de crecimiento por encima de los 45 °C
Mesófilos	Temperatura óptima alrededor de 37 °C. Frecuentemente son capaces de crecer en rangos alrededor de 25 a 45 °C
Psicrófilos	Capaces de crecer por debajo de 5 °C y con temperaturas máximas de 20 °C. Frecuentemente son capaces de crecer alrededor de 10 °C.
Psicrófilos facultativos	Temperatura óptima de 15 °C, máxima de 20 °C y mínima por debajo de 0 °C

El estudio de los extremófilos ha permitido la obtención de enzimas con gran potencial científico e industrial; una de las extremoenzimas más relevantes es la DNA polimerasa, utilizada ampliamente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Diversas enzimas de extremófilos se han purificado y sus genes clonado con éxito en hospederos mesófilos, y se han caracterizado y explorado sus aplicaciones para la industria; entre ellas se pueden encontrar las amilasas, proteasas, lipasas, pululanasa, celulasas, quitinasas, xilanasas, pectinasas, entre otras (Tabla 2.3) (Niehaus *et al.*, 1999; Van Den Burg, 2003; Dumorné *et al.*, 2017).

TABLA 3. Enzimas de organismos extremófilos y sus aplicaciones.

Tipo	Enzima	Aplicaciones
Termófilos	Proteasas	Detergentes, alimentos, cervecería, panadería
	Glicosil hidrolasas (amilasas, pululanasa, glucoamilasas, glucosidasas, celulasas, xilanasas)	Procesamiento de almidón, quitina, celulosa, pectina, textiles, papel
	Quitinasas	Modificación de quitinas, productos de higiene, alimentos
	Lipasas, esterases	Detergentes, transesterificación, biosíntesis orgánica
	DNA polimerasas	Biología molecular (PCR)
	Deshidrogenasas	Reacciones de oxidación

Psicrófilos	Proteasas, amilasas, celulasas, lipasas	Detergentes, alimentos, panadería, textiles, cosméticos, papel
Halófilos	Proteasas	Síntesis de péptidos
	Deshidrogenasas	Biocatálisis en medios orgánicos
Alcalófilos	Proteasas, celulasas	Detergentes, alimentos
Acidófilos	Amilasas, glucoamilasas	Procesamiento de almidón
	Proteasas, celulasas	Alimentos
Piezófilos	Por ser definidas	Procesamiento de alimentos, producción de antibióticos

Las enzimas termófilas tienen una gran diversidad de aplicaciones, debido a que además de la termoestabilidad, tienen alta resistencia a la presencia de agentes desnaturizantes y suelen ser estables a cambios de pH, por lo que se han estudiado para su aplicación en la industria, generando enzimas capaces de actuar en procesos químicos, en las industrias de alimentos y detergentes, entre otras (Pennisi, 1997; Raddani *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 1999).

2.3 Fosfolipasas y sus sustratos

Las fosfolipasas son hidrolasas que catalizan la reacción de hidrólisis de ésteres de acilo y ésteres de fosfato de los fosfolípidos, y están definidas por la posición en donde pueden hidrolizar a la molécula (Figura 2.1) (Dennis, 1983). Los fosfolípidos son parte fundamental de las membranas biológicas, además de los glucolípidos y el colesterol. Las enzimas que actúan sobre los fosfolípidos están ampliamente distribuidas en la naturaleza, desempeñando una variedad de funciones, como por ejemplo en la transducción de señales generando mediadores lipídicos, en los procesos de digestión de lípidos, o en la síntesis del veneno de serpiente, entre otros (Dennis *et al.*, 1991; Fannani y Maggio, 1997). El uso de las fosfolipasas en los procesos industriales está en crecimiento debido a las amplias aplicaciones en las industrias alimentarias, de nutraceúticos y para la modificación de lípidos (De María *et al.*, 2007; Aloulou *et al.*, 2012).

Los sustratos de las fosfolipasas se encuentran principalmente en una membrana o micela, aunque también pueden actuar sobre fosfolípidos en medio acuoso (Dennis, 2015). Los sustratos principales suelen ser los fosfolípidos, pero también pueden actuar sobre los enlaces éster hidrófobos de triacilglicéridos (Borelli, 2015).

La Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) clasifica a las fosfolipasas en el grupo de las hidrolasas, y de acuerdo con el enlace éster para los que son específicas, se clasifican en cinco tipos: PLA₁, PLA₂, PLB, PLC y PLD (Tabla 2.4).

TABLA 4. Clasificación de las fosfolipasas de acuerdo con la IUBMB.

Fosfolipasa	Clasificación
PLA ₁	3.1.1.32
PLA ₂	3.1.1.4
PLB	3.1.1.5
PLC	3.1.4.3
PLD	3.1.4.4

Como se muestra en la Figura 2.1, las fosfolipasas A₁ y A₂ escinden grupos acilo para formar lisofosfolípidos, al hidrolizar los ésteres de ácido carboxílico en la posición *sn*-1 (PLA₁) o *sn*-2 (PLA₂) (Hass, 2008). La fosfolipasa C (PLC) es una fosfodiesterasa, responsable de la hidrólisis del enlace glicerofosfato que une al grupo de cabeza polar al glicerol. La fosfolipasa D (PLD) genera ácido fosfatídico, catalizando la hidrólisis de glicerofosfolípidos en el fosfodiéster terminal del fosfolípido (Hass, 2008; Pelley, 2012).

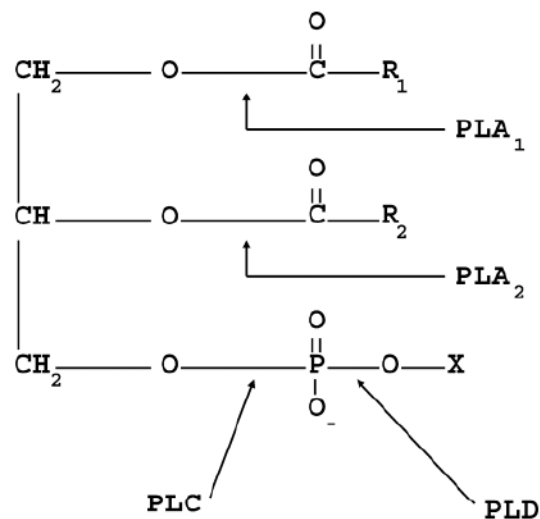


FIGURA 1. Posición de hidrólisis de las fosfolipasas (PL).

Los productos de hidrólisis de las fosfolipasas son diferentes, dependiendo del tipo de enzima de la que se trate, entre los que se destacan los lisofosfolípidos, los ácidos grasos libres, los di- acilglicéridos, los fosfatos de colina, lo que les confiere amplias aplicaciones en la industria, como en la elaboración de pan, de mayonesa y refinamiento de aceites, vegetales, preparación para humectantes de la piel, síntesis de surfactantes, detergentes y aplicaciones terapéuticas como agentes antiinflamatorios. Aunque existen comercialmente fosfolipasas para la industria, como por ejemplo la YieldMAX™, LysoMax, Lipomod 699L, Lecitase 10L, Maxapal A2, entre otras (Shimizu *et al.*, 2006; Castello *et al.*, 1998; Clausen, 2001), existe el interés de obtener nuevas enzimas con actividades mejoradas.

2.4 Aislamiento de fosfolipasas

Dada la importancia biológica de las fosfolipasas en las células, éstas se han encontrado y descrito en todos los dominios (De María *et al.*, 2007; Dennis, 2015). Se han encontrado fosfolipasas A₁ en animales, plantas, hongos y bacterias, sin embargo, las enzimas purificadas de este grupo han sido poco exploradas en comparación con otras fosfolipasas (De María *et al.*, 2007); en mamíferos se han encontrado tanto intracelular como extracelularmente, con la particularidad de que no comparten homología en sus secuencias y realizan funciones distintas (Richmond, 2011). Las PLA₂ se han identificado en animales, plantas y levaduras (Schaloske *et al.*, 2006; Verlotta *et al.*, 2013; Köhler *et al.*, 2006). La mayoría se han aislado a partir de páncreas de bovino, veneno de serpientes y abejas, y en otros órganos de animales (Ulbrich, 2000).

Las PLC se dividen en dos grupos: las específicas de fosfatidilinositol y las específicas de fosfatidilcolina (PI-PLC y PC-PLC). En mamíferos se han encontrado trece isoenzimas de PI-PLC (Szumilo, 2008; Gresset *et al.*, 2012). Las PLD se identificaron por primera vez en plantas, y posteriormente se detectaron y caracterizaron isoformas en mamíferos, bacterias, levaduras y virus (Selvy *et al.*, 2011). En la Tabla 2.5 se muestran algunas fosfolipasas que han sido estudiadas.

TABLA 5. Clasificación y fuente de fosfolipasas. Adaptada de Borrelli, 2015.

Tipo	General	Organismo	Nombre	Referencia
PLA ₁	Animal	<i>Rattus norvegicus</i>	PS-PLA ₁	Aoki <i>et al.</i> , 2016
		<i>Homo sapiens</i>	mPA-PLA _{1α} , mPA-PLA _{1β}	Aoki <i>et al.</i> , 2016
		<i>Mus musculus</i>	p125	Aoki <i>et al.</i> , 2016
	Planta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DAD1	Ishiguro, 2001
	Hongos y levaduras	<i>Aspergillus oryzae</i>	AoPLA ₁	Richmond, 2011
	Protozoario	<i>Trypanosoma brucei</i>	TbPLA ₁	Richmond, 2012
	Bacteria	<i>Streptomyces alboflavus</i>	SaPLA ₁	Aloulou <i>et al.</i> , 2012
<i>Escherichia coli</i>		OMPLA	Aloulou <i>et al.</i> , 2012	
PLA ₂	Animal	Humano, Porcino, Abeja, Víbora, Escorpión	sPLA ₂ (Grupo IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XII)	Schaloske, 2006
		Humano y Murino	cPLA ₂ (Grupo IVA-IVF), iPLA ₂ (Grupo VIA-VIF)	Schaloske, 2007
	Planta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sPLA ₂ (Grupo XIA and XIB), Patatin-like phospholipase	Verlotta, 2013
		<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Gibberella zeae</i>	sPLA ₂ (Grupo XIV)	Köhler <i>et al.</i> , 2006
	Hongos y levaduras	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	cPLA ₂ (Grupo IVC)	Köhler <i>et al.</i> , 2006
		<i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Patatin-like phospholipase	Köhler <i>et al.</i> , 2006
	Bacteria	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Streptomyces violaceoruber</i>	sPLA ₂ (Grupo XIV)	Köhler <i>et al.</i> , 2006
PLB	Animal	Humano, Cerdo, Ratón, Conejo, Víboras	PLB	Xu, 2009
	Planta	Haba	PLB-like	Helmy, 1999
	Hongos y levaduras	<i>Candida albicans</i>	CaPlb1-5	Djordjevic, 2010
		<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CnPlb1, PLB ₁ -PLB ₃	Djordjevic, 2010
	Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	LipC	Jiang, 2012
		<i>Streptomyces sp.</i>	PLB ₆₈₄	Jiang, 2013
Animal	Mamíferos	PI-PLC-β, PI-PLC-γ, PI-PLC-δ, PI-PLC-ξ, PI-PLC-η, PI-PLC-like	Gresset, 2012	

PLC	Planta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PI-PLC, NPC	Pokotylo <i>et al.</i> , 2014
	Hongo y levadura	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida albicans</i>	PI-PLC (CaPLC1-CaPLC3)	Djordjevic, 2010
	Bacteria	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	PI-PLC	Pokotylo <i>et al.</i> , 2013
		<i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PC-PLC	Pokotylo <i>et al.</i> , 2014
Animal	Mamíferos	PLD1, PLD2, PLD3, mitoPLD	Selvy <i>et al.</i> , 2011	
PLD	Planta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C2-PLD (PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ), PXP-PLD (PLD ζ 1, PLD ζ 2)	Khatoon <i>et al.</i> , 2015
	Hongo y levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLD1 (Spo14), PLD2	Waksman <i>et al.</i> , 1997
	Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	Bfil	Selvy <i>et al.</i> , 2011
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptomyces PMF</i>	PLDa, PMF PLD	Selvy <i>et al.</i> , 2012, 2013

2.5 Estructura y función de las fosfolipasas

Como ya se ha mencionado, las fosfolipasas pueden ser de cuatro tipos, y cada uno de ellos cuenta con una estructura, función y aplicaciones industriales, farmacéuticas y biotecnológicas específicas.

2.5.1 Fosfolipasa A₁ (EC 3.1.1.32)

Las enzimas de este tipo hidrolizan en la posición *sn-1* de los fosfolípidos, produciendo 2-acil-lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. En mamíferos se han descrito varias enzimas con esta actividad, entre las que se destacan la fosfolipasa de fosfatidilserina (PS-PLA₁) específica de plaquetas. A partir del 2011 se dividieron en dos grupos clasificados en seis enzimas extracelulares y tres intracelulares (Aoki *et al.*, 2007; Richmond, 2011); La PLA₁ de avispon; y. Las PLA₁ veneno de avispon y de ácido fosfatídico PLA₁ (PA-PLA₁) difieren de otros miembros por la especificidad de sus sustratos, características estructurales y organización de genes (Aoki *et al.*, 2002; Arrima

et al., 2012). En fosfolipasas pancreáticas, Aoki en 2007 describió que los miembros de fosfolipasa que exhiben actividad PLA₁ (PS-PLA₁, mPA-PLA₁alpha y mPA-PLA₁beta, PLRP2 de cobayo y PLA₁ de veneno de avispon (Dolml)) tienen tapas cortas. En segundo lugar, PS-PLA₁, mPA-PLA₁alfa, mPA-PLA₁beta y Dolml, que exhiben solo actividad de PLA₁, tienen bucles en laminas beta cortos. Esto debido a que sus estructuras terciarias, la tapa y el bucle que cubren el sitio activo hace que presenten diferencias de funciones (Aoki *et al.*, 2007). En la figura 2.2 se muestran las diferentes estructuras de fosfolipasas A₁

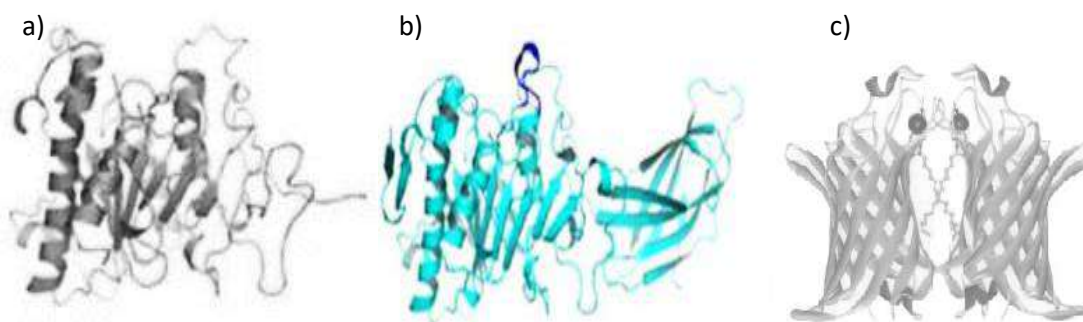


FIGURA 2. Estructura de fosfolipasas A₁. a) modelo homólogo de PLA₁ de veneno de serpiente. b) fosfolipasa pancreática de cobayo (GPLRP2). c) otras fosfolipasas de membrana (OMPLA).

En plantas, la PLA₁ regula la biosíntesis del ácido jasmónico, relacionado con la señalización química para la defensa contra insectos, además del crecimiento, entre las que se destacan fosfolipasas DAD1 y AtLCAT3. En el caso de bacterias, se ha podido aislar una fosfolipasa (PhIA) de *Serratia liquefaciens*, que fue expresada y secretada dependiendo de la fase de crecimiento, otra fosfolipasa identificada (YplA) en *Yersinia enterocolitica* (Givskov, 1988; Ishiguro *et al.*, 2001; Richmond, 2011). Las PLA₁ de *Escherichia coli* conocidas como fosfolipasa A de membrana externa (OMPLA) presentan una amplia especificidad de sustrato, demostrando tener actividad PLA₁, PLA₂, lisoPLA₁ lisoPLA₂ y también en hidrólisis de mono y diacilglicerol (Wilton y Waite, 2002).

Se conoce que ciertas PLA₁ se usan como surfactantes en la industria de los alimentos, cosméticos y farmacéutica. Aunque hay diversas fuentes para la obtención de estas enzimas, no hay mucha disponibilidad comercial, debido a dificultades de producción, clonación y purificación (Richmond, 2011).

2.5.2 Fosfolipasa A₂ (EC 3.1.1.4)

Estas enzimas presentes en todos los dominios, catalizan la hidrólisis del enlace éster en la posición *sn*-2, alterando así la estructura de las membranas o generando mediadores biológicos, entre otras funciones (Anderson *et al.*, 2014).

La superfamilia de las fosfolipasas A₂ consta de 15 grupos (Tabla 2.6) y de ellos derivan varios subgrupos. Entre los tipos importantes de PLA₂ se destacan PLA secretado (sPLA₂), citolítico (cPLA₂), independiente de Ca²⁺ (iPLA₂s), dependiente de Ca²⁺ (cPLA₂s), factor activador de plaquetas acetilhidrolasas (PAF-AH) y lisosomal (L-PLA₂s) (Schaloske, 2006; Burke, 2009).

TABLA 6 Superfamilia de fosfolipasas A₂.

Tipo	Grupo	Subgrupo	Masa molecular (kDa)	Residuos catalíticos
sPLA ₂	GI	A, B	13- 15	
	GII	A, B, C, D, E, F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	his/Asp
	GX		14	
	GXI	A, B	12-13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
cPLA ₂	GIV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ε), F(ζ)	60-114	Ser/Asp
iPLA ₂	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ), F(η)	84-90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA ₂), B(PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
	GVIII	A(α ₁), B(α ₂), β	26-40	
LpPLA ₂	GXV		45	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI		18	His/Cys

Estas enzimas tienen localización intracelular y extracelular, y han sido identificadas en diversos animales, tejidos de mamíferos, plantas, hongos, levaduras, bacterias y algunos virus (Köhler *et al.*, 2006; Schaloske, 2006; Verlotta *et al.*, 2013) (Figura 2.3).

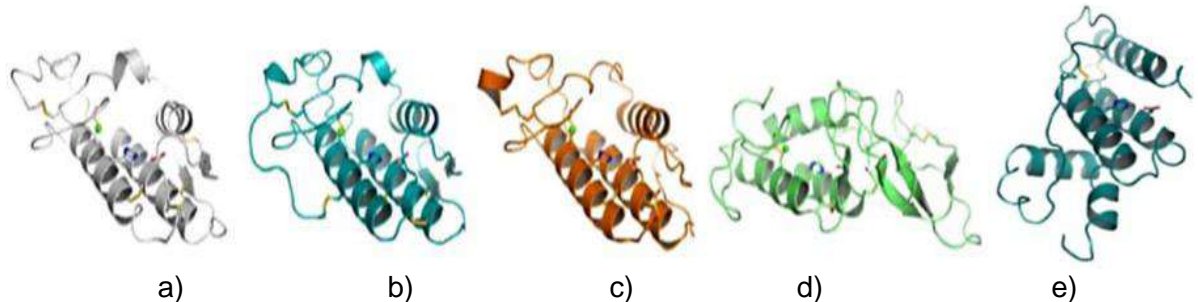


FIGURA 3. Estructura de diferentes fosfolipasas A2 secretadas. a) pancreática de cerdo. b) líquido sinovial humano. c) veneno de cobra. d) *A. mellifera*. e) *S. violaceoruber*.

Las sPLA₂ fueron unas de las primeras fosfolipasas descubiertas y que se pueden encontrar en veneno de serpientes, de escorpiones, en jugos pancreáticos, y en tejidos de mamíferos. La mayoría de estas enzimas presentan activación interfacial cuando el sustrato se presenta en un agregado de lípidos, y pueden funcionar como antimicrobianos, antiinflamatorios y receptores. Tal caso de las cPLA₂ aisladas de diferentes mamíferos, y su función engloba procesos antiinflamatorios. Así mismo, las diferentes enzimas PLA₂ cumplen funciones tanto como inhibidores y señalizadores y tienen aplicaciones industriales, y biotecnológicas (Schaloske, 2006; Burke, 2009; Dennis *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2015).

2.5.3 Fosfolipasa B (EC 3.1.1.5)

La fosfolipasa B fue descrita en 1933 como lecitasa B, ya que se demostró que actuaba sobre el enlace acil-éster de la liolecitina (Contardi y Ercoli, 1933); 40 años después McMurray y Magee (1973) reportaron que esta enzima hidrolizaba de manera simultánea ambos ésteres en posición *sn-1* y *sn-2* sin la acumulación de lisofosfolipasa, pudiendo ser confundida con una fosfolipasa A₁ y A₂. Actualmente se diferencian por su acción sobre sustratos específicos, y se conoce que la fosfolipasa B hidroliza tanto los enlaces de acil éster de diacilfosfolípidos (diacil-hidrolasa) como el enlace del acil éster de monoacilfosfolípidos o lisofosfolípidos (monoacil-hidrolasa), por lo que se le denominó genéricamente como lisofosfolipasa (Tabla 2.7) (Saito., 2014).

TABLA 7. Sustratos empleados para la determinación de los tipos de fosfolipasa.

Actividad	Substrato
Fosfolipasas B	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilcolina
Fosfolipasa A₁	2,3-diacil- <i>sn</i> -glicero-1-fosforilcolina
Fosfolipasa A₂	1-alkil(ó1-alk-1'etil)-2-acil-glicerofosforilcolina.
Lisofosfolipasa L₁	1-acil-glicerofosforilcolina
Lisofosfolipasa L₂	2-acil-glicerofosforilcolina

La ocurrencia de la fosfolipasa B en la literatura es variada, porque su definición no estaba claramente definida. Saito (2014) sugirió que para determinar a las fosfolipasas B, la enzima debe estar pura y debe tener actividad fosfolipasa B y lisofosfolipasa (A₁ y A₂) y los lisofosfolípidos no deben encontrarse entre los productos finales. En la actualidad, esta enzima ha sido reportada en procariotas, eucariotas y hongos. Hayaishi y Kornberg, en 1954, reportaron la actividad de fosfolipasa B en una cepa de *Serratia polymuthicum* aislada de suelo, y en años posteriores se describieron enzimas fosfolipasas B en *Mycobacterium phlei*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp* (Scandella y Kornberg.,1971; Nishijima *et al.*,1974; Raybin *et al.*,1972). En el transcurso de los años se han reportado la presencia de esta enzima en mucosa intestinal, en páncreas y en tubérculos de la papa (Subbaiah y Ganguly, 1970; Galliard,1971; Van de Bosch *et al.*, 1974), en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, hongos como *Cryptococcus gatti* y *neoformans*, *Candida albicans*, bacterias como *Moraxella bovis* y líneas celulares epiteliales del pulmón humano, generando preguntas sobre la ubicuidad que presenta la enzima en diferentes organismos (Witt *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 2000; Farn *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2004; Ganendren *et al.*, 2006; Köhler *et al.*, 2006).

2.5.4 Fosfolipasa C (EC. 3.1.4.3)

Estas enzimas pueden escindir fosfolípidos en el enlace fosfodiéster entre el glicerol y el grupo fosfato. Se dividen en dos tipos: fosfatidilinositol específicas (PI-PLC) y Fosfatidilcolina específicas (PC-PLC). En mamíferos se han encontrado trece isoenzimas PI-PLC y se han clasificado en seis clases: PI-PLC- β , PI-PLC- γ , PI-PLC- δ , PI-PLC- ξ , PI-PLC- η , y PI-PLC-like (Borrelli, 2015) (Figura 2.4).

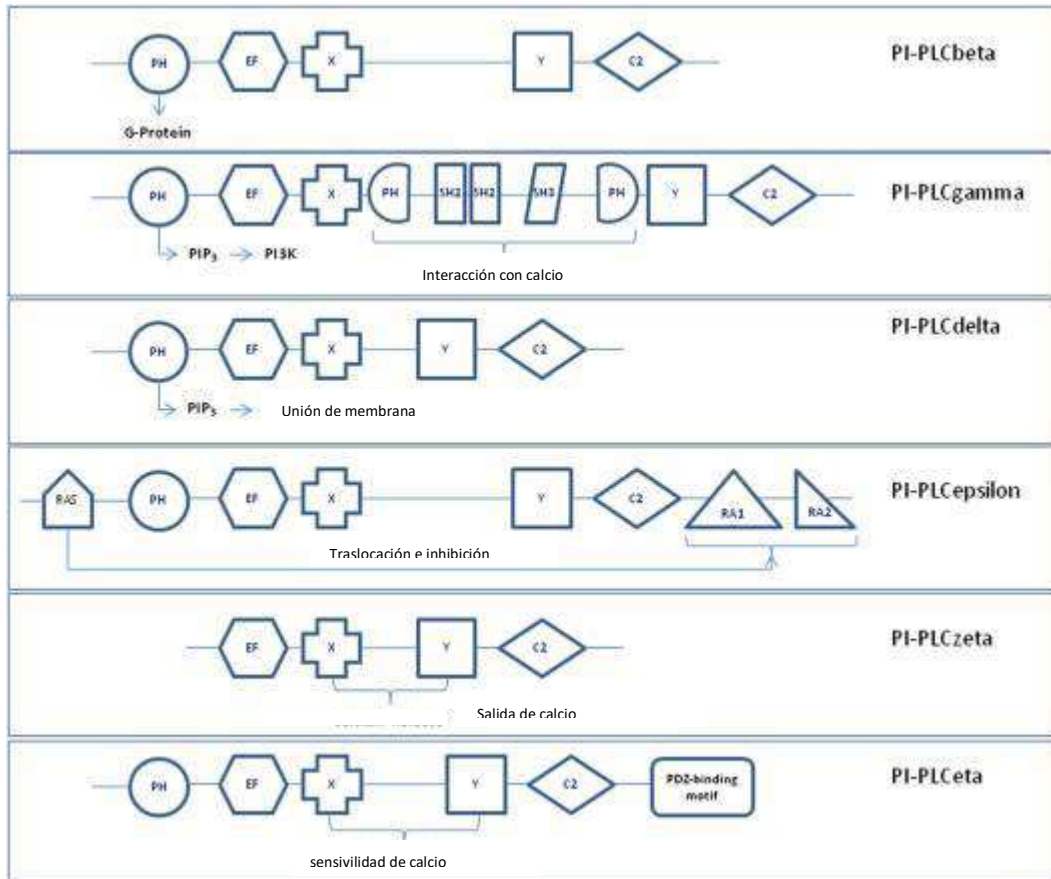


FIGURA 4 Estructura de las isoenzimas de PI-PLC, caracterizadas por un patrón y función en sus diferentes dominios.

Gresset (2013) describió que las trece isoenzimas de PI-PLC tienen un grupo catalítico tipificado en PLC- δ , que las PLC-beta se activan por $G_{\alpha q}$ - y $G_{\beta\gamma}$, que la activación de las PLC- γ depende de receptores asociados con tirosina cinasas, que algunas subclases de las PLC-beta y PLC-gamma se activan mediante la unión directa de las proteínas G pequeñas de las subfamilias Ras, Rho, Rac y de GTPasas, y que la región enlazadora X/Y puede mediar la auto inhibición de la mayoría de las PLC (Gresset et al., 2013).

Cabe señalar que este grupo de fosfolipasas tienen la capacidad de hidrolizar el ácido fosfatídico (PA), ácido lisofosfatídico (LPA), esfingosina-1-fosfato (S1P), ceramida-1-fosfato (C1P) y pirofosfato de diacilglicerol (DGPP), todos los cuales son importantes en la señalización de lípidos, además de que su frecuencia es muy alta en organismos como bacterias, levaduras, plantas, animales y virus (Dennis *et al.*, 2011; Cocco *et al.*, 2015).

2.5.5 Fosfolipasa D (EC.3.1.1.4)

Estas fosfolipasas catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de los glicerofosfolípidos, fosfatidilcolina y otros fosfolípidos generando ácido fosfatídico y un grupo fosfato libre. También se ha descrito que estas fosfolipasas realizan una reacción de transfosfatidilación en presencia de alcohol, produciendo fosfatidiletanol (PEt) (Figura 2.5). Como en otras fosfolipasas, la histidina del sitio activo es la responsable del ataque nucleofílico sobre su sustrato (Liscovitch *et al.*, 2004; Selvy, 2011).

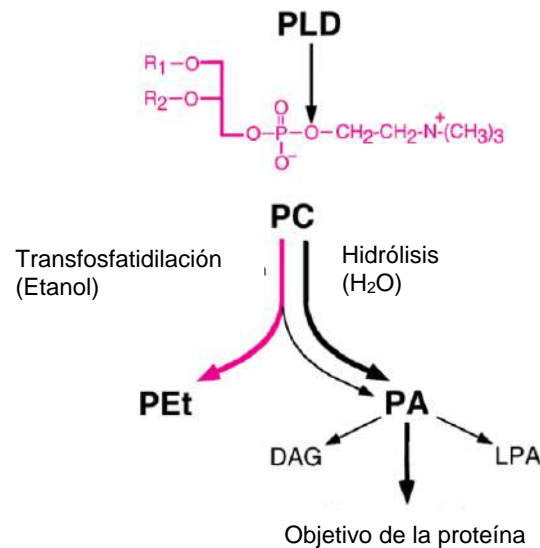


FIGURA 5. Reacciones catalizadas por la fosfolipasa D.

Su actividad fue descubierta en extractos de zanahoria, y se han encontrado dos tipos de Fosfolipasas D (PLD1 y PLD2), presentes en virus, bacterias, hongos, levaduras, plantas y mamíferos. Las dos isoformas PLD1 y PLD2 están reguladas por proteínas

quinasas y proteínas de unión a GTP. La actividad de estas enzimas es variada, que va desde el metabolismo de fosfolípidos, nucleasas, toxinas y proteínas víricas de función desconocida (MacDermott *et al.*, 2004; Selvy., 2011; Kolesnikov *et al.*, 2012).

Los estudios revelan que la fosfolipasa D funciona en una amplia gama de procesos celulares que incluyen la transducción de señales, el control del transporte intracelular, y la reorganización de la actina del citoesqueleto. Se han podido aislar y caracterizar diversas fosfolipasas de diferentes fuentes y se han descrito sus genes (Tabla 2.7) (Liscovitch *et al.*, 2004; Selvy, 2011).

TABLA 8. Genes de la familia de las fosfolipasas D en eucariotas y procariotas.

Nombre	Descripción	Organismo
PLD1	ARF/Rho/PKC-dependiente PC-PLD	<i>H. sapiens</i>
PLD2	PIP ₂ /ARF-dependiente PC-PLD	<i>M. musculus</i>
CePLD (ORF)	Putativa PLD	<i>C. elegans</i>
SPO14/PLD1	Ca ²⁺ -independiente, PIP ₂ -dependiente PLD	<i>S. cerevisiae</i>
CaPLD	Ca ²⁺ -independiente PLD	<i>C. albicans</i>
YA2G (ORF)	Putativa PLD	<i>S. pombe</i>
PLDα	Ca ²⁺ -dependiente PC-PLD	<i>R. communis</i> <i>A. thaliana</i>
PLDβ	Fosfoinositidina - dependiente PLD	<i>A. thaliana</i>
PLDγ	Fosfoinositidina – dependiente PLD	<i>A. thaliana</i>
SaPLD	Bacterial PLDs	<i>S. antibioticus</i>
SciPLD		<i>S. cinnamomeum</i>
Ymt		<i>Y. pestis</i>

2.6 Aplicaciones de las fosfolipasas

Las fosfolipasas han sido aplicadas en la biocatálisis, como un método alternativo de los procesos químicos. Actualmente se utilizan para producir emulsificantes, en industrias como la panificadora, producción de mayonesa, desengrasado de aceites, entre otros, y sus aplicaciones se van ampliando conforme se descubren y estudian nuevas

fosfolipasas (De María *et al.*, 2007). Ejemplos de fosfolipasas comerciales se muestran en la Tabla 2.8.

TABLA 9. Aplicaciones industriales de diferentes fosfolipasas comerciales.

Aplicación	Ejemplos
Panificación	Lipopan 50 BG (Novo Nordisk/Danisco). Lipopan F™; Lipopan Xtra™ (Novozymes). Lisomax™ (Genencor)
Lácteos	Queso: YieldMAX™ (Novozymes/Christian Hansen)
Soya	Productos de PS por transesterificación con PLD (Cargill)
Aceites	Lecitase ultra™ (Novozymes)
Tratamientos médicos	SM; antitumorales

La industria panificadora se ha beneficiado de las fosfolipasas y lipasas desde 1990, utilizando diversos emulsificadores y productos obtenidos a partir de ellas (lecitina, lisolecitina, ésteres de ácido diactiltartárico de mono y diacilglicéridos, entre otros), así como la hidrólisis de almidón de trigo en glucosa (Nebesky *et al.*, 1998). Se han comercializado preparaciones con fosfolipasas y lipasas, por empresas como Novo Nordisk A/S y Danisco, con el nombre de Lipopan 50BG y Grindamyl™ Exel 16, respectivamente. Posteriormente, Novozymes A/S introdujo una fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* con actividad lipasa y fosfolipasa con el nombre comercial de Lipopan F™ (De María *et al.*, 2007). Otras actividades importantes de estas enzimas son en el procesamiento de leches para la producción de quesos, yogures y helados, debido a que los fosfolípidos tales como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomiolina pueden emulsificarse (Nielsen, 2004; Karahan y Akin, 2017). En la producción de mayonesa se conoce que las fosfolipasas A₂ mejoran las emulsiones, ya que pueden hacer cambios funcionales y estructurales de las lipoproteínas presentes. Otro proceso de importancia para la industria alimenticia es la *transesterificación* de fosfolípidos para mejorar los valores nutricionales de alimentos (Mine, 1997; De María *et al.*, 2007).

Se han utilizado diversas fosfolipasas para el desgomado de aceites, entre las cuales se encuentran comercialmente Enzy-Max[®], una fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum* con el nombre comercial de Lecitase[®]Novo, y la Lecitase pancreática[®] 10L. También se han comercializado fosfolipasas activas a pH 4-5 y temperaturas entre 30 y 70 °C (Clausen,

2001), entre las cuales está Lipozyme TL IM (lipasa de *Thermomyces lanuginosa*) que mostró mejor actividad que Lipozyme RM (lipasa de *Rhizomucor miehei*) y Novozym 435 (lipasa de *Candida antártica*) durante la acidólisis entre lecitina de soya y ácido caprílico en un sistema libre de solventes (Vikbjerg, 2006).

Las fosfolipasas D se han utilizado para la modificación de las cabezas polares en las moléculas de fosfolípidos a fin de incrementar el contenido de especies como fosfatidilcolina y fosfatidilserina para generar productos que proporcionen beneficios a la salud; cabe mencionar que se ha reportado que la fosfatidilserina tiene efectos positivos en la capacidad cognitiva (De Maria *et al.*, 2007). Estas enzimas, además de la actividad hidrolítica, catalizan reacciones de transesterificación (Guo *et al.*, 2005) en presencia de un alcohol que funcione como donador nucleofílico. A partir de esta transesterificación es posible sintetizar fosfolípidos de menor abundancia a partir de aquéllos más abundantes, tales como la fosfatidilserina, fosfatidiletalona y fosfatidilglicerol, a partir de fosfatidilcolina (Guo *et al.*, 2005; De Maria *et al.*, 2007).

2.7 Fosfolipasas de microorganismos extremófilos

El estudio de los extremófilos y sus extremoenzimas ha generado conocimiento básico acerca de sus proteínas, la estabilidad, estructura y funciones. Así mismo, estas extremoenzimas tienen potencial económico en muchos procesos industriales (Gomes y Steiner, 2004). Debido a que pocos extremófilos han podido utilizarse a gran escala por la complejidad de sus condiciones de crecimiento, se ha optado por expresar sus proteínas en hospederos mesófilos (Leis *et al.*, 2015; Coker, 2016).

Una de las primeras fosfolipasas aisladas de una bacteria termotolerante es la fosfolipasa C, caracterizada mediante el análisis de productos de degradación de lecitina por cromatografía en capa fina, en *Bacillus cereus* (Johnson y Bonventre, 1967).

2.8 Fosfolipasas en Arqueas

Del dominio de las arqueas, se han reportado fosfolipasas A₂ con actividad a 90 °C de *Pyrococcus horikoshii* y *Aeropyrum pernix* aislados de fuentes hidrotermales de Japón (Kawarabayasi *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2000). La primera fosfolipasa termofílica

recombinante fue una PLA₂ de *A. pernix*, que fue clonada y expresada en *E. coli* (Wang *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). El marco abierto de lectura compuesto por 474 pares de bases fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos iniciadores 5'-TTTAGAATTCGCGCATATGGGTGTTAACGAGG-3' y 5'-TTTTGGTACCTTAGGATCC AATTAGTGTTTAGCCTCCG-3', el vector de clonación fue pET15b y se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus-RIL (Stratagene, USA).

Tirawongsaroj (2008) reportó el aislamiento de una nueva fosfolipasa similar a patatinas (PLP) y una esterasa (Est1) aisladas en aguas termales de Jae Sawn, Tailandia. La PLP contenía cuatro dominios conservados similares a otras proteínas similares a patatinas con actividad de acil hidrolasa lipídica. Tanto la PLP como la Est1 se expresaron heterológicamente como proteínas solubles en *E. coli* y exhibieron más del 50% de sus actividades máximas a pH alcalino, de 7-9 y 8-10, respectivamente. Las enzimas tenían actividad hacia los ésteres de ácidos grasos de cadena corta (C4 y C5) y de cadena larga (C14 y C16) (Tirawongsaroj *et al.*, 2008).

Una fosfolipasa B (TL-PLB) de *Thermotoga lettingae* TMO fue clonada y funcionalmente sobreexpresada en *Escherichia coli* DH5 α , y purificada. El gen fue amplificado por PCR, el vector de clonación utilizado fue pET15b y se expresó en *E. coli* BL21 (DE3)-RIL Codon Plus-RIL (Stratagene, USA). La enzima hidroliza eficientemente los enlaces éster sn-1 y sn-2 de 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilcolina, con actividad a 70 °C y pH 5.5. Su termoestabilidad es relativamente alta con una vida media de 240 min a 90 °C, exhibiendo una alta actividad de desgomado de aceites de semillas de colza, soya, maní y girasol (Wei *et al.*, 2015).

2.9 Fosfolipasas en bacterias.

Aunque existen diversos artículos relacionados con la clonación y caracterización de fosfolipasas a partir de metagenomas (Rondon *et al.*, 2000, Schloss, 2003, Miller *et al.*, 1999, Henne *et al.*, 2000), una de las primeras fosfolipasas bacterianas caracterizadas fue una fosfolipasa C de la bacteria *Bacillus cereus*, en la cual, era óptimamente activa a 75 °C a un pH de 4-5 (Seo y Rhee, 2004).

El estudio de las fosfolipasas en bacterias termófilas inició con la descripción de una fosfolipasa producida por la bacteria psicotrófica *Serratia sp.* aislada de suelo glaciar en China. La fosfolipasa fue clonada en *E. coli* y sobre expresada en *P. pastoris*, y posee actividad en la posición *sn-1*, es óptimamente activa a 10 °C a un pH de 5.5, se actividad es dependiente de Ca^{2+} , y es inhibida por Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} (Fu *et al.*, 2008).

Navas y cols. (2018) caracterizaron una nueva fosfolipasa termoestable de la bacteria termófila *Thermus sp.* El gen fue clonado en un vector *pJexpress 404* en *E. coli* XL-1 Blue MRF'. La temperatura óptima de la enzima fue de 65 °C a pH 9; es dependiente de Ca^{2+} , tiene la capacidad de hidrolizar ácidos grasos en la posición *sn-1* y *sn-2*, y posee también actividad aciltransferasa.

2.10 *Brevibacillus thermoruber*

Brevibacillus thermoruber es una bacteria Gram-positiva, móvil, formadora de esporas, aeróbica y termófila, productora de exopolisacáridos, con variedad de aplicaciones en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y químicos (Yildiz *et al.*, 2013, 2015). Se ha encontrado que esta especie produce grandes cantidades de β -D-glucosidasa y celobiohidrolasa cuando se cultiva en celobiosa y avicel (Tellez *et al.*, 2017).

Actualmente solo dos genomas de *Brevibacillus thermoruber* han sido secuenciados en el mundo de acuerdo a la base de datos PATRIC, uno de una cepa de *Brevibacillus thermurober* PM1 aislada en Estados Unidos a partir de cenizas del volcán Kilauea en 2014 (PATRIC, 2020), y el otro de una cepa de *Brevibacillus thermoruber* 423 aislada en Bulgaria a partir de una fuente termal en 2010 y secuenciado en 2013 (Yildiz *et al.*, 2013). La clasificación taxonómica de *Brevibacillus thermoruber* se muestra en la Tabla 2.10.

TABLA 10. Clasificación taxonómica de *Brevibacillus thermoruber*.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Dominio:	Bacteria
División:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Paenibacillaceae

Género:	<i>Brevibacillus</i>
Especie:	<i>thermoruber</i>

La cepa de estudio de este trabajo fue *Brevibacillus thermoruber* HT42, que fue aislada en la zona geotermal Los Humeros, Puebla, a partir de muestras de piedra tepezil a 42 °C. De acuerdo con la secuenciación del gen 16S rRNA, se encontró una homología de 98% con el género *Brevibacillus* y de especie *thermoruber* (Modad-Reyes, 2015). Se realizó la secuenciación completa del genoma y se demostró en el análisis *in silico* que tiene un genoma de 4,760,482 pares de bases, que codifican para 4,117 genes, en la cual 157 genes (2%) codifican para hidrolasas de las subclases de esterases, glicosidasas y peptidasas (Vázquez-Tinajero, 2017).

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se conoce poco de las fosfolipasas de microorganismos extremófilos, ya que la mayoría de los estudios están basados en bacterias mesófilas, que tienen ciertas consideraciones y limitaciones de sus aplicaciones, debido a la poca resistencia a condiciones extremas en la industria.

Los microorganismos extremófilos y sus enzimas generan un creciente interés, tanto científico como industrial, debido a sus aplicaciones en condiciones extremas; por ello, resulta de interés la obtención y estudio de fosfolipasas extremófilas que puedan tener más amplias o nuevas aplicaciones biotecnológicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

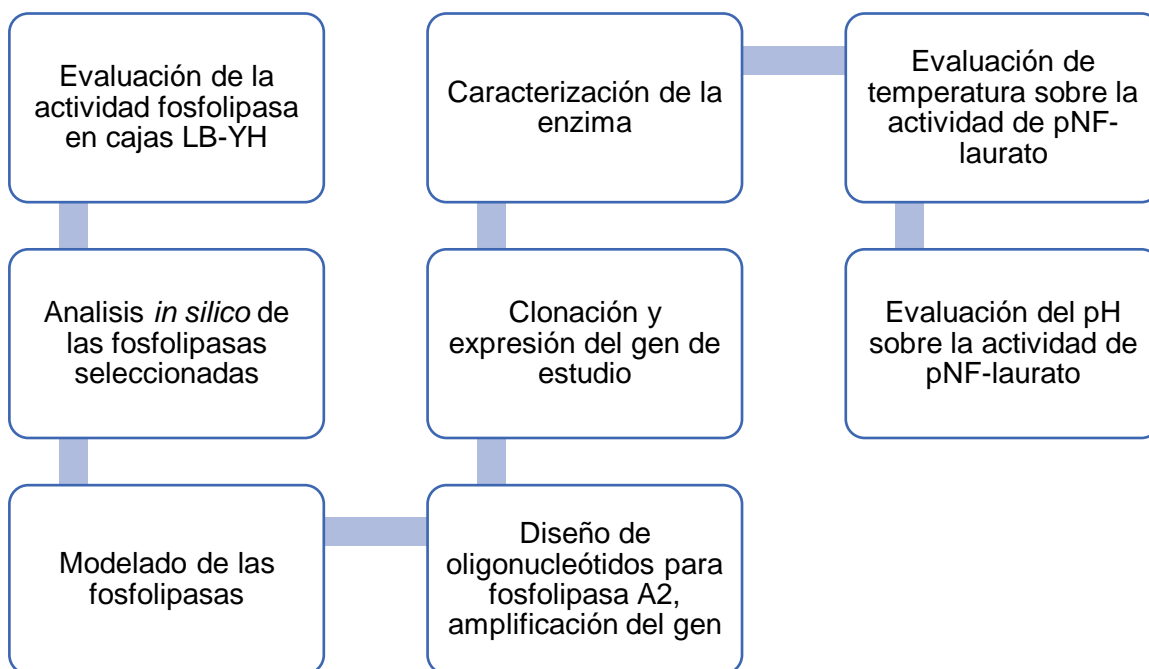
Clonar y caracterizar una fosfolipasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42 aislado de la zona geotérmica Los Humeros, Puebla.

4.2 Objetivos específicos

- Seleccionar de genes de fosfolipasas *in silico* a partir del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42.
- Obtener la enzima recombinante de *Brevibacillus thermoruber* HT42.
- Caracterizar la enzima recombinante de *Brevibacillus thermoruber* HT42.

5 METODOLOGÍA

DIAGRAMA GENERAL



5.1 Evaluación de la actividad de fosfolipasa de la cepa *Brevibacillus thermoruber* HT42.

La capacidad de producir fosfolipasas de *Brevibacillus thermoruber* HT42 se evaluó en medio LB (agar, 2%) enriquecido con yema de huevo estéril al 10 %. De un pre-inóculo de *Brevibacillus thermoruber* HT42 se obtuvo 1 mL y se centrifugó a 13,700 x g, se separó el medio libre de células y el paquete celular, y ambos se colocaron en una caja de Petri con medio LB-YH. La actividad fosfolipasa se consideró positiva al presentar halos de hidrólisis alrededor de la colonia en la caja Petri después de incubación a 55 °C durante 24 h (Sachin *et al.*, 2012).

5.2 Análisis de traducción *in silico* de los genes de fosfolipasa y selección del gen

A partir del análisis del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42, se seleccionaron dos genes para ser analizados por modelado *in silico*. Para ello, se utilizaron las siguientes herramientas informáticas, tanto en línea como en software:

- PFAM: Es una base de datos libre en línea del European Molecular Biology Laboratory perteneciente al European Bioinformatics Institute, este software funciona realizando un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína a analizar y comparándola con una base de datos de secuencias de los dominios funcionales reportados (Finn *et al.*, 2003). Este programa se utilizó para conocer las fosfolipasas y los dominios funcionales de éstas, disponible en: <https://pfam.xfam.org/> .
- Blastp: Es una herramienta bioinformática libre en línea del National Center of Biotechnology Information, este programa funciona realizando un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína a analizar comparándola con una base de datos de secuencias de proteínas reportadas, para identificar por homología entre las secuencias la función que tiene la proteína (Mount, 2007). Este programa se utilizó para establecer la función de las fosfolipasas y poder comparar los resultados de la secuenciación del gen elegido.
- Serial Cloner: Es un programa libre que permite realizar *in silico* reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), digestiones con enzimas de restricción y reacciones de ligación entre vector y gen (Basics, 2009). Este programa se utilizó para establecer resultados teóricos del proceso de clonación.
- SignalP 4.1: Este es un programa libre en línea de la página www.cbs.dtu.dk que permite encontrar la presencia y secuencia de péptido señal en proteínas, comparando la secuencia de la proteína con una base de datos de secuencias reportadas (Nielsen, 2017). Este programa se utilizó para analizar la presencia de péptido señal en las secuencias de *pla-ht* y *plc-ht*.
- NEBcutter: Página en línea de libre acceso de la empresa NEW ENGLAND BioLabs, Inc (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) fue utilizada para conocer las enzimas de restricción que tienen la capacidad de cortar el gen y poder ser descartados para la clonación y a su vez conocer aquellas enzimas que no cortan el gen y ser utilizados con el vector de clonación pET-28a (+).

5.3 Análisis bioinformático de las posibles fosfolipasas de acuerdo con la secuencia de aminoácidos.

A partir de las secuencias de los genes elegidos, se realizó la traducción *in silico* y el modelado de la estructura secundaria, terciaria, sitios catalíticos, y la función de acuerdo con la interacción con otras proteínas.

5.3.1 Modelado de las fosfolipasas.

Las secuencias de aminoácidos fueron analizadas con la ayuda de las siguientes herramientas bioinformáticas y softwares:

- Uniprot: Es una colección de secuencias de proteínas y sus anotaciones funcionales. Contiene varias secciones, entre ellas la UniProtKB/Swiss-Prot con secuencias revisadas y caracterizadas, la UniProtKB/TrEMBL con las secuencias que no están revisadas, y la sección Proteomas, con el conjunto de proteínas de genomas completamente secuenciados (UniProt Consortium, 2018).
- MultAlin: Algoritmo utilizado para la alineación múltiple de secuencias, ya sea ácidos nucleicos o aminoácidos, basado en el método de programación dinámica de alineación por pares (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).
- ProteinDataBank: Contiene datos estructurales de las moléculas biológicas grandes, obtenidos mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (<https://www.rcsb.org/>) (Parasuraman, 2012).
- Interpro: Base de datos que integra métodos predictivos para dominios de proteínas, familias y sitios funcionales. Engloba varias plataformas de bases de datos entre las que se encuentran Gene3D, PANTHER, Pfam, PIRSF, PRINTS, ProDom, PROSITE, SMART, SUPERFAMILY y TIGRFAM (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Hunter *et al.*, 2008).
- PSIPREED: Servidor utilizado para la predicción de estructuras de proteínas, utilizando métodos como PSIPREED para la predicción de estructura secundaria, MEMSAT2 para la predicción de la topología transmembranal, y GenTHREADER

para el reconocimiento del plegamiento (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/introduction/>) (McGuffin *et al.*, 2000).

- Raptorx: Servidor basado en un método estadístico para el modelado de proteínas por medio de plantillas, lo que mejora la precisión de la alineación. Utiliza bases de datos como PSI-BLAST y HHpred (<http://raptorx.uchicago.edu/>) (Peng y Xu, 2011; Källberg *et al.*, 2014).
- I-TASSER: Servidor para la identificación de la estructura de proteínas y la predicción de funciones (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang, 2009; Roy, 2010).
- Phyre2: Utilizado para predecir y analizar estructura y función de las proteínas, con la capacidad para predecir sitios de unión a ligandos y analizar posibles efectos de variaciones en la secuencia de aminoácidos (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015).
- Robetta: Servidor automatizado para la predicción y análisis de las estructuras de las proteínas por modelación comparativa o predicciones *de novo*, utilizando subsistemas de bases de datos como BLAST, PSI-BLAST, FFAS03 (<http://new.robetta.org/>) (Kim *et al.*, 2004).
- MPI Bioinformatics Toolkit: Servicio web utilizado para búsqueda de secuencias, predicción y clasificación de las estructuras secundarias y terciarias, así como de zonas de desorden y regiones transmembrana (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de>) (Biegert *et al.*, 2006).
- CASTp: Atlas Computado de Topografía de Superficie de Proteínas; es un recurso en línea que proporciona las propiedades geométricas y topologías de las estructuras proteicas, sean bolsas superficiales, cavidades interiores y canales cruzados, en relación con la función que desempeñan (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/>) (Tian *et al.*, 2018).

- PyMOL: Software para el manejo de gráficos moleculares escritos en C o Fortran de código abierto, generando la comprensión y optimización de las interacciones proteína-ligando (DeLano, 2002).
- UCSF Chimera: Software utilizado para la visualización interactiva y análisis de mapas de densidad, y para dilucidar estructuras (Goddard *et al.*, 2007).

5.3.2 Análisis de interacción proteína-proteína.

Se realizó el análisis de la interacción proteína-proteína para inferir la función que pudieran tener las proteínas codificadas por los genes seleccionados.

- STRING: Es una base de datos que integra las interacciones proteína-proteína, incluyendo asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales), lo que contribuye a inferir la función biológica utilizando algoritmos con información genómica o análisis de coexpresión (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) (Szkarczyk *et al.*, 2015).

5.4 Obtención del gen de interés.

A partir del análisis *in silico*, se seleccionó un gen para ser clonado, expresado y llevar a cabo la caracterización de la fosfolipasa.

5.4.1 Extracción de DNA genómico.

La cepa de la colección del Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) *Brevibacillus thermoruber* HT42 aislada de los Humeros, Puebla, se hizo crecer en 2 mL de medio LB (10 gr triptona, 5 gr extracto de levadura, 10 gr NaCl en 1L), 12 h a 1.2 x g, y cuando alcanzó una densidad óptica de 0.8 a 600 nm, se transfirió 1 mL a un matraz Erlenmeyer con 25 mL de medio LB y se cultivó a 55 °C, 1.2 x g por 24 h. Al término de la incubación se obtuvo 2 mL y se centrifugó, el sobrenadante se decantó y la biomasa resultante se procesó de acuerdo con la metodología del kit comercial Wizard® Genomic DNA purification de la marca Promega.

El DNA genómico obtenido se verificó por medio de geles de agarosa (1 %) y se cuantificó por espectrofotometría con el equipo NanoDrop™ 2000c de la marca Thermo Scientific®.

5.4.2 Diseño de oligonucleótidos para el gen de interés

Una vez elegido el gen de interés, la secuencia de nucleótidos se analizó mediante la herramienta informática en línea NEBcutter de la empresa NEW ENGLAND BioLabs, Inc (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para elegir las enzimas de restricción que no cortaran el gen y también estuvieran presentes en el vector pET-28a (+): *NdeI* y *HindIII*.

Los oligonucleótidos se diseñaron con la ayuda del programa Serial Cloner v2.6.1 y FastPCR v6.6 y se realizó la comprobación *in silico* por medio del programa Serial Cloner (versión 2.6.1).

Para la determinación de la T_m (temperatura de fusión) se utilizó la regla de Wallace (Wallace *et al.*, 1979) cuya fórmula es la siguiente:

$$T_m = 2^{\circ}C(A + T) + 4^{\circ}C(G + C)$$

5.4.3 Amplificación por PCR del gen de fosfolipasa

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). La amplificación del gen se realizó por la técnica de PCR utilizando el DNA genómico de *Brevibacillus thermoruber* HT42.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L (Tabla 5.1) de acuerdo a las indicaciones de *Taq* DNA Polymerase (recombinant) de Thermo Scientific® y procedió a realizar la amplificación en el termociclador T100™ thermal Cycler de la Marca BioRad®

TABLA 11. Composición de la mezcla de reacción para la PCR.

Muestra	Volumen
Buffer de reacción 10x	5 µL
MgCl ₂	6 µL
dNTP's	1 µL
Oligonucleótidos	1.5µL
DNA	0.5 µL
Taq polimerasa	0.2 µL
Agua	34.3 µL

Las reacciones de amplificación se realizaron usando 94°C como la temperatura de desnaturalización del DNA, 56°C como temperatura de alineación y 72°C como la temperatura de elongación, en 30 ciclos.

TABLA 12. Condiciones de reacción para PCR del gen *pla-bt*

Pasos	Repeticiones	Tiempo min:seg	Temperatura °C
Desnaturalizació inicial	1	4:00	95
Desnaturalizació		1:00	95
Alineamiento	30	1:00	56
Extensión		1:00	72
Extensión final	1	7:00	72

El producto de la PCR fue purificado con el kit FavorPrep® GEL/PCR purification MiniKit al término de la reacción, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La secuenciación del amplificado fue realizada en la Unidad de Secuenciación del IBT.

5.4.4 Determinación del tamaño del fragmento de PCR por electroforesis en geles de agarosa.

Para la determinación del tamaño de los amplicones, el producto de PCR fue separado por electroforesis horizontal en geles de agarosa (1 %), con bromuro de etidio para la visualización de las bandas. Se utilizaron 5 µL de la mezcla de PCR, TAE 50X (Tris base

2M, acetato de sodio 50mM, EDTA 1M y ácido acético 1M) (Sambrook y Russel, 2001) como solución amortiguadora de corrimiento, y una solución de azul de bromofenol y xilencianol, ambos al 0.4% (Sambrook y Russel, 2001) como solución amortiguadora de carga. Las condiciones de electroforesis fueron de 90V durante 35 min. El gel de agarosa resultante fue observado en un transiluminador de luz UV usando el fotodocumentador (Gel Doc™ XR+, BioRad). La concentración de DNA amplificado se determinó por medio del equipo Nanodrop 2000c de la marca Thermo Scientific®.

5.4.5 Purificación del gen amplificado.

La purificación del gen amplificado por PCR se realizó a partir de las bandas separadas en la electroforesis en gel de agarosa. La banda con el número de pares de bases esperado fue cortada con bisturí, se colocó en un microtubo Eppendorf de 1.5 mL, y se realizó el protocolo de purificación del Kit GEL/PCR purification mini kit de la marca FavorPrep™. Se determinó la concentración de DNA obtenido después de la purificación y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del DNA obtenido.

5.5 Clonación y expresión del gen de estudio.

Se realizó el procedimiento para clonar el gen amplificado por PCR en el vector de clonación *pET-28a (+)* para ser expresado en *E.coli BL21 DE3 pLysS*.

5.5.1 Vector de clonación

Se utilizó el vector de clonación *pET-28a (+)*, que tiene un tamaño de 5,369 pb, cuenta con un sitio múltiple de clonación que incluye un doble sitio de etiqueta de histidinas, y una de trombina que facilita la purificación de proteínas recombinantes usando una columna de cromatografía por afinidad, presenta un gen de resistencia a kanamicina y que sirve como marcador de la inserción del vector (Figura 5.1).

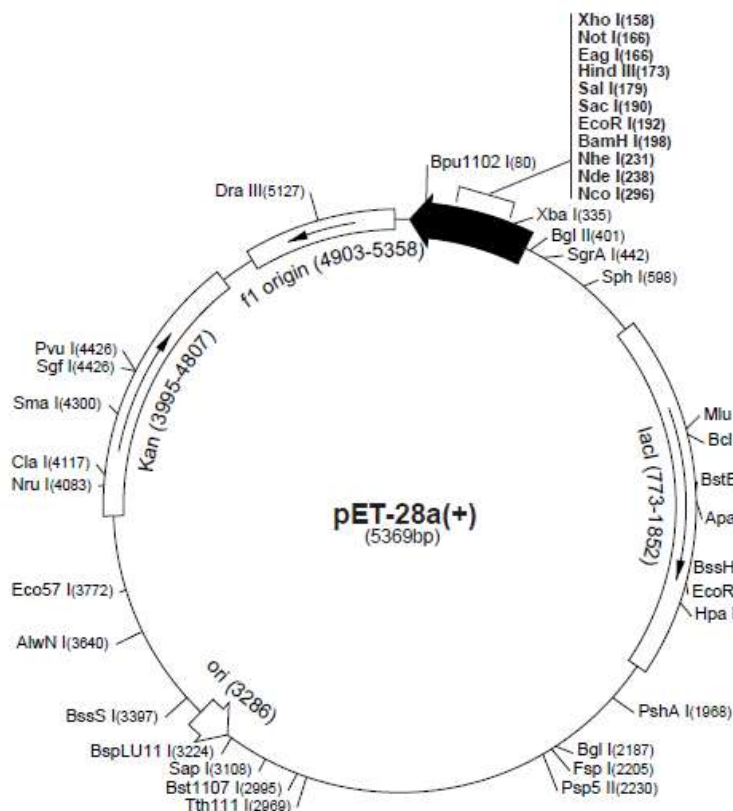


FIGURA 6. Mapa del vector pET-28a (+)

5.5.2 Digestión de los productos de PCR y vector de expresión pET28a (+)

Los productos de PCR y el vector de expresión pET-28a (+) fueron digeridos de forma individual con las enzimas de restricción HindIII de Nzytech genes enzymes® y NdeI de la marca New England Biolabs® Inc. Las muestras digeridas fueron purificadas de acuerdo al punto 5.4.5, a partir de un gel de agarosa al 1%. El tamaño aproximado total después de la digestión del vector pET28a (+) fue 5305 pb.

5.5.3 Ligación del producto de PCR y el vector

La concentración final y la pureza de los productos de PCR y el vector pET28a (+) digeridos y purificados se analizaron por medio de espectrofotometría en el equipo Nanodrop 2000c de la marca Thermo Scientific®. La cantidad de inserto y de vector para realizar la reacción de ligación se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ng \text{ de vector} = \frac{kb \text{ inserto}}{kb \text{ vector}} \times \left(\text{relacion molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right) = ng \text{ inserto}$$

Ésta fue comprobada por medio de la App Biomath versión 1.1.1 de Promega Corporation®. Para la ligación se utilizó el kit Speedy Ligase de Nzytech genes enzymes®, se realizaron las mezclas de vector e inserto en una relación molar de 1:3, se añadió 1 µL de la ligasa, 1 µL de solución amortiguadora de ligación, ajustando a 20 µL, y se utilizó inmediatamente para transformación y/o conservando a -80°C hasta su utilización.

5.5.4 Síntesis del vector recombinante

Se realizó la síntesis del vector recombinante por la casa comercial GenScript, utilizando el vector *pET-28a (+)* y el gen *pla-ht*, conteniendo los sitios de clonación: NdeI y HindIII.

5.5.5 Preparación de células electrocompetentes de *E.coli* BL21 DE3 *pLysS*

La preparación de células electrocompetentes se realizó de acuerdo al método descrito por Miller y Nickoloff (1995) con modificaciones: se reactivó la cepa *E.coli* BL21 DE3 *pLysS* en 2 mL de caldo LB estéril con cloranfenicol 34 µg/mL, se cultivó a 37°C de 8-10 h a 0.8 x g. Posteriormente, se transfirieron 100 µL en un tubo con caldo LB de 2 mL con cloranfenicol 34 µg/mL, se cultivó a 37°C y 0.8 x g, durante 2 h aprox., hasta observar una densidad óptica de 0.4 A₆₀₀. El cultivo se decantó en 2 microtubos estériles y conservó en frío a 4°C durante 20 min, los tubos fueron centrifugados a 4,000 xg durante 15 min a 4°C, se decantó el medio y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de agua estéril fría. A continuación fue centrifugado a 3,000 xg durante 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se volvió a resuspender en 400 µL de agua estéril fría, se centrifugó a 3,000 xg durante 7 min a 4°C, se volvió a decantar el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 100 µL de glicerol al 10% frío, se realizó el último lavado y se centrifugó a 3,000 xg durante 5 min a 4°C, se aspiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 40 µL de glicerol 10% frío, para ser utilizado inmediatamente o guardado a -80°C.

5.6. Transformación.

5.6.1 Transformación de las células competentes.

Para la transformación de las células electrocompetentes, primero se enfrió la muestra de DNA y la cubeta de electroporación en hielo, y a continuación se transfirió de 1 a 2 μL de DNA a un tubo de 1.5 mL estéril y se conservó en hielo, se agregó 40 μL de células electrocompetentes, se realizó el mezclado de las células por pipeteo y se transfirió la mezcla a la cubeta de electroporación, se agitó suavemente para eliminar las burbujas y que el volumen se distribuyera entre los dos electrodos, se eliminó la humedad del exterior de la cubeta y se colocó en el sistema de electroporación 2510 Eppendorf®. Se dieron dos pulsos de decaimiento exponencial de 2.3 KV o 23 μF capacitancia y resistencia de 200 Ohms durante un tiempo constante de 4.8 ms, inmediatamente la mezcla fue transferida a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de caldo LB a temperatura ambiente, se incubó durante 1 h a 37 °C con movimiento suave, y se centrifugó a 700 x g durante 45 s, se decantó el sobrenadante dejando cerca de 100-200 μL con el paquete celular, se resuspendió y con ese volumen final, se inoculó por técnica de vertido en placa con medio LB con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37°C durante 12 h.

5.6.2 Confirmación de inserción del gen por PCR de colonia.

Se tomaron células de las colonias con un palillo de madera estéril y se sembraron por estriado en una caja Petri con medio LB con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se cultivaron a 37 °C por 12 h. El palillo con el que se picó la colonia se depositó en un tubo de ensaye con 1 mL de medio LB con kanamicina y se cultivó a 37 °C a 1.8 x g durante 12 h. Se obtuvo una asada con asa bacteriológica y se colocó en 50 μL de agua miliQ, se calentó a 95 °C durante 5 min, se centrifugó a 15,000 x g durante 5 min a 4 °C, y se tomó 1 μL de sobrenadante para realizar la PCR con las mismas condiciones de reacción, volúmenes de reactivos y oligonucleótidos específicos para la fosfolipasa de interés descritos en la sección 5.4.3.

En la caja Petri con Kanamicina se observó presencia de colonias confirmando la inserción del vector recombinante *pET28a (+)-pla-bt* en la célula hospedera BL21 DE3 pLysS, además de la presencia de Cloranfenicol como marcador para el Vector pLysS que lleva el gen que produce una lisozima T7 que inhibe o reduce el nivel de expresión de fondo del transcrito del gen en el vector recombinante que están bajo el control del promotor T7, esto debido a la sospecha de que el gen a expresar sea potencialmente toxico para la célula hospedera, produciendo una lisis antes de la expresión de la proteína, aunque los niveles de lisozima T7 son bajos no afectan para la expresión de la proteína recombinante con IPTG.

5.6.3 Inducción para la producción de la fosfolipasa recombinante.

Las células de *Escherichia coli* BL21 DE3 pLysS transformada con el vector pET28a (+) se cultivaron en medio LB con kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL a 37 °C hasta que la D.O alcanzó 0.6-0.8 en una Abs₆₀₀. La expresión de la proteína fue inducida añadiendo IPTG (0.4 mM y 1 mM) al cultivo e incubando por 16 h a 25 °C a 1.2 x g.

5.6.4 Lisis celular para la recuperación de la fosfolipasa recombinante.

Para la lisis celular, se recuperó el paquete celular por centrifugación a 10,000 xg durante 7 min a 4 °C y se resuspendió en dos volúmenes de amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.0 (Apéndice B); las células fueron mantenidas en hielo y lisadas en un equipo de sonicación mediante 20 pulsos de 20 s con pausas de 30 s entre cada pulso. Posterior a la ruptura celular, se recuperó el extracto celular (EC) por centrifugación a 16,000 xg por 15 min a 4°C.

5.6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para el análisis del patrón de proteínas producidas por *Escherichia coli* BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+), se centrifugaron 100 µL del cultivo a 16,000 xg por 5 min. Al paquete celular se le adicionó 20 µL de solución de carga para electroforesis, y se calentó a 95°C por 5 min. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones disociantes (SDS-PAGE)

(Laemmli,1970) con una corriente de 17 mA por 60 min. Los geles fueron teñidos con solución de Azul brillante de Comassie R-250 (Apéndice B) (Syrový y Hodný, 1991).

El peso molecular de la enzima fue estimado por comparación con los estándares de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de BioRad®, y utilizando el servidor Expasy©.

5.6.6 Análisis de la actividad fosfolipasa *In situ*

La actividad fosfolipasa *In situ* se observó en una placa de agarosa al 1% preparada con una solución 4 mM de NaTDC, 0.3 mM de rojo fenol como indicador de pH, 100 mM de NaCl, 10 mM CaCl₂, a pH de 8.5, 0.8 % p/v de lecitina de soya, 50 mM Tris_HCl (pH 8.0), 1% de NaCl, 0.25 % de ácido taurocólico (Song *et al.*,1999), a lo cual se colocaron círculos de papel filtro Whatman con 20 µL del extracto celular.

5.6.7 Western Blot de la fosfolipasa recombinante.

La producción de la fosfolipasa recombinante por la cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+) se verificó por Western Blot (WB) utilizando anticuerpos contra la secuencia de histidinas añadida por el vector a la fosfolipasa recombinante. La transferencia se realizó utilizando membranas de PVDF y el gel de SDS-PAGE con las proteínas del EC en el equipo transblot BioRad® durante 1 h a 20 V. La preparación de la membrana, el gel y el WB se presentan en el anexo C.

Al término de la transferencia, la membrana fue retirada e incubada en 10 mL de solución bloqueadora (PBS al 1% + 5% de leche sin grasa w/v) por 1 h a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se lavó la membrana con 10 mL de solución amortiguadora de dilución (TBST + 1% de leche sin grasa) y se incubó con 2 µL de anticuerpo Anti-His (C-term)/AP Ab de la marca Novex® by Life Technologies© toda la noche a 4°C en agitación. A continuación, la membrana se lavó con 20 mL de TBST 1X (899 mL de agua destilada + 1 mL Tween 20) por 5 min con agitación suave (este proceso se repitió tres veces), y se transfirió a una solución de TBS 1X (0.01 M Tris, 80 g NaCl) para remover el detergente. A continuación, se le adicionó la solución NBT/BCIP de la marca comercial ThermoScientific, y se incubó hasta el desarrollo de color en las bandas que contienen la

etiqueta de Histidina. Finalmente, se lavó la membrana en agua destilada durante 10 min y se dejó secar al aire. La membrana fue fotografiada y analizada en el fotodocumentador Gel Doc™ XR+, BioRad. Las soluciones utilizadas se encuentran enlistadas en el Apéndice C.

5.7 Caracterización de la enzima recombinante.

5.7.1 Ensayo de actividad enzimática en *p*-NP-ésteres.

Se evaluó la actividad enzimática (esterasa y lipasa) de la fosfolipasa recombinante en el extracto crudo (EC) utilizando como sustrato 0.1 mM decanoato *p*-nitrofenilo (*p*-NPD), 0.1 mM laurato *p*-nitrofenilo (*p*NPL), 0.1 mM miristrato *p*-nitrofenilo (*p*-NPM), 0.1 mM palmitato *p*-nitrofenilo (*p*-NPP), 0.1 mM estereato *p*-nitrofenilo (*p*-NPE) disueltos en etanol absoluto. El EC fue diluido 1:400 en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.5. En el ensayo de actividad se utilizaron 50µL del EC diluido, 400 µL de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M, pH 6.5, y 50 µL de sustrato. La mezcla de reacción se agitó en vórtex durante 5 s e inmediatamente se incubó a 65°C durante 25 min en el Thermo Mixer F0.5 Eppendorf®. Posteriormente, se adicionó 125 µL de carbonato de calcio 0.1 M, se agitó en vórtex 5 s y se centrifugó a 16,000 xg durante 15 min (Nawani *et al.*, 1996). El desarrollo de color fue verificado en muestras por triplicado en una microplaca de 96 pozos con un volumen final de 250 µL por cada pozo, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. La cuantificación de la actividad enzimática está basada en el cambio de densidad óptica (D.O) producido por la liberación del ión *p*-nitrofenolato por la hidrólisis del enlace éster, caracterizado por la aparición de un color amarillo en la mezcla de reacción.

Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para catalizar la formación de 1µmol paranitrofenol/min bajo condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresó en katal, utilizando la siguiente fórmula:

$$1U = 1 \mu \frac{\text{Mol}}{\text{min}} = \frac{1}{60} \frac{\text{pMol}}{\text{s}} \text{ es decir } \frac{16.67 \text{nmol}}{\text{s}},$$

$$16.67 \text{ nKat cataliza a velocidad de } \frac{16.67 \text{nMol}}{\text{s}}$$

1 unidad enzimática corresponde a 16.67 nKat

5.7.2 Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima recombinante fue evaluado con el método descrito en el apartado 5.7.1 a pH 6.5, a las siguientes temperaturas: 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 90°C.

5.7.3 Evaluación del efecto del pH sobre la actividad enzimática

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima recombinante fue evaluado con el método descrito en el apartado 5.7.1 a 60 °C, a los siguientes pHs: 3, 4, 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la actividad fosfolipasa de *Brevibacillus thermoruber* HT42

La capacidad de *Brevibacillus thermoruber* HT42 de producir fosfolipasas fue evaluada al cultivarse en cajas de Petri con medio LB enriquecido con 10% de yema de huevo estéril. Se utilizó también el sobrenadante libre de células de un cultivo previo, para verificar la posible secreción de las enzimas. Los resultados se muestran en la Figura 6.1, en donde se observa, del lado derecho, el crecimiento de la colonia con un halo de hidrólisis de la yema de huevo. El diámetro del halo más pequeño fue de 15 mm, por lo que el resultado fue considerado como positivo e indicativo de la producción de fosfolipasas por las colonias. Del lado izquierdo no se observa hidrólisis del sustrato, lo que sugiere la ausencia de fosfolipasas en el medio de cultivo libre de células, es decir, que la fosfolipasa no es excretada al medio de cultivo durante el crecimiento.

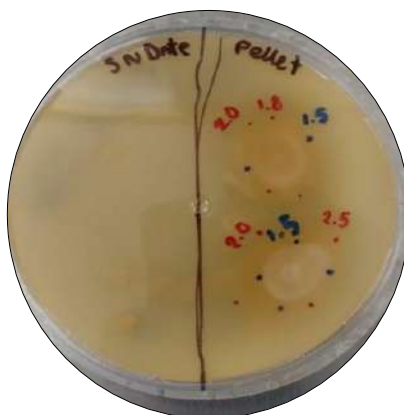


FIGURA 7. Caja de Petri con medio LB+yema de huevo al 10%.

Del lado izquierdo se muestra el medio libre de células, y del lado derecho se observan colonias de *Brevibacillus thermoruber* HT42 rodeadas de halo de hidrólisis, después de 24 h de incubación a 55°C.

6.2 Análisis *in silico* de los genes de fosfolipasa y selección de dos genes de estudio.

De acuerdo con el análisis de la secuencia del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 (Vazquez-Tinajero, 2017), existen cinco genes que codifican para fosfolipasas. En la Tabla 6.1 se muestran las características de cada uno de acuerdo con los servidores

de análisis de proteínas Pfam y BLASTp: tipo de enzima, función, código Pfam, tamaño del gen y tamaño de la proteína. Como puede observarse, de los cinco genes, tres codifican para posibles fosfolipasas A₂, dos de ellas del tipo patatina, un gen codifica para una posible fosfolipasa C dependiente de zinc de función desconocida, uno codifica para una lisofosfolipasa con función de lipasa/acilhidrolasa, y uno codifica para una lipasa.

TABLA 13. Fosfolipasas en el genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42.

ENZIMA	TIPO	FUNCIÓN	PFAM	TAMAÑO DEL GEN Y PROTEÍNA
Fosfolipasa	PLA2	Fosfolipasa tipo patatina	PF01734	Gen: 948 pb
				Proteína: 315 a.a
	PLPC dep Zn	Proteína DUF4184	PF13803	Gen: 792 pb
				Proteína: 263 a.a
	Lisofosfolipasa	Lipasa / acilhidrolasa tipo GDSL	PF13472	Gen: 768 pb
				Proteína: 255 a.a
	PLA2	Fosfolipasa tipo patatina	PF01734	Gen: 849 pb
				Proteína: 282 a.a
Lipasa	Lipasa GDSL 2	PF13472	Gen: 711 pb	
			Proteína: 236 a.a	
PLA2	Fosfolipasa A2	PF00068	Gen: 279 pb	
			Proteína: 92 a.a	

De acuerdo con la búsqueda en Pfam, Blastp, y SignalP 4.1, se encontró similitud en las secuencias de aminoácidos con genes de *Brevibacillus brevis* y *B. laterosporus*; el péptido señal solo se encontró en la Lisofosfolipasa PF13472. En la Tabla 6.2 se muestra la clasificación de las fosfolipasas de acuerdo con la base de datos de Pfam. En base a estos resultados, se eligieron los genes que codifican para la PLA2 tipo patatina de 948 pb (llamado *pla-bt*), y el gen que codifica para la PLPC dependiente de zinc de 792 pb

(llamado *plc-bt*), debido a que no se encontraron reportes de caracterización de estas enzimas en la literatura.

TABLA 14. Clasificación de las fosfolipasas de *Brevibacillus thermoruber* HT42 de acuerdo con el Pfam.

Enzima	# PFAM	Familia	Subfamilia
Fosfolipasa	PF01734	Fosfolipasa similar a patatina	Proteína de función desconocida UPF0028
Posible fosfolipasa C	PF13803	DUF4184	Función desconocida
Lisofosfolipasa	PF13472	Lipasa	Acilhidrolasa similar a GDSL
Fosfolipasa	PF01734	Fosfolipasa similar a patatina	Proteína de función desconocida UPF0028
Fosfolipasa	PF00068	Fosfolipasa A2	sPLA2 (fosfolipasas secretadas) cPLA2 (fosfolipasas citosólicas) lp-PLA2(fosfolipasas asociadas a lipoproteínas)

6.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PLA-BT

El gen *pla-bt* codifica para la posible fosfolipasa A₂ (PLA-BT). Se realizó el alineamiento de la secuencia de nucleótidos por medio de la herramienta Blastn, y no se encontró similitud con ningún organismo, lo que puede ser debido a que las secuencias del genoma de *Brevibacillus thermoruber* no han sido depositadas, o ido a que sea una región de baja complejidad. Posteriormente, se hizo la traducción de acuerdo al servidor ExpASy, que se muestra en la tabla 6.3.

Tabla 6.3 Secuencia de nucleótidos y la traducción a aminoácidos de *pla-ht*.

Secuencia de nucleótidos y su traducción a aminoácidos
atgaaggcgagcgcggtgtttgagggcggcgggggtgaaagggatcgcctttatcggggcg
M K A D A V F E G G G V K G I A F I G A
ctgcaggtgatggaggagcacggctatacgtgggcgaacctggccggcacgctcggcgggc
L Q V M E E H G Y T W A N L A G T S A G
tcgtttgctcgcgctctgctcggggcgggctacaagagcggagagatcaggcccgtgttt
S F V A A L L G A G Y K S G E I R P V F

```

gagcggctcgactatctgcactttctcgagcggcggcggcatcggacggctgcgggtcatc
E R L D Y L H F L E R R G I G R L P V I
ggccccctgtacgaactgatggtgcggcagggaatgtaccggaccaaccggattgagcgg
G P L Y E L M V R Q G M Y R T N R I E R
tttatggacgaattggtgaggagaaaaggcatccgcaccttcggggacctgcgcggggt
F M D E L L R R K G I R T F G D L P P G
aagctcaggatcatcgcgtccgacatcacggcgggaaaaatgctggtcctgcgggacgat
K L R I I A S D I T A G K M L V L P D D
ctcgtccagtttgacatcgtcccggagaattccccatcgcccgggcccgtccgcatgctc
L V Q F D I V P E E F P I A R A V R M S
tgctcgtcccgtattttctttcagccgggtccgggttgagcagaacggggaaccgcactat
C S L P Y F F Q P V R L E Q N G E P H Y
atcgtggacggcgggctgctgagcaactatccggctctggttggttcgacggtcccggaaaa
I V D G G L L S N Y P V W L F D V P G K
ccgcgctggccgacgatcgggtttcggctgcacggcaaacgggtggagcgggaaccgtac
P R W P T I G F R L H G K R V E R E P Y
cggatccggggacttttttcgttctcccgcagtctgatcaccacgatgctggacgccccac
R I R G L F S F S R S L I T T M L D A H
gaccggctgtatgtggagagggcgcaggcgggtgcggacgggtcttcattcccacgctgggg
D R L Y V E R A Q A V R T V F I P T L G
gtgcggaccacgcagttcggcctctcgcgccgaactgcgcgcgtccctgcttcggttcgggg
V R T T Q F G L S P E L R A S L L R S G
gaggaggcggccccggcagtttctggccttggcacttcgagcagtagctcgaagtgttt
E E A A R Q F L A K W N F E Q Y V E V F
cgcagcataccgctgcgccaacgaaaaaacaggctgcctcgtatag
R S I P P A P N E K T G C L V -

```

Se analizó la secuencia de la proteína PLA-BT por medio de las herramientas Blastp de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y PFAM. Con ambas herramientas, se encontró que la proteína PLA-BT es una enzima serín acilhidrolasa que pertenece a la superfamilia de las fosfolipasas similares a patatina y las fosfolipasas A₂ con una identidad de 99.37%, y se identificaron los dominios del codo nucleofílico y sitio activo característico de estas enzimas (Figura 6.2 y 6.3). Se encontró también que la enzima no posee péptido señal, lo que indica que no es secretada al medio de cultivo por la bacteria.

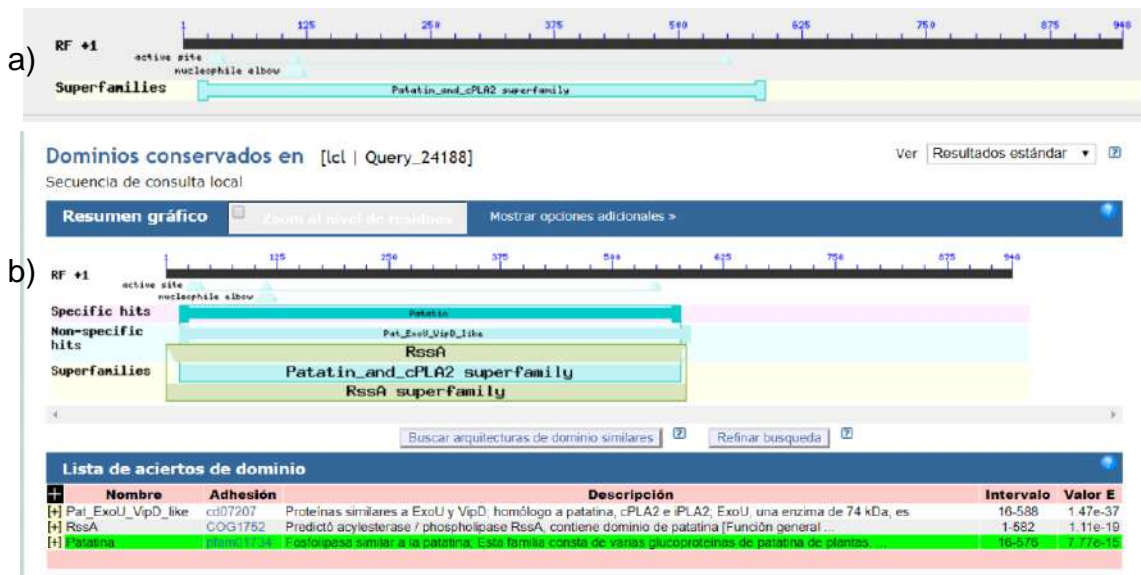


FIGURA 8. Alineación de la secuencia de aminoácidos de PLA-BT en la plataforma Blastp.

En la figura 6.2 en el apartado a) se muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos y similitud con secuencias depositadas en la base de datos b) Consulta de dominios conservados de la secuencia de aminoácidos en la base de datos de dominios conservados (CDD).



FIGURA 9. Alineación de los aminoácidos de la proteína PLA-BT por medio de la herramienta PFAM.

6.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PLC-BT

El gen *plc-bt* codifica para la posible fosfolipasa C (PLC-BT). Se realizó el alineamiento de la secuencia de nucleótidos del gen *plc-bt* por medio de la herramienta Blastn, y no se encontró resultado de similitud con ningún organismo, lo que puede ser debido a que

las secuencias del genoma de *Brevibacillus thermoruber* no han sido depositadas o la secuencia de nucleótidos sea de baja complejidad. Se hizo la traducción de acuerdo al servidor ExPASy (Tabla 6.4).

Tabla 6.4 Secuencia de nucleótidos y la traducción a aminoácidos de *plc-ht*

Secuencia de nucleótidos y su traducción a aminoácidos
ttgccgttcacgttcgcccacccggcgatcgttttgcccttttggcgcgttcgctggctg
L P F T F A H P A I V L P F W R V R W L
tcctttaccgcgctggctcttcggcagcatggctcccgatTTTTgaatactTTTTccggctg
S F T A L V F G S M A P D F E Y F F R L
agcccgtaacagcacagtcagccattccctgcttggcctgattgtgtttgatctgcccgtc
R P Y S T V S H S L L G L I V F D L P V
gctttgctgctggccggttctctttcaccgaatcgtaagcgccccctggcgcctgctg
A L L L A V L F H R I V K R P L V A C L
cccgccccgtttgaccggggattcgggtacgctgcgccaagccctggggcatcggtcg
P A P F D R G F G Y A A A K P W G I G S
ctgctgatgggctggctcttttccattcggcggtgatcgggagcctcaccatatacgtc
L R D G L V F S Y S A V I G S L T H I V
tgggacgcgtttaccatcagggggcgcttcatggctcagccgccttccgcttcttcaacag
W D A F T H Q G A F M V S R L P L L Q Q
cgggtgccggtgccgtggacgggcttggacggtcccgctctacaagatgctgcagcacggc
R V P V P W T G L D V P V Y K M L Q H G
agtacgcttaccggcttgtcgtgattgctgctgacactctggctggcggcgctcgggga
S T L T G L S L I A L T L W L A A R R G
gcggtgcaggtggcggcgggagaagtcttccggccccggacaaaatggctgtattggctg
A A A G G G G R S L P A R T K W L Y W L
ggcgtgggaggctgcggcctgctcgcggccgcgctggggatggagcgctggcggcgca
G V G G C G L L A A A A W G W S A G G A
tggccgatggcgcgctctgctgggcgcatcgctgccgcttctgtccggtgcatggccggt
W P M A R L L G G I V P L L S G C M A G
ctgctcgtcatgctggtgctgttcgaccggtttggtccggcaggtgccacaacaggtac
L L V M S W L F D R F G P A G A H N R Y
ccggccctgtag
P A L

El análisis de la proteína PLC-BT se realizó por medio de las herramientas Blastp de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y PFAM. Con ambas herramientas, se encontró que la proteína PLC-BT codifica para una proteína DUF 4184 (dominio de función desconocida) de *Brevibacillus thermoruber* con una identidad de 99.37%, y no se identificaron los dominios del codo nucleofílico ni de sitio activo característico (Figura 6.4). Sin embargo, de acuerdo con el análisis de dominios conservados, se encuentra similitud de la secuencia con una superfamilia de proteínas fosfolipasa C dependiente de Zinc.

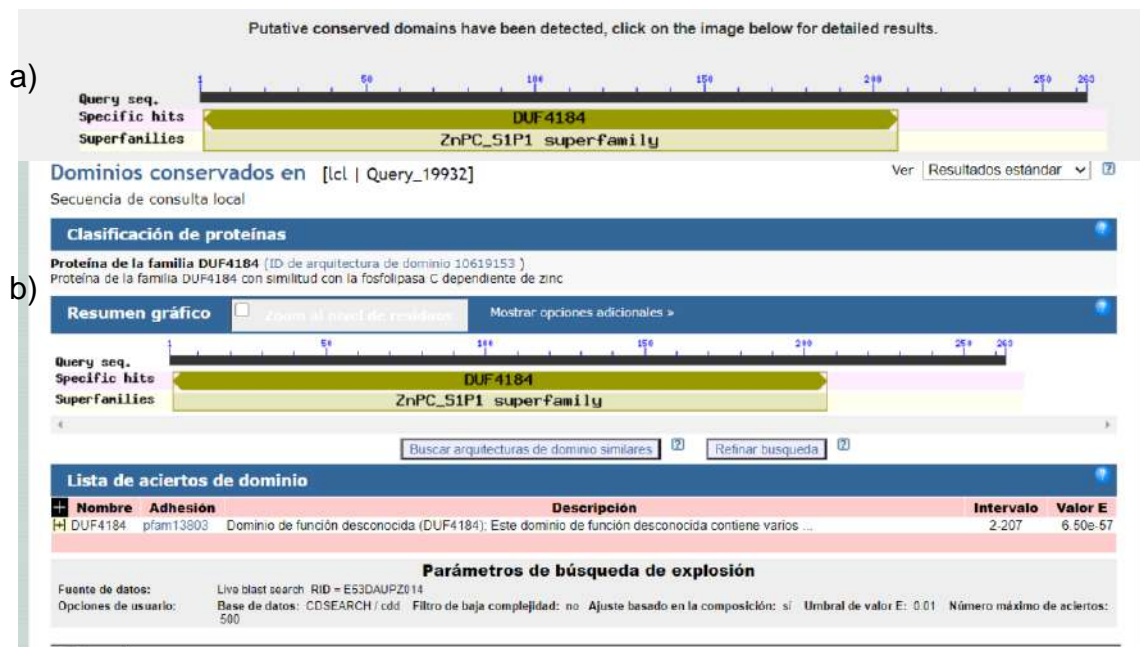


FIGURA 10. Alineación de la secuencia de aminoácidos de la proteína PLC-BT en la plataforma Blastp.

En la figura 6.4 en el apartado a) se muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos y similitud con secuencias depositadas en la base de datos, y en b) se muestra la consulta de dominios conservados de la secuencia de aminoácidos de PLC-BT en la base de datos de dominios conservados (CDD).

6.5 Análisis de la proteína PLA-BT

La secuencia de aminoácidos de la proteína PLA-BT fue analizada utilizando las bases de datos UniProtKB, que a su vez utiliza la base de datos uniprotkb_refprotswissprot

(Proteína) con el programa de blastp (blastp BLASTP 2.9.0+), y se encontró que tiene una identidad de 100% con la secuencia de una fosfolipasa de *Brevibacillus sp* WF146, y de 75.2 % con una fosfolipasa A de *Brevibacillus bortelensis* AK1; además, de acuerdo con el Gen Ontology (GO), PLA-BT posee función de hidrolasa, está involucrada en el proceso catabólico de lípidos, y se identifican dos aminoácidos en el posible sitio activo, el aminoácido 38 con acción nucleofílica y el aminoácido 183 como aceptor de protones. De Acuerdo a BioCyc y el Protein Homology, el peso molecular de PLA-BT es de 35.6 kD.

Por otro lado, en el UniProtKB [A0A1A5XU22](#) se encontraron dos proteínas tipo fosfolipasa de las especies de *Brevibacillus sp* y *Brevibacillus sp*. LEMMJ03 con identidad mayor al 90% con PLA-BT.

De acuerdo con la base de datos del Protein Data Bank (PDB), se encontró que PLA-BT tiene similitud con una proteína cristalizada ortorrómbica de PlpD de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 clasificada como proteína de transporte (ID de entrada 5FQU) de la proteína tipo papatina con dos cadenas (A y B), es decir, presenta una simetría cíclica, en la cual dos monómeros (homo-dímeros) están unidos por puentes de sal en dos alfa-hélices. Esta proteína está asociada con el sistema de catabolismo de lípidos, utilizada en el proceso de infección (Da Mata Madeira *et al.*, 2016). En la Figura 6.5 se muestra un resumen de las características encontradas en la secuencia de aminoácidos de la PLA-BT en el PDB.

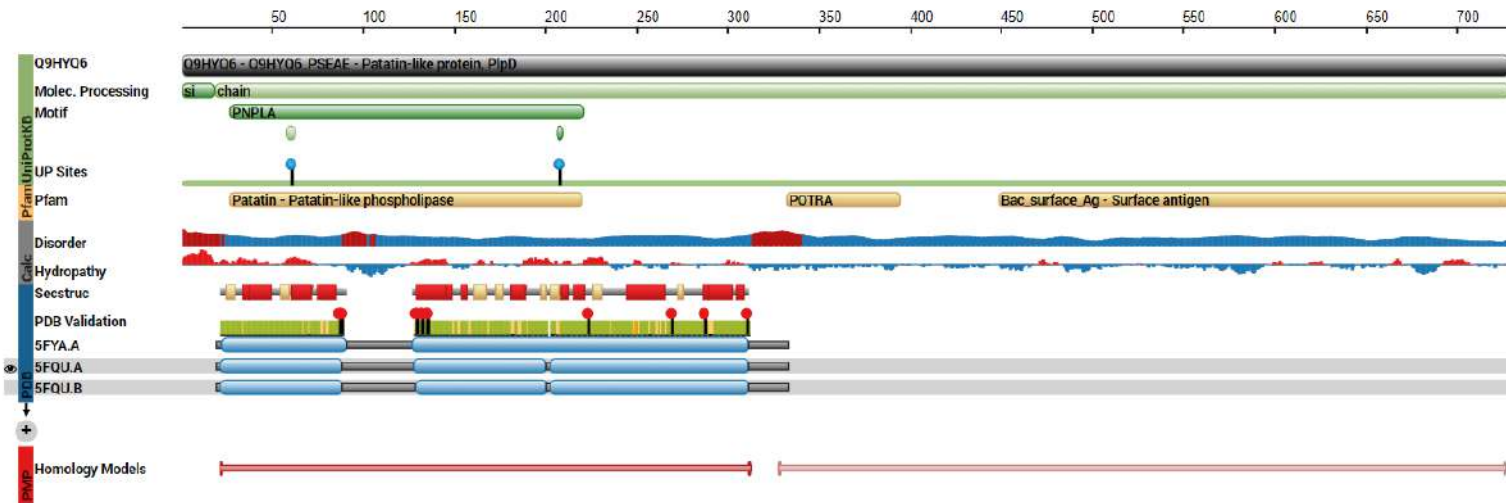


FIGURA 11. Resumen de las características de la PLA-BT en diferentes bases de datos del PBD.

Los resultados en la fila 1, en verde, corresponden a los análisis de UniProtKB e indican la similitud con número de entrada Q9HYQ6 en comparación con la secuencia de una proteína similar a patatina de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1), con una secuencia conservada de fosfolipasa A. En la fila 2, de color gris, se muestran los resultados de la predicción por BioJava de las regiones ordenadas e hidrofílicas (en azul) y las regiones desordenadas e hidrofóbicas (en rojo) que indican las regiones que podrían albergar el canal hidrofóbico característico de enzimas lipolíticas. En la fila 3 se observa en Secstruc (del PDB) la estructura secundaria señalando las alfa-hélices y las hojas beta correspondientes a proteínas tipo papatina. En la fila 4 se muestra el análisis del SwissModel que representa a la proteína de PLA-BT con dos cadenas, presentes en la entrada Q9HYQ6, lo que sugiere la formación homodímeros en la proteína.

En el Pfam, con la entrada PF01734, se analizó la distribución taxonómica de las fosfolipasas similares a patatina. Como se observa en la Figura 6.6, la familia de proteínas a las que pertenece PLA-BT se encuentra en el dominio bacteria (56%), en el eucaria (43%), y en menor proporción (1%) en arquea, y sugiere que la proteína puede ser utilizada para el reordenamiento de la membrana celular o en el proceso metabólico de utilización de lípidos.



FIGURA 12. Representación gráfica de la distribución taxonómica de la familia de fosfolipasas similares a patatina (PF01734).

6.5.2 Modelación de la estructura secundaria y terciaria de PLA-BT.

De acuerdo con el análisis de la estructura secundaria realizado en la base de datos PSIPREED y la plataforma PDBsum, la proteína PLA-BT posee ocho hojas beta, trece alfa hélices, y giros; no se encuentran regiones extracelulares, transmembranales ni de interacción con la membrana, ni péptido señal, lo cual indica que es una proteína que no es secretada ni está en la región transmembranal (Figura 6.7).

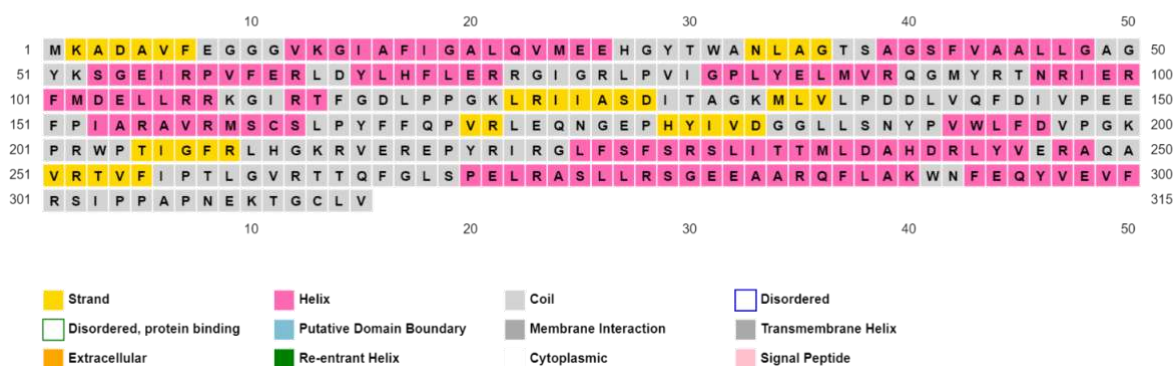


FIGURA 13. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PLA-BT de acuerdo con la base de datos PSIPREED.

El alineamiento de la secuencia en la plataforma PDBsum, con los dos monómeros de la entrada 5FQUA y el código UniProt Q9HYQ6, demostró la presencia de ocho hojas beta y catorce alfa-hélices, que son características del plegamiento canónico de las lipasas α/β hidrolasas (Figura 6.8).

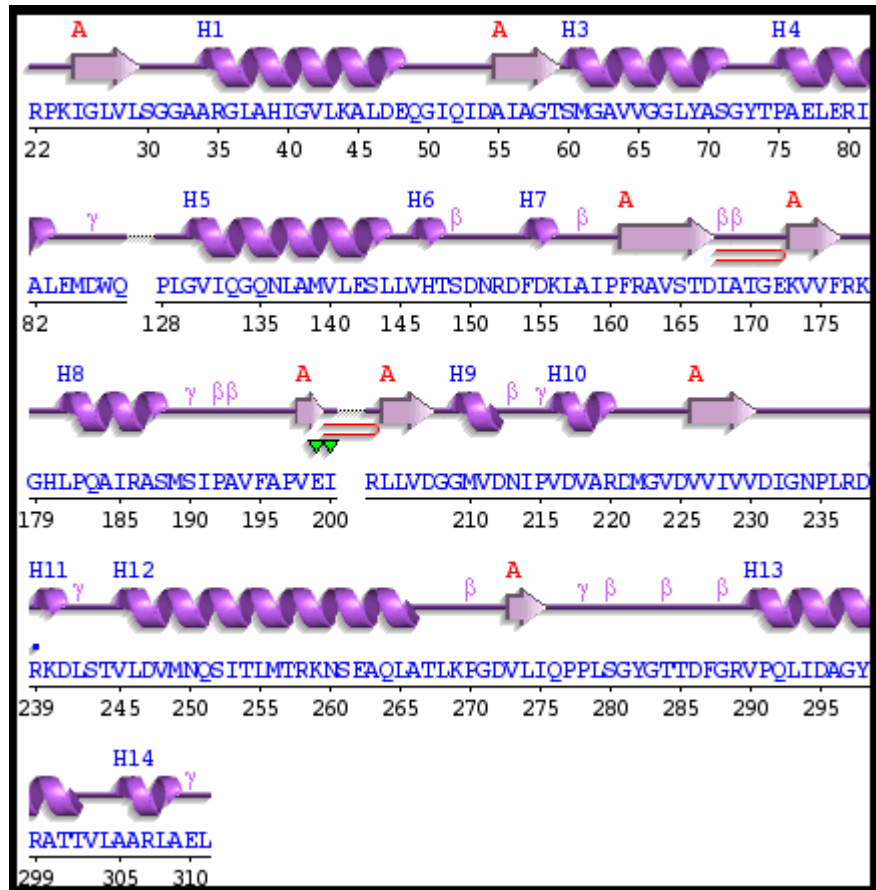


FIGURA 14. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PLA-BT de acuerdo con la plataforma PDBsum.

El diagrama de la topología de la estructura secundaria de la PLA-BT se encuentra en la Figura 6.9, donde en A) se muestran las alfa-hélices como cilindros color rojo y las hojas beta como flechas, y los extremos amino y carboxilo en cuadros amarillos del primer dominio 5FYA.A; y en B) se observa la topología, pero mostrando los residuos de aminoácidos y sus interacciones.

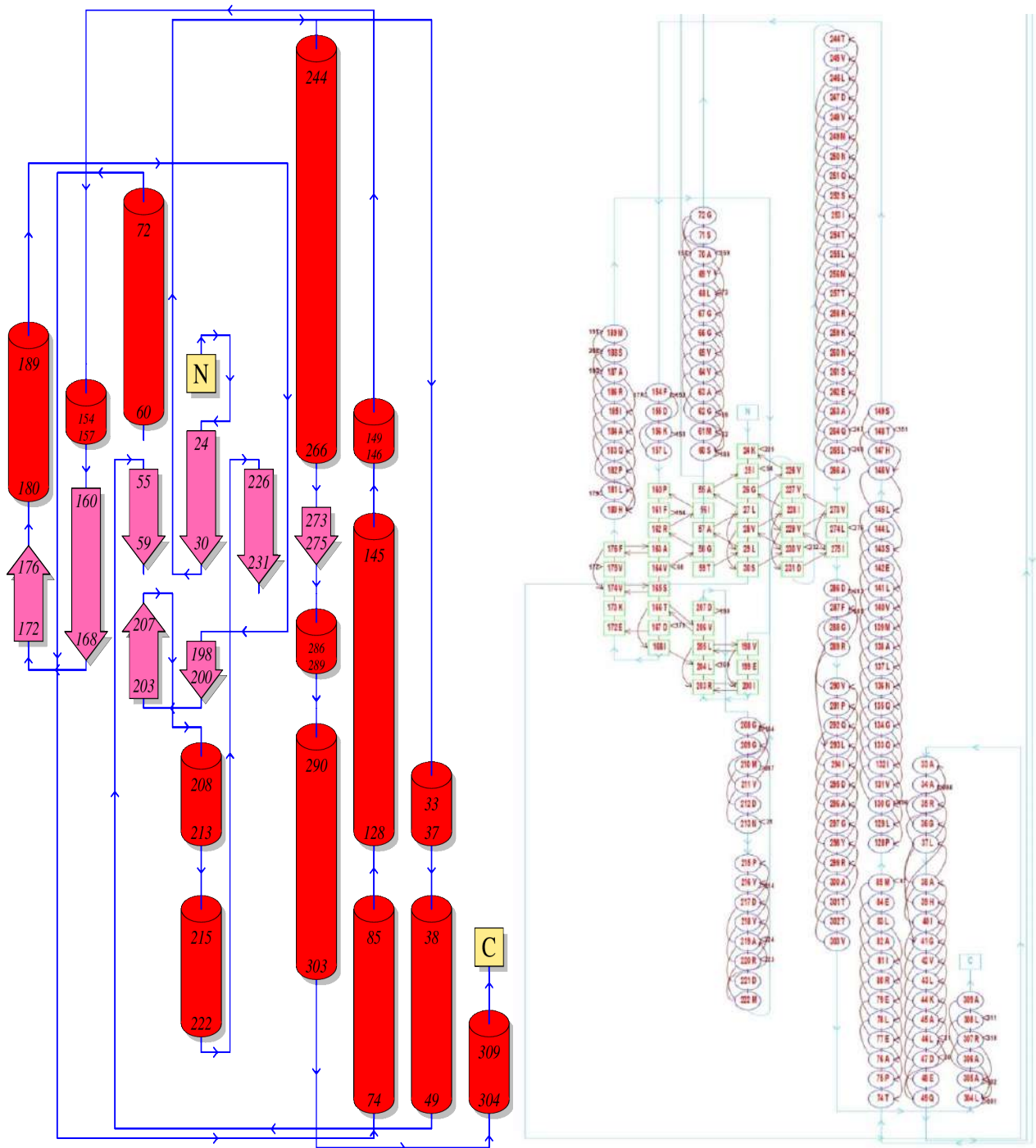


FIGURA 15. Diagrama de la topología de la estructura secundaria similar a PLA-BT de acuerdo a la plataforma PDBsum.

En la figura 6.9, en a) cilindros color rojo: alfa-hélices, flechas color rosa: hojas beta; cuadros amarillos: extremos amino (A) y carboxilo (C) del dominio 5FYA.A; y en b) número y abreviatura de cada residuo de aminoácido en óvalos. Con este análisis se predice el

arreglo estructural de PLA-BT y de las interacciones que presentan entre aminoácidos, confirmando su pertenencia al grupo de las enzimas fosfolipasas.

Se realizó el modelamiento de la estructura terciaria por medio de I-TASSER y, con el modelo que tuvo el mayor puntaje de calidad ($C = -0.3$, de un rango que va de -5 a 2), se realizó la alineación estructural con TM-align, utilizando modelos depositados en el PDB con similitud estructural al objetivo. Se encontró una similitud de 0.256 y el puntaje más alto de TM (0.729) con el modelo de 5FQU. A (Figura 6.10).

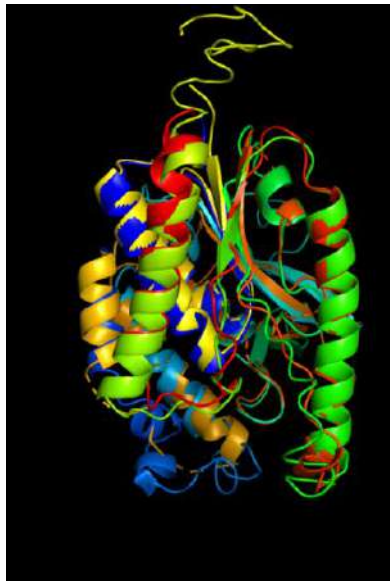


FIGURA 16. Modelaje de la alineación estructural de la proteína objetivo (PLA-BT) y la estructuralmente idéntica de PDB (4FYA.A). Espiral: alfa-hélice; flecha: hoja beta.

En la Figura 6.11 se muestra el modelo obtenido utilizando RaptorX, Robetta. Se pronosticó una estructura, utilizando la plantilla con ID de entrada 5FQU.A como la más adecuada y modelando el 100% de la secuencia, y se pudo predecir la presencia de un dominio de fosfolipasa tipo papatina, con un valor p reportado en el servidor de $9.14e-07$, con una estructura secundaria que contiene 36% de alfa-hélices, 12 % de hojas beta, y 50 % de giros, con 37% de la molécula expuesta al solvente, 28% con acceso medio, y 33% oculto.



FIGURA 17. Modelo predictivo para la estructura terciaria de la proteína PLA-BT obtenida con el servidor RaptorX.

A través del servidor Phyre2 se analizaron los residuos conservados, que son correspondientes a los obtenidos en Robetta e I-TASSER, y se identificaron los residuos del sitio de unión a ligando y del sitio activo (Figura 6.12, Tabla 6.5) con una probabilidad por arriba de 0.9 (siendo 1 la más alta), obtenidos a partir del servidor COFACTOR.

TABLA 15. Residuos potenciales con las probabilidades más altas de pertenecer al sitio activo.

RESIDUO	POSICIÓN	PROBABILIDAD
GLY	9	0.915
GLY	10	0.933
GLY	11	0.940
SER	38	0.934
ALA	39	0.930
CYS	161	0.927
ASP	183	0.917

El sitio activo de las enzimas lipolíticas, incluyendo a las fosfolipasas, suele estar compuesto por una triada catalítica formada por residuos de serina, histidina y ácido aspártico. Sin embargo, se han reportado también fosfolipasas cuyo sitio activo está constituido por una diada catalítica formada por residuos de serina e histidina, como la fosfolipasa sPLA₂S, y por serina y ácido aspártico, como la fosfolipasa cPLA₂ (Six and Dennis, 2000; Hiraoka *et al.*, 2002; Schaloske y Dennis, 2006). En el modelado de la PLA-HT no se pudo encontrar una cercanía con algún residuo de histidina, corroborando que solo presenta una diada catalítica Ser38-Asp183 y, de acuerdo con Da Mata Madeira y cols. (2016), que reporta una fosfolipasa A₂ con características similares, este tipo de proteínas corresponden a cPLA₂.

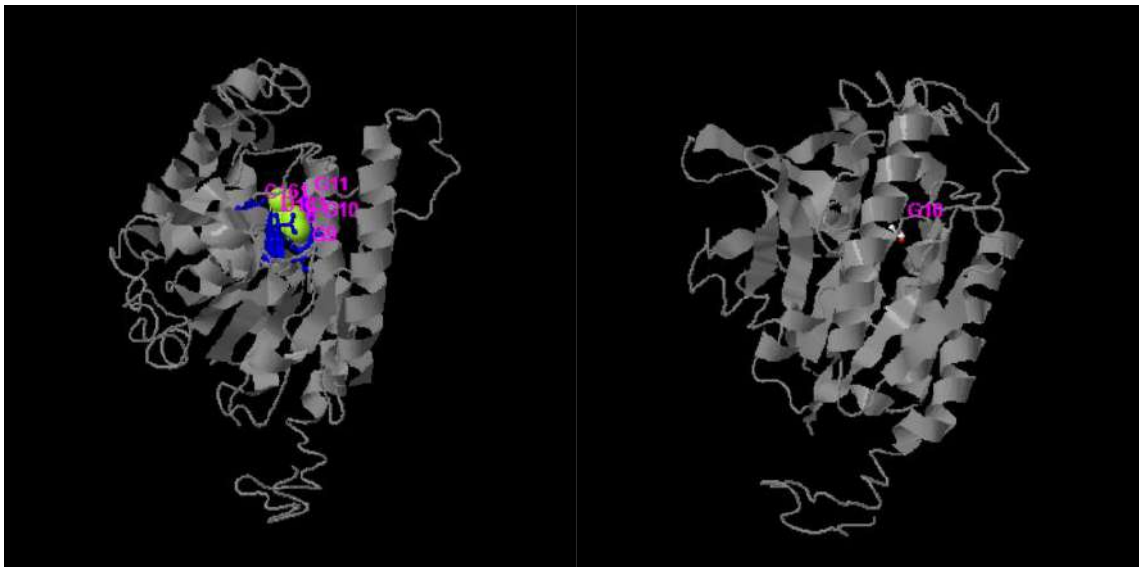


FIGURA 18. Sitios de unión a ligando y sitio activo de PLA-BT.

En la figura 6.12, por medio del modelado de PLA-HT se indica en a) residuos del canal oxianión, b) sitio de unión a ligando.

6.5.3 Análisis de las interacciones proteína-proteína de PLA-BT.

Para el análisis de las interacciones proteína-proteína de PLA-BT se utilizó el servidor STRING y la fosfolipasa A de *Brevibacillus brevis* NBRC100599, que tiene un 71.15% de

semejanza con PLA-BT. Con este análisis se encuentran las proteínas que pueden tener una función compartida con la fosfolipasa. Los resultados se muestran en la Figura 6.13.

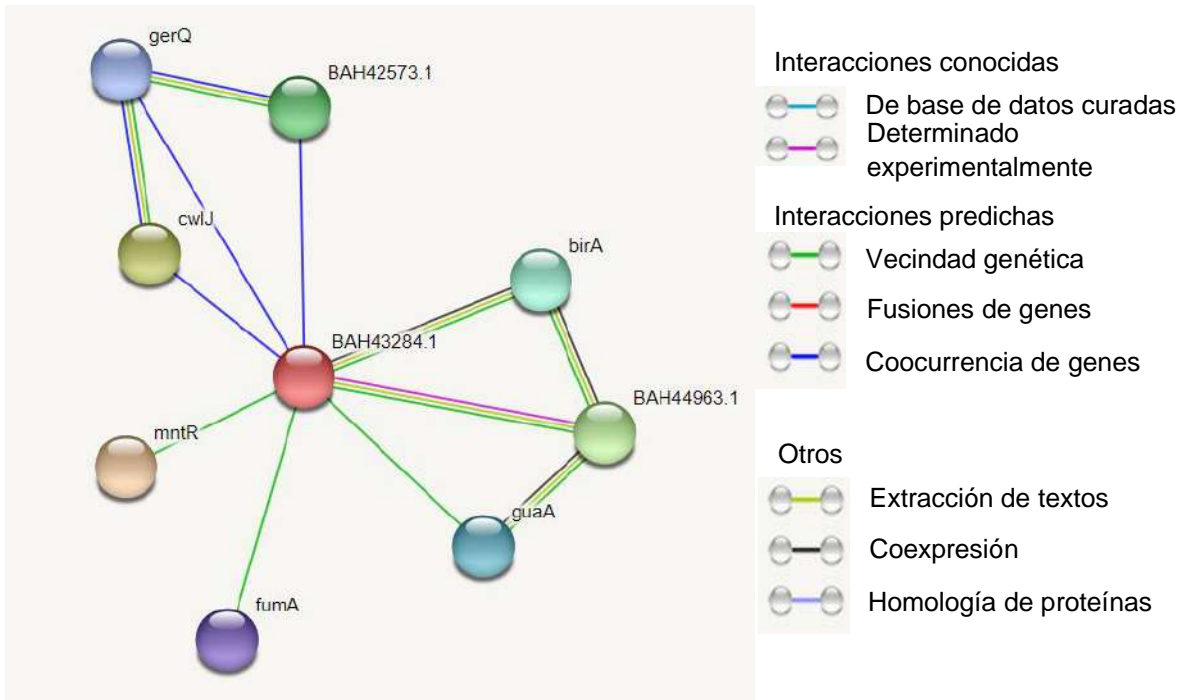


FIGURA 19. Diagrama de la interacción proteína-proteína de la PLA-BT (BAH43284.1) con otras proteínas del microorganismo.

En la Tabla 6.6 se muestran, en orden decreciente, las proteínas que interactúan con la fosfolipasa A y, por analogía, es posible inferir que la función de la PLA-BT está relacionada con la integración y reordenamiento de la membrana celular, la duplicación celular y la formación de endosporas, procesos celulares que son primordiales particularmente en ambientes extremos, como supervivencia en momentos de tensión ambiental, acción de ciertas sales, o por las condiciones de elevada temperatura del suelo del que se aisló a *Brevibacillus thermoruber* HT42.

TABLA 16. Resumen de las proteínas relacionadas funcionalmente con PLA-HT.

Identificador	Consulta de entrada Pfam	Resumen Interpro
gerQ	Spore_GerQ (PF09671)	Son proteínas de recubrimiento de esporas GerQ de Firmicutes formadores de endosporas.
BAH42573.1	Hydrolase_2 (PF07486)	Implicadas en la hidrólisis de la pared celular, se expresa durante la esporulación.
cwlJ	Hydrolase_2 (PF07486)	Implicadas en la hidrólisis de la pared celular, se expresa durante la esporulación.
mntR	HTH DTXR	Elemento regulador de la toxina de la difteria, actúa como proteína represora.
fumA	Fumerase (PF05681)	La fumarasa es un componente del ciclo del ácido cítrico, se involucra en la vía reductora del oxaloacetato al succinato durante el crecimiento anaeróbico.
guaA	Peptidase_C26 (PF07722)	Actividad Hidrolasa
BAH44963.1	Contiene varias entradas entre la que destaca PP-Binding (PF00550)	La proteína portadora de acilo (ACP) es un cofactor esencial en la síntesis de ácidos grasos por los sistemas de síntesis de ácidos grasos en bacterias y plantas.
birA	Contiene varias entradas de dominios entre la que destaca BPL_C (PF02237)	Esta proteína está implicada en el proceso de modificación de proteínas celulares

6.6 Análisis de la proteína PLC-BT

La secuencia de aminoácidos de la proteína PLC-BT se examinó empleando la base de datos UniProtKB (blast BLASTP 2.9.0+), en donde se localizó que tiene una identidad del 97% con la secuencia de una proteína no caracterizada de *Brevibacillus sp.* WF146, y con una proteína DUF4184 (proteína de función desconocida) de *Brevibacillus sp.* LEMMJ03. Así mismo, no se encontró función conocida asociada a PLC-BT y, de

acuerdo a Gen Ontology (GO), la proteína PLC-BT es un componente integral transmembranal. Además, no se encontró ningún indicio de la presencia de un sitio activo que correspondiera a alguna hidrolasa. Conforme al BioCyc y Protein Homology, el peso molecular de PLC-BT es de 28.5 kDa.

Conforme a la base de datos del Protein Data Bank (PDB) no se encontró secuencia reportada o depositada, por lo que se hizo una búsqueda en la base de datos de Interpro con el ID IPR025238, para observar con que otra familia de proteínas comparte la arquitectura de dominio, observando que comparte con proteínas no caracterizadas de la especie *Acinetobacter baumannii* 348935, *Acinetobacter sp.* 1289694, *Cryptosporangium arzum* DSM 44712. Además, se encontró que PF13803 está asociada con una superfamilia de fosfolipasa C/ p1 nucleasa CL0368, mismas que están descritas como supuestas hidrolasas putativas asociadas a membrana, es decir que pueden estar actuando como fosfolipasas.

Además, se realizó una visualización en Pfam de la distribución taxonómica de esta familia de proteínas, que representa la proteína de función desconocida con la entrada PF13803.

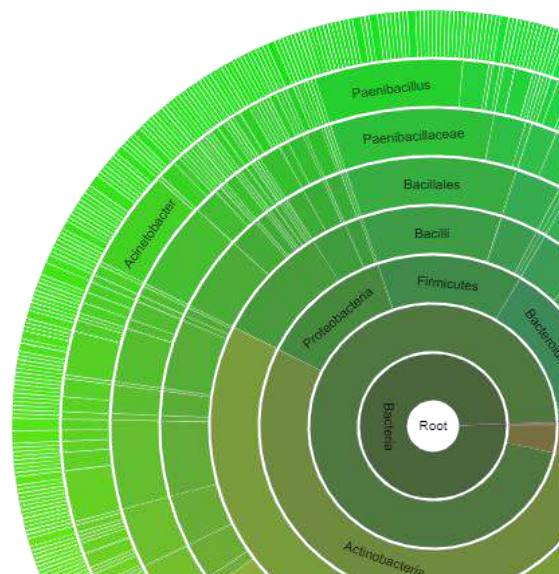


FIGURA 20. Representación gráfica de la distribución taxonómica de la familia de proteínas de función desconocida (PF13803).

Como se muestra en la Figura 6.14, de acuerdo con el programa Pfam, la familia de proteínas de función desconocida a la que pertenece PLC-BT se encuentra en mayor porcentaje (99.5%) en el dominio de las bacterias y en menor proporción (0.05%) en arqueas, no encontrándose en el dominio eucaria.

6.6.2 Modelación de la estructura secundaria y terciaria de PLC-BT.

De acuerdo con el análisis de la estructura secundaria realizado en la base de datos de PSIPREED y la plataforma PDBsum, la proteína PLC-BT está constituida por doce alfa hélices y giros, y no posee láminas beta. Además, se identifican regiones extracelulares, transmembranales y que están interactuando con la membrana (Figura 6.15).

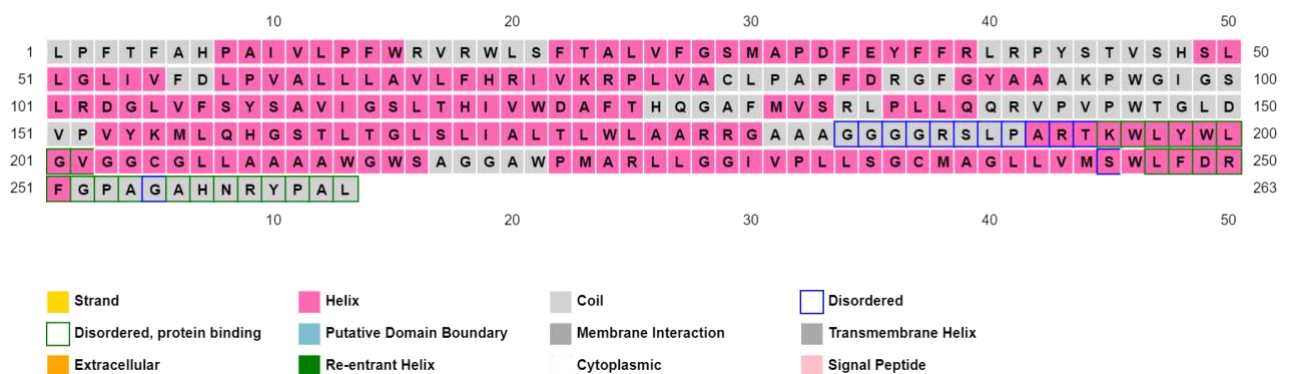


FIGURA 21. Predicción de la estructura secundaria de la proteína PLC-BT de acuerdo con la base de datos PSIPREED.

De acuerdo al alineamiento de la secuencia en la plataforma PDBsum, la proteína presenta una similitud de 37% con una bomba de protones de *Coccomyxa subellipsoidea* C169 con ID 6GYH (Fudim *et al.*, 2019), en forma de monómero transmembranal, por lo que no muestra el plegamiento característico de las α/β hidrolasas.

El diagrama de la topología de la estructura secundaria de la PLC-BT se muestra en la Figura 6.16, donde se muestran las alfa-hélices como cilindros color rojo y las hojas beta como flechas, y los extremos amino y carboxilo en cuadros amarillos.

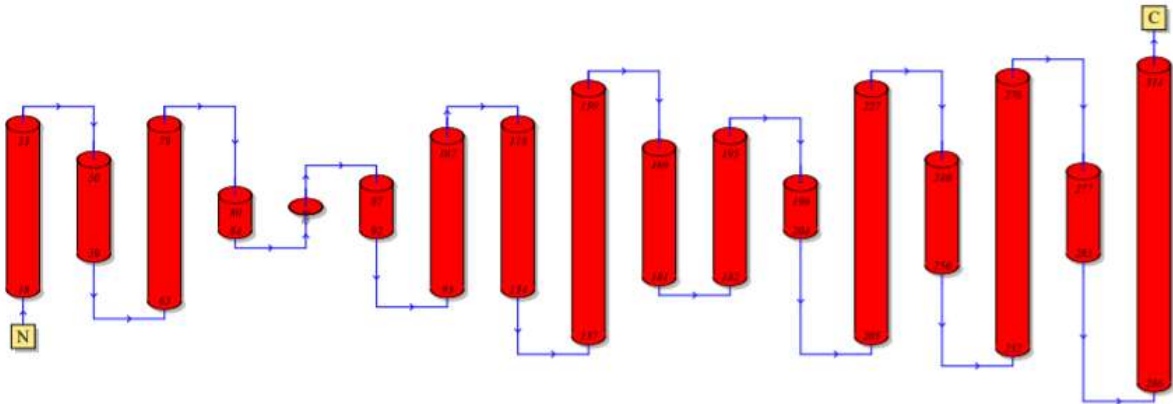


FIGURA 22. Diagrama de la topología de la estructura secundaria de la PLC-BT. Cilindros color rojo: alfa-hélices, flechas: hojas beta; cuadros amarillos: extremos amino (N) y carboxilo (C).

Se realizó el modelamiento de la estructura terciaria por medio de I-TASSER, en la cual se encontró una similitud de 37% con una proteína membranal con función de bomba de sodio (4AV3.A) de *Thermotoga marítima* (Figura 6.17). Se encontró que contiene 63% de alfa-hélices, 0 % de hojas beta, y 36 % de giros.

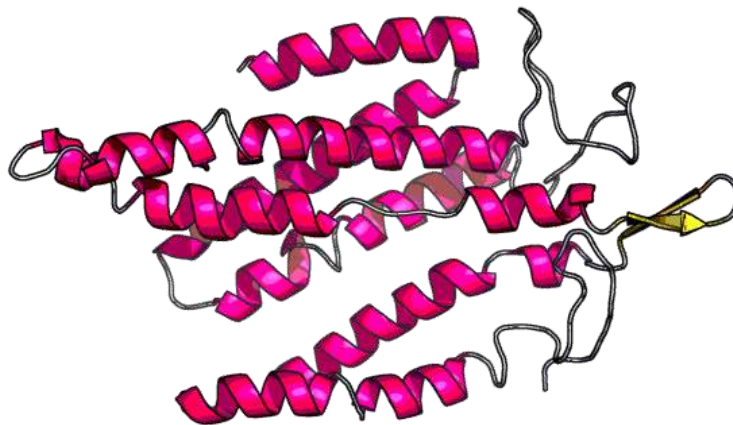


FIGURA 23. Modelo de la estructura terciaria de la proteína PLC-BT obtenida con el servidor RaptorX.

A través del servidor Phyre2 y I-TASSER se analizaron los residuos conservados, y se detectaron posibles residuos del sitio de unión a ligando y del sitio activo (Tabla 6.7) pero con probabilidades menores de 0.2 (siendo 1 la más alta). Por ello, se sugiere que la PLC-BT no posee el sitio activo característico de las enzimas lipolíticas.

TABLA 17. Residuos potenciales con las probabilidades más altas de pertenecer al sitio activo.

RESIDUO	POSICIÓN	PROBABILIDAD
GLY	104	0.063
PHE	107	0.176
SER	110	0.075
ALA	111	0.101
GLY	114	0.057
VAL	142	0.064
PRO	145	0.030
GLN	158	0.044
THR	162	0.122
LEU	166	0.081
CYS	205	0.115
LEU	208	0.128
ALA	212	0.089
GLY	236	0.064
GLY	240	0.058

6.6.3 Análisis de las interacciones proteína-proteína de PLC-BT.

Para el análisis de las interacciones proteína-proteína de PLC-BT se utilizó el servidor STRING y la proteína de la familia DUF4184 de *Brevibacillus borstelensis*, que tiene un 58.50% de semejanza con PLC-BT (Figura 6.20). En la Tabla 6.8 se muestran, en orden decreciente, las proteínas que interactúan con la proteína DUF4184 y es posible asumir que la PLC-BT tiene una función como proteína transmembranal, implicada en el transporte celular y en procesos de regulación.

Por lo anterior, se sugiere que la PLC-BT, descrita como posible fosfolipasa C, no es una enzima lipolítica, por lo que fue descartada para el proceso de clonación.

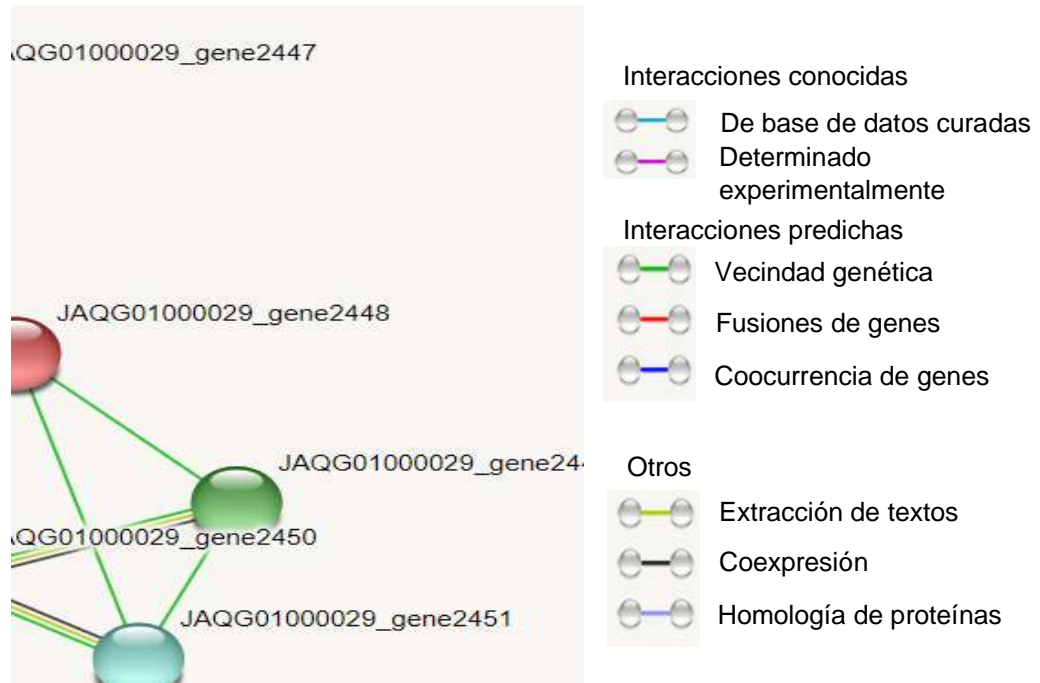


FIGURA 24. Diagrama de la interacción proteína-proteína de la PLC-BT (JAQG01000029_gene2448) con otras proteínas del microorganismo.

TABLA 18. Resumen de las proteínas relacionadas funcionalmente con PLC-HT.

IDENTIFICADOR	RESUMEN INTERPRO
JAQG01000029_GENE2447	ATPasas asociadas con diversos procesos celulares
JAQG01000029_GENE2449	Regulación de la transcripción
JAQG01000029_GENE2451	Actividad metiltransferasa
mntR	Elemento regulador de la difteria
JAQG01000029_GENE2450	Procesamiento del tRNA

6.7 Extracción de DNA genómico de *Brevibacillus thermoruber*.

Posterior a la extracción del DNA genómico con el kit comercial Wizard® Genomic DNA purification de la marca Promega®, se obtuvo una concentración de DNA de 28.5 ng/ μL en un volumen final de 100 μL . En el gel de agarosa al 1% de la Figura 6.19 se puede verificar la adecuada integridad del DNA.

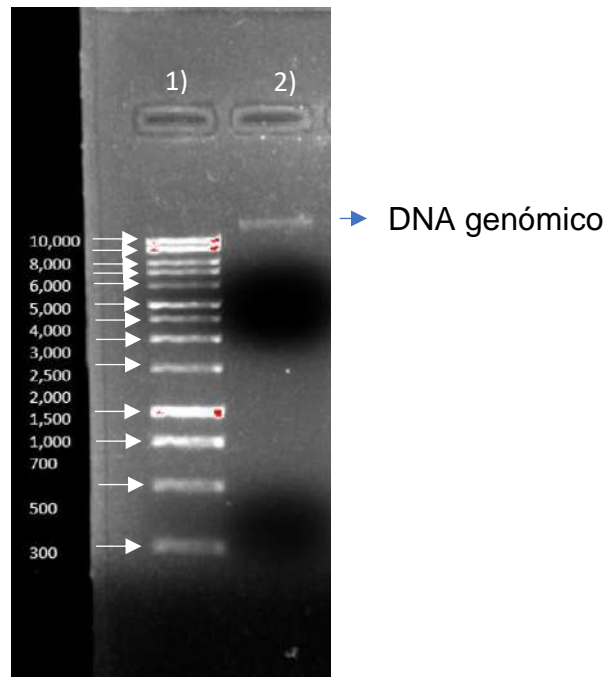


FIGURA 25 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de DNA genómico.

Se muestra en el carril 1: estándares de tamaño molecular de 1kb DNA Ladder de Promega®; Carril 2: DNA genómico de *Brevibacillus thermoruber* HT42.

6.7.2 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *pla-bt*.

Los oligonucleótidos que se diseñaron para la amplificación del gen *pla-bt* son los siguientes:

Forward (33 pb, Tm: 56°C *NdeI*) 5'-GGAATTCCATATGAAGGCGGACGCGGT-3'

Revers (25 pb, Tm: 56°C *HindIII*) 5'- CCCAAGCTTCTATACGAGGCAGCCTGT- 3'

Los sitios de restricción que se añadieron para la clonación se muestran subrayados. La efectividad de los oligonucleótidos se comprobó con el programa Serial Cloner®, obteniendo el producto esperado de 948 pares de bases.

6.7.3 Amplificación por PCR y purificación del gen *pla-bt*

El gen *pla-bt* fue amplificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados y en las condiciones señaladas en el apartado de materiales y métodos. Después de la purificación, se obtuvo una concentración de 20 ng/μL del gen *pla-bt* amplificado. En la Figura 6.20 se muestra la banda del gen *pla-bt* con adecuada integridad y un tamaño de 948 pb, como era lo esperado.

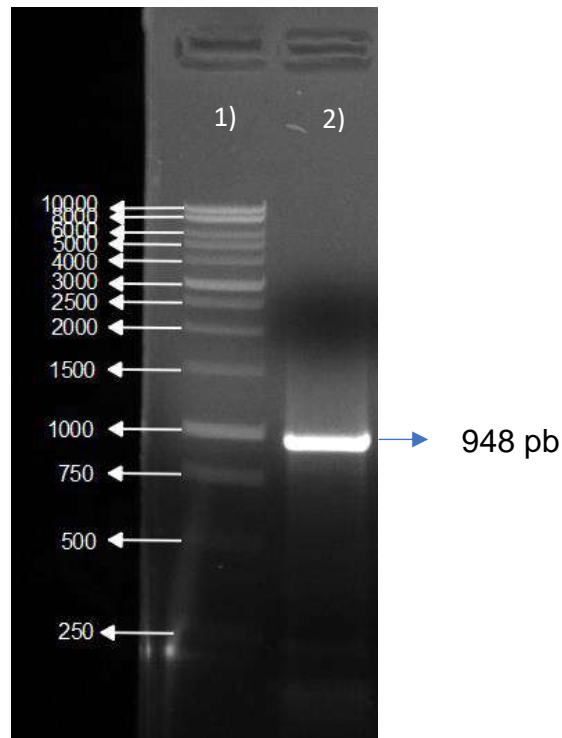


FIGURA 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de amplificación del gen *pla-bt* por PCR.

Se muestra en el carril 1) marcador de peso molecular de 1 Kb, y en el carril 2) gen *pla-bt* amplificado con un tamaño aproximado de 948 pb.

6.7.4 Confirmación del producto de PCR por secuenciación.

El producto de amplificación del gen *pla-bt* fue secuenciado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) de Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Chromas versión 2.6.6., y se empalmaron las obtenidas con los oligonucleótidos directo y reverso para obtener la secuencia completa y corregir errores. La secuencia completa (apéndice A) se comparó con la secuencia del gen *pla-bt* encontrada en el genoma de *B. thermoruber* HT42, usando el programa Sequencher 4.1.4, y se comprobó su identidad en la base de datos BLAST de la National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se encontró una homología del 97.08% entre las secuencias (apéndice A) y una identidad de 96.50% con una proteína de la familia de las fosfolipasas tipo papatina de *Brevibacillus thermoruber* con un dominio funcional de la superfamilia de fosfolipasas tipo papatina citoplasmáticas usando la secuencia de aminoácidos.

6.8. Clonación y expresión del gen de estudio.

El producto de PCR del gen y el vector de expresión fueron digeridos, utilizando un tiempo menor a 1 h por microgramo para evitar la degradación del DNA, y sometidos a la reacción de ligación. Se realizó el proceso de transformación con las células electrocompetentes BL21 pLysS. Se observó crecimiento de colonias en el medio LB con antibiótico kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL a 37°C, pero no hubo resultados positivos al realizar la PCR de colonia. La ausencia del inserto en el vector pudo ser debido a varios factores, entre los que están la falta de una buena digestión de los sitios de restricción por utilizar tiempos, condiciones o enzimas inadecuadas.

Debido a esto, se optó por la construcción del vector recombinante pET28a (+) con el gen *pla-bt*, llamado pET28a (+)-*pla-bt*, por la compañía Genscript® en Piscataway, New Jersey, Estados Unidos. Con el vector en una concentración final de 100 ng/µL, se realizó la clonación y se observó crecimiento de colonias en la caja con medio LB con los antibióticos cloranfenicol y kanamicina. Se confirmó la presencia del vector pET28a (+)-*pla-bt* en la célula hospedera BL21 DE3pLysS por PCR de colonia, al observarse un

producto de amplificación de 948 pb, que es el tamaño esperado para el gen *pla-bt* (Figura 6.21).

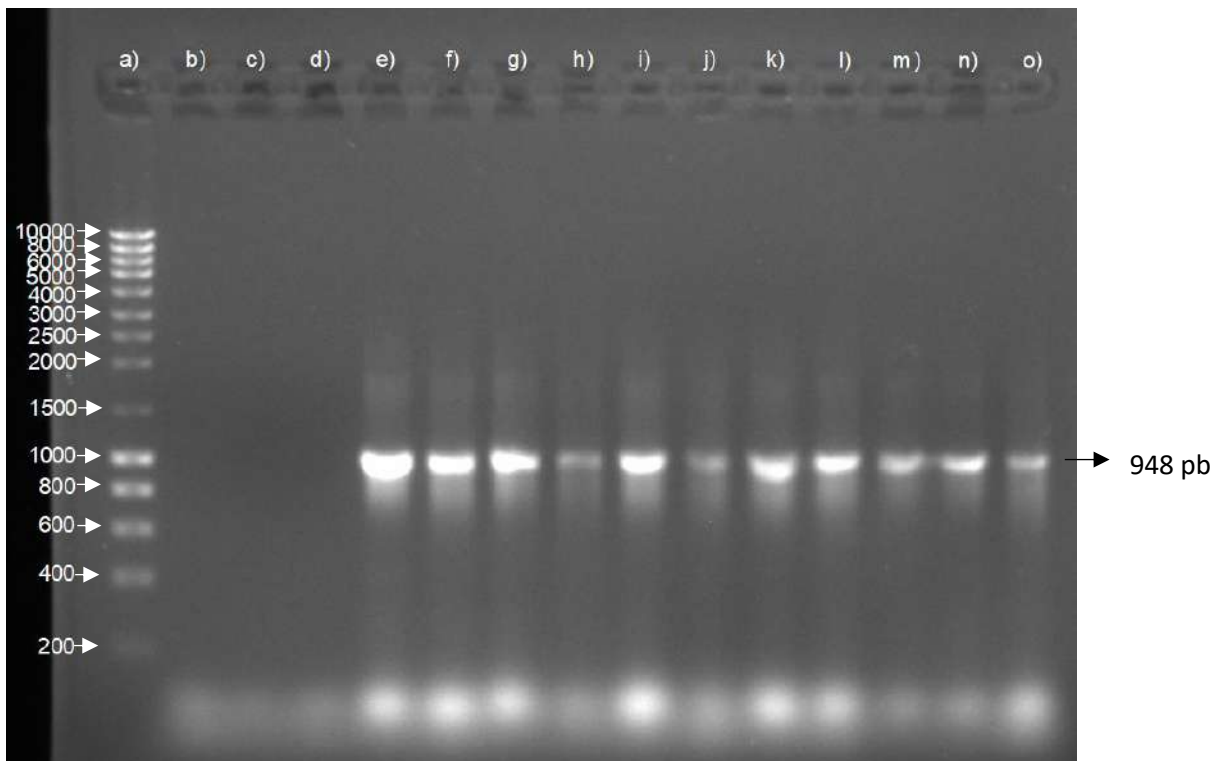


FIGURA 27. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR de colonia del gen *pla-bt*

Se muestra en el carril a) Marcador de tamaño molecular de 1Kb marca Biomiga®; b) a d) controles negativos; e) a o) amplificaciones del gen recombinante *pla-bt*.

6.8.3 Inducción para la producción de la proteína PLA-BT.

La inducción de la proteína recombinante se realizó en concentraciones de 1 mM y 0.4 mM de IPTG durante 12 h. En la Figura 6.22 se muestra el perfil de proteínas sintetizadas por la célula hospedera BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* separadas en electroforesis SDS-PAGE.

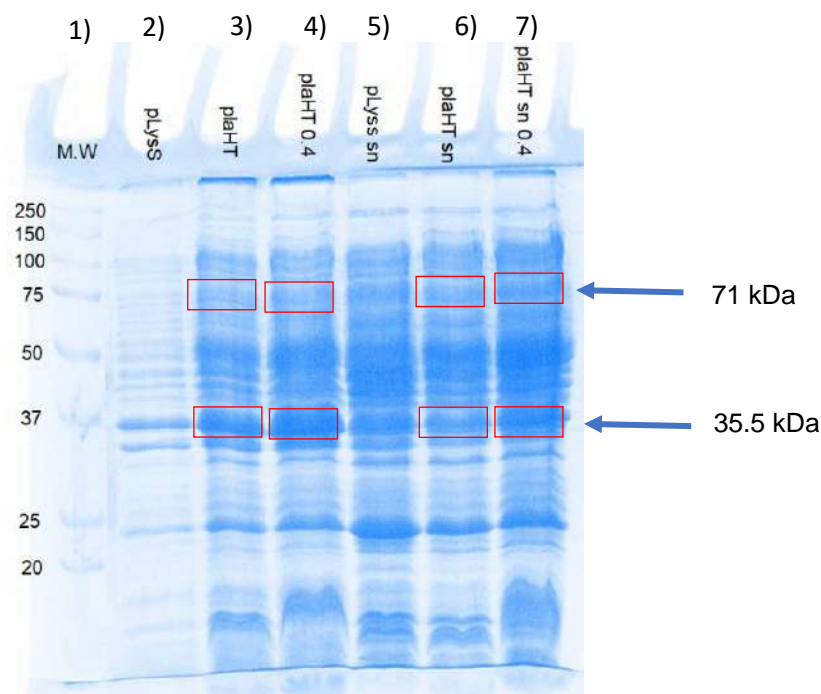


FIGURA 28. Separación en SDS-PAGE de las proteínas producidas por *E. coli* BL21 DE3 pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt*.

Se muestra en el carril 1: estándares de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Carril 2: BL21 DE3pLysS silvestre. Carril 3: BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* con IPTG 1mM; Carril 4: BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* con IPTG 0.4 mM; Carril 5: debris celular de BL21 DE3pLysS silvestre; carril 6: debris celular de BL21 DE3 pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* con IPTG 1mM; Carril 7: debris celular de BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* con IPTG 0.4 mM.

Como puede observarse, en las muestras inducidas con IPTG 0.4 mM se observa una banda más ancha en comparación con *E. coli* BL21 DE3 pLysS silvestre (carril 2 y 5), la inducida con IPTG 1 mM (carriles 3 y 6), de un peso aproximado de 35.5 kDa, que es el peso esperado para la PLA-BT. Esto sugiere que la enzima recombinante está siendo producida por la cepa hospedera, aunque no en elevadas concentraciones, por lo que deberán optimizarse las condiciones de cultivo y de inducción para incrementar la producción de la enzima.

.8.4 Western blot de la proteína PLA-BT.

La expresión de PLA-BT fue analizada también por western blot, utilizando anticuerpos específicos contra la secuencia de histidinas que queda unida a la proteína recombinante (como marca para la purificación). En la Figura 6.23 se pueden observar dos bandas reveladas por el anticuerpo, una del peso molecular esperado de 35.5 kDa y otra de 71 kDa. Se ha reportado que ciertas fosfolipasas similares a PLA-BT forman dímeros a través de la interacción entre las hojas beta de su estructura, lo que las hace más estables y les permite tener una actividad enzimática más eficiente (Da Mata Madeira *et al.*, 2016). Por lo tanto, se sugiere que la banda de 71 kDa corresponde a los dímeros formados por PLA-BT.

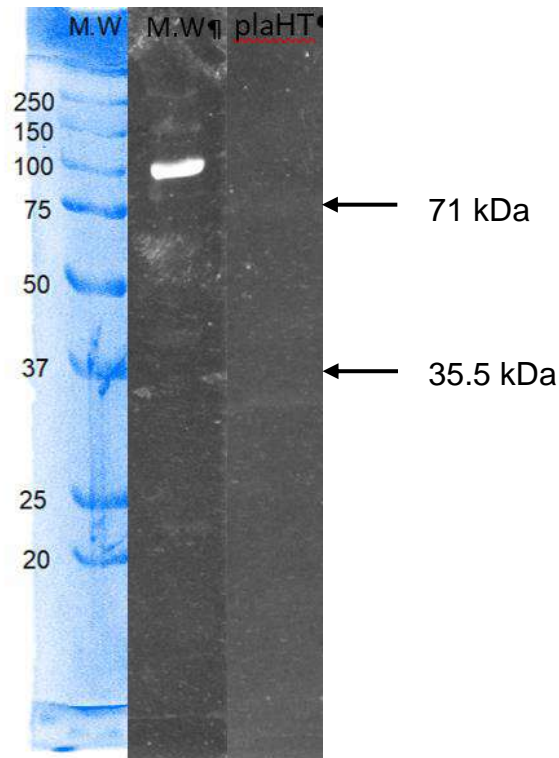


FIGURA 29. Western Blot de las proteínas producidas por BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt*.

En el carril 1: estándares de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards en la SDS-PAGE; Carril 2: estándares de peso molecular en western-blot; Carril 3: bandas reveladas con Ac anti-His.

Con el western-blot se demostró que la BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* sí está sintetizando la proteína recombinante PLA-BT. La baja intensidad de las bandas puede ser debida a la baja concentración de la proteína PLA-BT y a la baja especificidad del anticuerpo anti-His, ya que está dirigido contra la histidina unida al extremo carboxilo terminal, y la PLA-BT tiene unida la cola de histidinas en el extremo amino terminal.

6.8.5 Análisis de la actividad fosfolipasa *in situ*

Una vez que se demostró la producción de la PLA-BT recombinante por Western blot, se realizaron diversas pruebas para detectar la actividad enzimática de las bandas en un zimograma de la SDS-PAGE. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, por lo que se probó la actividad de fosfolipasa en caja Petri del extracto y del debrís celular obtenido después de lisis por sonicación de la BL21 DE3pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt*, al colocarlo en discos de papel filtro sobre una caja de Petri con lecitina. En la Figura 6.24 se puede observar un halo de hidrólisis alrededor del extracto celular de un cultivo inducido con 1 mM de IPTG, mismo que no se observa en los discos que contienen el debrís celular (4), ni en aquellos con el extracto o debrís celular de la cepa silvestre (1 y 2). El cambio de color en el halo se debe a la acidificación del medio resultado de la liberación de ácidos grasos, como producto de la hidrólisis de la lecitina por la PLA-BT recombinante, lo que sugiere la producción de la enzima.

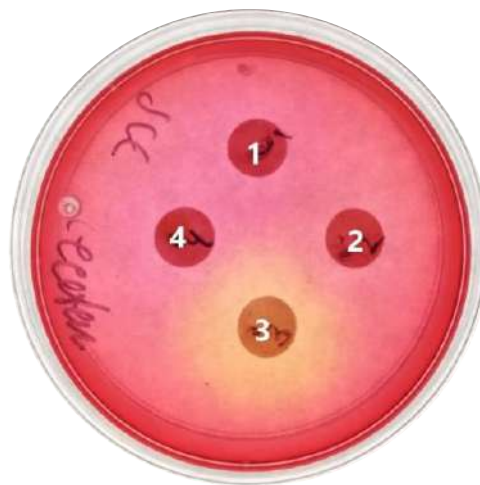


FIGURA 30. Caja LB-YH con lecitina para evaluación de la actividad fosfolipasa

Se muestra el extracto y debris celular de *E. coli* BL21 pLysS (1 y 2, respectivamente) y en el extracto y debris celular de *E. coli* BL21 DE3 pLysS transformada con el vector pET28a (+)-*pla-bt* (3 y 4), después de 24 h de incubación.

6.9 Caracterización de la PLA-BT recombinante en *p*-NP-ésteres.

La fosfolipasa PLA-BT recombinante mostró actividad de hidrólisis de *p*-NP-ésteres, lo que sugiere que, además de la actividad de fosfolipasa, tiene también actividad de lipasa. Utilizando laurato *p*-nitrofenilo (*p*NPL) como sustrato, a 60°C y pH 6.5, PLA-BT tuvo una actividad de 332.7 μ katales.

6.9.2 Determinación de la preferencia de sustrato

Se analizó la preferencia de longitud de cadena del sustrato utilizando *p*-NP-ésteres. Como se observa en la figura 6.25, la actividad más alta se encontró al utilizar el laurato *p*-nitrofenilo (*p*NPL) como sustrato, en un ensayo realizado a pH 6.5 y 60 °C. Sin embargo, faltaría evaluar sustratos de cadena más corta, para definir adecuadamente la preferencia de sustrato.

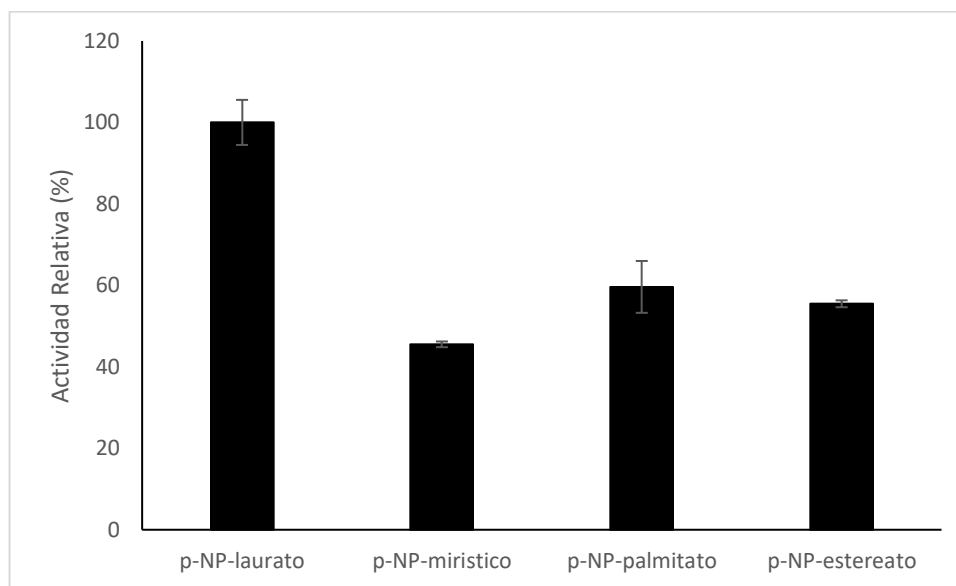


FIGURA 31 Efecto de longitud de cadena en la actividad fosfolipasa de la PLA-BT recombinante

6.9.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de PLA-BT.

La evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad se realizó con laurato *p*-nitrofenilo (*p*NPL) como sustrato, a pH 6.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.26, donde se observa que la PLA-BT recombinante tiene actividad en un amplio rango de temperaturas, ya que tanto a 30°C como a 90°C muestra un 40% de actividad, en relación con la máxima actividad que se encontró a 60 °C. Estos resultados sugieren que la fosfolipasa PLA-BT es termofílica.

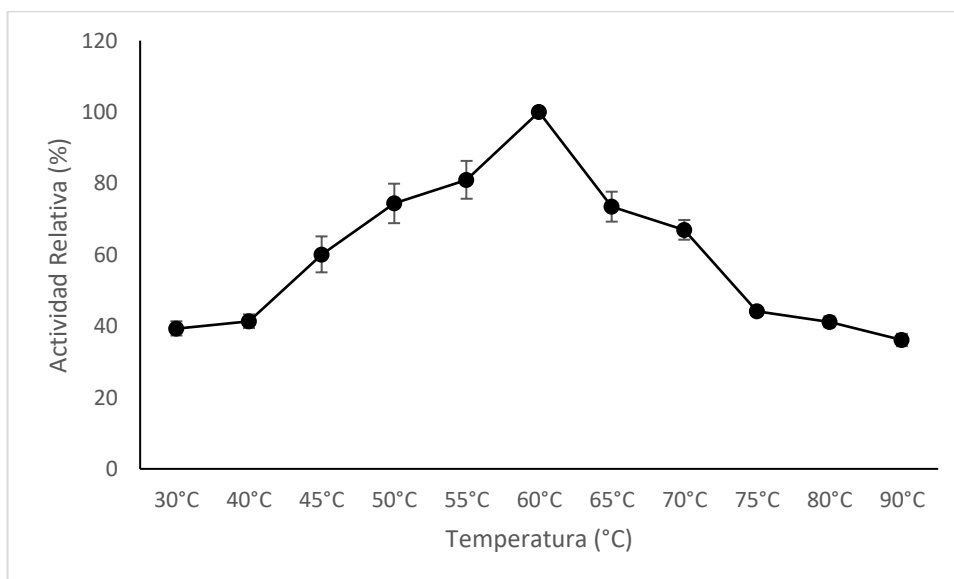


FIGURA 32 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PLA-BT recombinante. El sustrato utilizado fue laurato *p*-nitrofenilo (*p*NPL), a pH 6.5.

6.9.4 Efecto del pH sobre la actividad de PLA-BT.

La evaluación del efecto del pH sobre la actividad se realizó con laurato *p*-nitrofenilo (*p*NPL) como sustrato, a 60 °C. Los resultados se muestran en la Figura 6.27, donde se observa que la PLA-BT tiene actividad desde un pH de 5 hasta pH 10, en el que mantiene un 50% de actividad. La actividad más alta se encontró a pH 8, lo que sugiere que la PLA-BT es una fosfolipasa alcalófila.

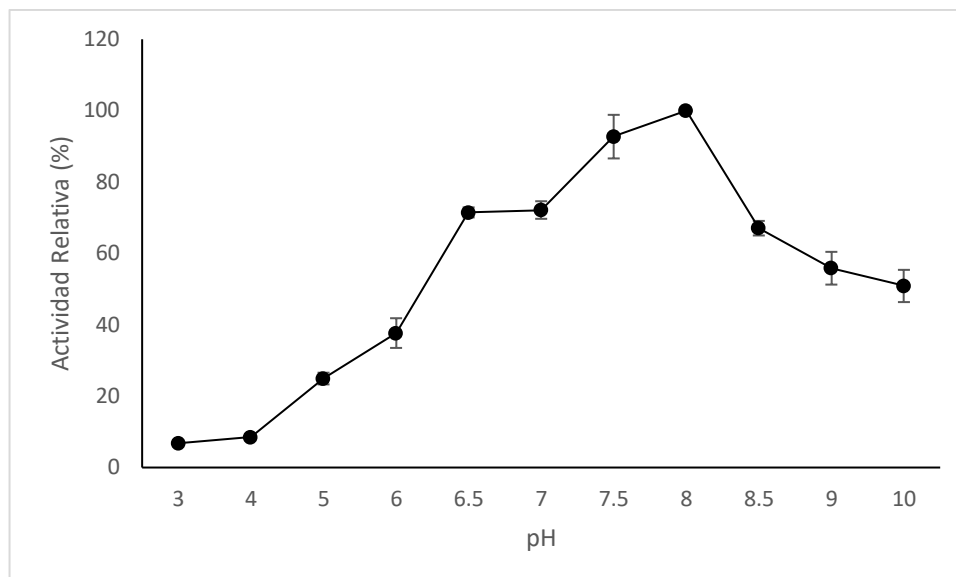


FIGURA 33 Efecto del pH sobre la actividad de PLA-BT recombinante. El sustrato utilizado fue laurato *p*-nitrofenilo (pNPL), a 60°C.

Existen pocos trabajos relacionados con el estudio de las fosfolipasas de termófilos (Tirawongsaroj *et al.*, 2008; Wemheuer *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2015). El primer reporte de caracterización de una fosfolipasa tipo patatina clonada que fue aislada de una bacteria termófila es el de Navas y colaboradores (2017), que describe una fosfolipasa B con actividad óptima a 65°C y pH 9 proveniente de *Thermus sp.* La PLA-BT del presente trabajo es también una fosfolipasa tipo patatina, con temperatura y pH óptimo similar (60 °C, pH 8), con un sitio activo formado por una diada catalítica que no es común en las enzimas lipolíticas, y que posiblemente forme dímeros en su forma más activa y estable, como lo reporta Da Mata Madeira y colaboradores (2016) en una fosfolipasa mesófila (PlpD) de *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo anterior, resultará de interés el profundizar en el estudio de la fosfolipasa PLA-BT tanto desde el punto de vista bioquímico para ampliar el conocimiento de sus capacidades catalíticas y de la organización de su estructura, como desde sus aplicaciones biotecnológicas.

7. CONCLUSIONES

Del genoma de *Brevibacillus thermoruber* HT42 se eligieron dos genes: el gen de una posible fosfolipasa A₂ similar a patatina y el de una posible fosfolipasa C.

De acuerdo al modelado *in silico*, la PLC-BT es una proteína integral de membrana, en la que no se pudo identificar la estructura tridimensional ni el sitio activo característico de las fosfolipasas.

De acuerdo al análisis *in silico*, la PLA-BT posee la estructura tridimensional característico de enzimas lipolíticas, se identificó el canal oxianión y un sitio activo formado una diada catalítica (Ser38-Asp183) que corresponde a ciertas fosfolipasas citolíticas, además en el análisis de interacción proteína-proteína, se infiere que posee una función relacionada con la remodelación de la membrana durante la división celular y la formación de esporas.

El gen *pla-ht* se logró clonar y expresar exitosamente en *E. coli* BL21 DE3 *pLysS*, aunque no se obtuvo una sobreexpresión de la enzima recombinante.

La proteína recombinante PLA-BT es una fosfolipasa termófila (60°C) y alcalófila (pH 8) con un peso de 35.5 kDa que forma dímeros y con preferencia por sustratos de cadena media.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Adrio, J. L., y Demain, A. L. 2005. Microbial Cells and Enzymes A Century of Progress. *Enzyme Microb. Technol.* Humana Press pp. 1-27.
- Adrio, J. L., y Demain, A. L. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomol.* 4(1): 117-139.
- Aloulou, A., Ali, Y. B., Bezzine, S., Gargouri, Y., y Gelb, M. H. 2012. Phospholipases: an overview. In Lipases and phospholipases. *Humana Press.* pp. 63-85.
- Andrade, C. M., Pereira Jr, N., y Antranikian, G. 1999. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Microbiol.* 30(4): 287-298.
- Aoki, J., Nagai, Y., Hosono, H., Inoue, K., y Arai, H. 2002. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. of Lipids*, 1582(1): 26-32.
- Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N., y Arai, H. 2007. Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie.* 89(2): 197-204.
- Arima, N., Inoue, A., Makide, K., Nonaka, T., y Aoki, J. 2012. Surface loops of extracellular phospholipase A1 determine both substrate specificity and preference for lysophospholipids. *J. Lipid Res.* 53(3): 513-521.
- Basics, S. 2009. Serial Cloner URL: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html.
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Söding, J., y Lupas, A. N. 2006. The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 34(suppl_2): 335-339.
- Borrelli, G. M., y Trono, D. 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *IJMS.* 16(9): 20774-20840.
- Burke, J. E., y Dennis, E. A. 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50(Supplement): S237-S242.

- Castello, P., Jollet, S., Potus, J., Baret, J. L., y Nicolas, J. 1998. Effect of exogenous lipase on dough lipids during mixing of wheat flours. *Cereal Chem.* 75(5): 595-601.
- Chen, S. C., Wright, L. C., Golding, J. C., Y Sorrell, T. C. 2000. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochem. J.* 347(2): 431-439.
- Clausen, K. 2001. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase. *Eur J Lipid Sci Technol.* 103(6): 333-340.
- Coker, J. A. 2016. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000 Res.* 5.
- Contardi, ANGELO y Ercoli, A. 1933. Über die enzymatische Spaltung der Lecithine und Lysocithine. *Biochem. Z.* 261: 275-302.
- Consortium, U. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43(D1): 204-212.
- Da Mata Madeira, P. V., Zouhir, S., Basso, P., Neves, D., Laubier, A., Salacha, R., ... y Dessen, A. 2016. Structural basis of lipid targeting and destruction by the type V secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Mol.Biol.* 428(9): 1790-1803.
- DeLano, W. L. 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on protein crystallography.* 40(1): 82-92.
- De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K. M., Svendsen, A., y Patkar, S. 2007. Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(2): 290-300.
- Dennis E. A. 1983. Fosfolipasas. En *Las Enzimas*. P. Boyer, editor. *Academic Press*. Nueva York, 16(3): 307-53.
- Dennis, E. A., Rhee, S. G., Billah, M. M., y Hannun, Y. A. 1991. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *The FASEB J.* 5(7): 2068-2077.

Dennis, E. A. 2015. Introduction to thematic review series: phospholipases: central role in lipid signaling and disease. *J. Lipid Res.* 56(7): 1245-1247.

Dumorne, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M., y Renganathan, P. 2017. Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(4): 649-659.

Elleuche, S., Schroeder, C., Sahm, K., y Antranikian, G. 2014. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29: 116-123.

Fanani, M. L., y Maggio, B. 1997. Mutual modulation of sphingomyelinase and phospholipase A2 activities against mixed lipid monolayers by their lipid intermediates and glycosphingolipids. *Mol. Membr. Biol.* 14(1): 25-29.

Farn, J. L., Strugnell, R. A., Hoyne, P. A., Michalski, W. P., y Tennent, J. M. 2001. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* 183(22): 6717-6720.

Finn, R., Griffiths-Jones, S., y Bateman, A. 2003. Identifying protein domains with the Pfam database. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 1(1): 2-5.

Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Deeg, M., Bartmann, P., y Neumeister, B. 2000. Novel Phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J. Bacteriol.* 182(5): 1321-1327.

Fudim, R., Szczepek, M., Vierock, J., Vogt, A., Schmidt, A., Kleinau, G., ... & Hegemann, P. 2019. Design of a light-gated proton channel based on the crystal structure of coccomyxa rhodopsin. *Sci. Signal.* 12(573): eaav4203.

Galliard, T. 1971. The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers. *Biochem. J.* 121(3): 379-390.

Ganendren, R., Carter, E., Sorrell, T., Widmer, F., y Wright, L. 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect.* 8(4): 1006-1015.

- Givskov, M., Olsen, L., y Molin, S. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*. *J. Bacteriol.* 170(12): 5855-5862.
- Gresset, A., Sondek, J., y Harden, T. K. 2012. The phospholipase C isozymes and their regulation. In *Phosphoinositides I: Enzymes of Synthesis and Degradation*. Springer. Dordrecht. pp. 61-94.
- Goddard, T. D., Huang, C. C., y Ferrin, T. E. 2007. Visualizing density maps with UCSF Chimera. *J. Struct. Biol.* 157(1): 281-287.
- Gomes, J., y Steiner, W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Trends Food Sci Technol.* 42(4): 223-235.
- Haas, E., y Stanley, D. 2007. Phospholipases. Xpharm: *The Comprehensive Pharmacology Reference*. 1-3. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-008055232-3.63043-0>
- Hiraoka, M., Abe, A., y Shayman, J. A. 2002. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. *J. Biol. Chem.* 277(12): 10090-10099.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., ... y Finn, R. D. 2008. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res.* 37(suppl_1): D211-D215.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., y Okada, K. 2001. The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 13(10): 2191-2209.
- Johnson, C. E., y Bonventre, P. F. 1967. Lethal toxin of *Bacillus cereus* I. relationships and nature of toxin, hemolysin, and phospholipase. *J. Bacteriol.* 94(2): 306-316.
- Junko, S., Tadayoshi, O., y Kuniyoshi, S. 1980. Studies of a phospholipase B from *Penicillium notatum* substrate specificity and properties of active site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism.* 620(3): 372-386.

- Källberg, M., Margaryan, G., Wang, S., Ma, J., y Xu, J. 2014. RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling. In Protein Structure Prediction. *Humana Press*. New York, NY. pp. 17-27.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., y Sternberg, M. J. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10(6): 845.
- Kim, D. E., Chivian, D., y Baker, D. 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 32(suppl_2): W526-W531.
- Kolesnikov, Y. S., Nokhrina, K. P., Kretynin, S. V., Volotovskii, I. D., Martinec, J., Romanov, G. A., y Kravets, V. S. 2012. Molecular structure of phospholipase D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochemistry*. (Moscow), 77(1): 1-14.
- Koga, Y. 2012. Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea*. 2012.
- Köhler, G. A., Brenot, A., Haas-Stapleton, E., Agabian, N., Deva, R., y Nigam, S. 2006. Phospholipase A 2 and phospholipase B activities in fungi. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 1761(11): 1391-1399.
- Kumar, A., y Singh, S. 2013. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33(4): 365-378.
- Leis, B., Angelov, A., Mientus, M., Li, H., Pham, V. T., Lauinger, B., ... y Liebl, W. 2015. Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Front. Microbiol.* 6: 275.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., y Tang, X. 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.* 345(Pt 3): 401.
- Madigan, M., y Mairs, B. 1997. *Extremophiles*. *Sci Am*, 276(5).
- Margulis, L. 2007. Review: The Third Domain: The untold story of Archaea and the future of biotechnology by Tim Friend. *New Scientist*. 195(2619): 50. [http://dx.doi.org/10.1016/s0262-4079\(07\)62219-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0262-4079(07)62219-2)

- McDermott, M., Wakelam, M. J., y Morris, A. J. 2004. Phospholipase d. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 82(1): 225-253.
- McElroy, R. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosyst. Eng.* 6(1): 74-75.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., y Jones, D. T. 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* 16(4): 404-405.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., & Ghiorse, W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 4715-4724.
- Mine, Y. (1997). Structural and functional changes of hen's egg yolk low-density lipoproteins with phospholipase A2. *J. Agric. Food Chem.* 45(12), 4558-4563.
- Morozkina, E. V., et al. 2010. "Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review)." *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya.* 46.1: 5-20.
- Mount, D. W. 2007. Using the basic local alignment search tool (BLAST). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2007(7): pdb-top17.
- Nebesny, E., Rosicka, J., y Pierzgalski, T. 1998. Enzymatic hydrolysis of wheat starch into glucose. *Starch-Stärke.* 50(8): 337-341.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., y Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(6): 711-729.
- Nielsen EW. 2004. Principles of cheese production. In: Hui YH, Meunier-Goddik L, Solvejg Hansen Å, Josephsen J, Nip WK, Stanfield PS, Toldra F (eds) *Handbook of food and beverage fermentation technology.* New York, pp 221–239.
- Nielsen, H. 2017. Predicting secretory proteins with SignalP. In Protein function prediction *Humana Press.* New York, NY. (pp. 59-73).
- Nishijima, M., Akamatsu, Y., y Nojima, S. 1974. Purification and properties of a membrane-bound phospholipase A1 from *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 249(17): 5658-5667.

- Subbaiah, P. V., y Ganguly, J. 1970. Studies on the phospholipases of rat intestinal mucosa. *Biochem. J.* 118(2): 233-239.
- Oliart-Ros, R., Sánchez-Otero, M. and Manresa-Presas, Á. 2016. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT.* 11(1): 79.
- Parasuraman, S. 2012. Protein data bank. *J Pharmacol Pharmacother.* 3(4): 351.
- Patricbrc.org. 2020. PATRIC. [En línea] Disponible en :<https://www.patricbrc.org> [Acceso 17 junio 2020].
- Pelley, J. 2012. Metabolism of Steroids and Other Lipids. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry* 89-98. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-07446-9.00011-8>
- Pennisi, E. 1997. Biotechnology: in industry, *extremophiles begin to make their mark.*
- Peng, J., y Xu, J. 2011. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins.* 79(S10): 161-171
- Ramírez, N., Serrano, J. A., y Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *RMCF.* 37(3).
- Raybin, D. M., Bertsch, L. L., y Kornberg, A. 1972. Phospholipase in *Bacillus megaterium* unique to spores and sporangia. *Biochem.,* 11(10): 1754-1760.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., ... & Tiong, C. L. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6): 2541-2547.
- Rossi, M., Ciaramella, M., Cannio, R., Pisani, F. M., Moracci, M., y Bartolucci, S. 2003. Extremophiles 2002. *J. Bacteriol.* 185(13): 3683-3689.
- Rothschild, L., y Mancinelli, R. 2001. Life in extreme environments. *Nat.* 409(6823): 1092-1101.

- Roy, A., Kucukural, A., y Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5(4): 725.
- Richmond, G. S., y Smith, T. K. 2011. Phospholipases A1. *Int. J. Mol. Sci.* 12(1): 588-612.
- Saito, K. 2014. Reminiscence of phospholipase B in *Penicillium notatum*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B*, 90(9): 333-346.
- Scandella, C. J., y Kornberg, A. 1971. Membrane-bound phospholipase A1 purified from *Escherichia coli*. *Biochem.* 10(24): 4447-4456.
- Schaloske, R. H., y Dennis, E. A. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 1761(11): 1246-1259.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(3): 303-310.
- Selvy, P. E., Lavieri, R. R., Lindsley, C. W., y Brown, H. A. 2011. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem. Rev.* 111(10): 6064-6119.
- Seo, K. H., & Rhee, J. I. 2004. High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnol. Lett.* 26(19): 1475-1479.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., y Komagata, K. 1996. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46(4): 939-946.
- Shimizu, T., Ohto, T., y Kita, Y. 2006. Cytosolic phospholipase A2: biochemical properties and physiological roles. *IUBMB life.* 58(5-6): 328-333.
- Six, D. A., y Dennis, E. A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 1488(1-2): 1-19.

Song, J. K., Kim, M. K., & Rhee, J. S. 1999. Cloning and expression of the gene encoding phospholipase A1 from *Serratia* sp. MK1 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 72(1-2): 103-114.

Szumilo, M., y Rahden-Staroń, I. 2008. Biological role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mammalian cells. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. (Online), 62: 593-598.

Télliez-Espino, E., Trejo-Estrada, S., Cerna-Hernández, C., Plascencia-Espinosa, M., Hidalgo-Lara, M., y Sosa-Peinado, A. 2017. *Brevibacillus Thermoruber* 9X-GLC, Bacteria Isolated from Hot Compost, Producer of a Beta-Glucosidase Resistant to Glucose Inhibition. *Am J Biochem Biotechnol.* 13(4): 157-166.

Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., ... y Eurwilaichitr, L. 2008. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J. Biotechnol.* 133(1): 42-49.

Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., y Liang, J. 2018. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* 46(W1): W363-W367.

UniProt Consortium. 2018. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 46(5): 2699.

Van den Bosch, H., Aarsman, A. J., y Van Deenen, L. L. M. 1974. Isolation and properties of a phospholipase A1 activity from beef pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism.* 348(2): 197-209.

Van Den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(3): 213-218.

Verlotta, A., Liberatore, M. T., Cattivelli, L., y Trono, D. 2013. Secretory phospholipases A2 in durum wheat (*Triticum durum* Desf.): gene expression, enzymatic activity, and relation to drought stress adaptation. *Int. J. Mol. Sci.* 14(3): 5146-5169.

Waite, M. 1996. Phospholipases. *In New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier. 31, pp. 211-236)

Wei, T., Xu, C., Yu, X., Jia, W., Yang, K., Jia, C., y Mao, D. 2015. Characterization of a novel thermophilic phospholipase B from *Thermotoga lettingae* TMO: applicability in enzymatic degumming of vegetable oils. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42(4): 515-522.

Witt, W., Mertsching, A., y König, E. 1984. Secretion of phospholipase B from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*.795(1): 117-124.

Wilton, D. C., y Waite, M. 2002. Chapter 11 Phospholipases. *New Comprehensive Biochemistry*. pp 291–314. doi:10.1016/s0167-7306(02)36013-7

Wright, L. C., Payne, J., Santangelo, R. T., Simpanya, M. F., Chen, S. C., Widmer, F., y Sorrell, T. C. 2004. Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. *Biochem. J.* 384(2): 377-384.

Yang, J., Wang, Y., y Zhang, Y. 2016. ResQ: an approach to unified estimation of B-factor and residue-specific error in protein structure prediction. *J. Mol. Biol.* 428(4): 693-701.

Yildiz, S. Y., Kambourova, M., Arga, K. Y., y Oner, E. T. 2013. Draft genome sequence of exopolysaccharide-producing thermophilic bacterium *Brevibacillus thermoruber* strain 423. *Genome Announc.* 1(5): e00774-13.

Zhang, Y. 2009. I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins*. 77(S9): 100-113.

8 APÉNDICES

Apéndice A

Secuencia generada por del Instituto de Biotecnología de la UNAM del gen *pla-bt* (975 pb).

```
TTGTGGAAATTCCCAWTAGAAGGCGGACGCGGTGTTYGAGSGCRRRCRKSGKGMR
ARGGWTCGCCTTTATCGGGGCGCTGCAGGTGATGGAGGAGCACGGCTATACGTG
GGCGAACCTGGCCGGCACGTCCGGCGGGCTCGTTTGTCCGCTCTGCTCGGGGC
GGGCTACAAGAGCGGAGAGATCAGGCCCGTGTGTTGAGCGGCTCGACTATCTGCA
CTTTCTCGAGCGGCGCGGCATCGGACGGCTGCCGGTCATCGGCCCCCTGTACGA
ACTGATGGTGCGGCAGGGAATGTACCGGACCAACCGGATTGAGCGGTTTATGGAC
GAATTGTTGAGGAGAAAAGGCATCCGCACCTTCGGGGACCTGCCGCCGGGTAAG
CTCAGGATCATCGCGTCCGACATCACGGCGGGAAAATGCTGGTCCTGCCGGAC
GATCTCGTCCAGTTTGACATCGTCCCGGAAGAATTCCCATCGCCCGGGCCGTCC
GCATGTCGTGCTCGCTCCCGTATTTCTTTCAGCCGGTCCGGTTGGAGCAGAACGG
GGAACCGCACTATATCGTGGACGGCGGGCTGCTGAGCAACTATCCGGTCTGGTTG
TTCGACGTTCCCGGAAAACCGCGCTGGCCGACGATCGGGTTTCGGCTGCACGGC
AAACGGGTGGAGCGGGAACCGTACCGGATCCGGGGACTTTTTTCTTCTCCCGCA
GTCTGATCACCACGATGCTGGACGCCACGACCGGCTGTATGTGGAGAGGGCGC
AGGCGGTGCGGACGGTCTTCATTCCCACGCTGGGGGTGCGGACCACGCAGTTCCG
GCCTCTCGCCCGAACTGCGCGCGTCCCTGCTTCGTTCCGGGGAGGAGGCGGCCC
GGCAGTTTCTGGCCAAATGGAACCTCGAGCAGTACGTGAAGTGTTCGCAGCAT
ACCGCCTGCGCCAAWCGRAAAAACAGGCTGCCTCGTATAGAAAGCTTGGGA
```

Alineación de la Secuencia de la fosfolipasa A₂ (Seq_1 1) con el producto de la secuenciación del gen *pla-bt* (Seq_2 1).

Alignment of Sequence_1: [Sequence Window #2] with Sequence_2: [Untitled Sequence #1]

Similarity : 932/960 (97.08 %)

```
Seq_1 1 -----AT-----GAAGGCGGACGCGGTGTTTGAAGGCGGGGGTAAAGGGATC 45
          ||          |||
Seq_2 1 TTGTGGAAATTCCCATAGAAAGGCGGACGCGGTGTT-GAGGCCGAGG-----TC 48

Seq_1 46 GCCTTTATCGGGGCGCTGCAGGTGATGGAGGAGCACGGCTATACGTGGGCGAACCTGGCC 105
          |||
Seq_2 49 GCCTTTATCGGGGCGCTGCAGGTGATGGAGGAGCACGGCTATACGTGGGCGAACCTGGCC 108

Seq_1 106 GGCACGTCGGCGGGCTCGTTTGTCCGCTCTGCTCGGGGCGGGCTACAAGAGCGGAGAG 165
          |||
Seq_2 109 GGCACGTCGGCGGGCTCGTTTGTCCGCTCTGCTCGGGGCGGGCTACAAGAGCGGAGAG 168

Seq_1 166 ATCAGGCCCGTGTGTTGAGCGGCTCGACTATCTGCACTTTCTCGAGCGGCGGCATCGGA 225
```

Seq_2	169	 ATCAGGCCCGTGTTTGAGCGGCTCGACTATCTGCACTTTCTCGAGCGGCGGGCATCGGA	228
Seq_1	226	CGGCTGCCGGTCATCGGCCCCCTGTACGAAGTATGGTGCAGGGAATGTACCGGACC	285
Seq_2	229	 CGGCTGCCGGTCATCGGCCCCCTGTACGAAGTATGGTGCAGGGAATGTACCGGACC	288
Seq_1	286	AACCGGATTGAGCGGTTTATGGACGAATTGTTGAGGAGAAAAGGCATCCGCACCTTCGGG	345
Seq_2	289	 AACCGGATTGAGCGGTTTATGGACGAATTGTTGAGGAGAAAAGGCATCCGCACCTTCGGG	348
Seq_1	346	GACCTGCCGCCGGTAAGCTCAGGATCATCGCGTCCGACATCACGGCGGGAAAAATGCTG	405
Seq_2	349	 GACCTGCCGCCGGTAAGCTCAGGATCATCGCGTCCGACATCACGGCGGGAAAAATGCTG	408
Seq_1	406	GTCCTGCCGGACGATCTCGTCCAGTTTGACATCGTCCCAGGAAGTATCCCATCGCCCGG	465
Seq_2	409	 GTCCTGCCGGACGATCTCGTCCAGTTTGACATCGTCCCAGGAAGTATCCCATCGCCCGG	468
Seq_1	466	GCCGTCCGCATGTCGTGCTCGCTCCCGTATTTCTTTCAGCCGGTCCGGTTGGAGCAGAAC	525
Seq_2	469	 GCCGTCCGCATGTCGTGCTCGCTCCCGTATTTCTTTCAGCCGGTCCGGTTGGAGCAGAAC	528
Seq_1	526	GGGGAACCGCACTATATCGTGGACGGCGGGCTGCTGAGCAACTATCCGGTCTGGTTGTTT	585
Seq_2	529	 GGGGAACCGCACTATATCGTGGACGGCGGGCTGCTGAGCAACTATCCGGTCTGGTTGTTT	588
Seq_1	586	GACGTTCCCGGAAAACCGCGCTGGCCGACGATCGGGTTTCGGCTGCACGGCAAACGGGTG	645
Seq_2	589	 GACGTTCCCGGAAAACCGCGCTGGCCGACGATCGGGTTTCGGCTGCACGGCAAACGGGTG	648
Seq_1	646	GAGCGGGAACCGTACCGGATCCGGGACTTTTTTCGTTCTCCCGCAGTCTGATCACCACG	705
Seq_2	649	 GAGCGGGAACCGTACCGGATCCGGGACTTTTTTCGTTCTCCCGCAGTCTGATCACCACG	708
Seq_1	706	ATGCTGGACGCCACGACCGGCTGTATGTGGAGAGGGCGCAGGCGGTGCGGACGGTCTTC	765
Seq_2	709	 ATGCTGGACGCCACGACCGGCTGTATGTGGAGAGGGCGCAGGCGGTGCGGACGGTCTTC	768
Seq_1	766	ATTCCCACGCTGGGGGTGCGGACCACGCAGTTCGGCCTCTCGCCGAACTGCGCGGTCC	825
Seq_2	769	 ATTCCCACGCTGGGGGTGCGGACCACGCAGTTCGGCCTCTCGCCGAACTGCGCGGTCC	828
Seq_1	826	CTGCTTCGTTTCGGGGGAGGAGGCGCCCGGCAGTTTCTGGCCAAATGGAACCTCGAGCAG	885
Seq_2	829	 CTGCTTCGTTTCGGGGGAGGAGGCGCCCGGCAGTTTCTGGCCAAATGGAACCTCGAGCAG	888
Seq_1	886	TACGTCGAAGTGTTTCGCAGCATAACCGCTGCGCCAAACGAAAAACAGGCTGCCTCGTA	945
Seq_2	889	 TACGTCGAAGTGTTTCGCAGCATAACCGCTGCGCCAA-CG-AAAAAACAGGCTGCCTCGTA	946

Apéndice B

Soluciones utilizadas para realizar el Wester Blot con Fosfatasa alcalina conjugada (AP)

Buffer de transferencia 10X (1L)

Tris 40mM

Glicina 39mM

SDS 0.037%

Al volumen final 20% de metanol.

PBS 10X (1L) 80 g NaCl

2 g Na₂HPO₄

2 g KCl

Ajustar a pH de 7.3

TBS 10X (1L)

0.01M TRIS

80 g NaCl

Ajustar pH 7.5

TBS-T 1X (1L)

TBS 10X-100mL

899 mL de agua destilada

1 mL de Tween 20

Solución Bloqueadora.

PBS al 1% + 5% de leche sin grasa w/v

Solucion de dilución.

TBST + 1% de leche sin grasa

2 µL de Anticuerpo anti-His tag