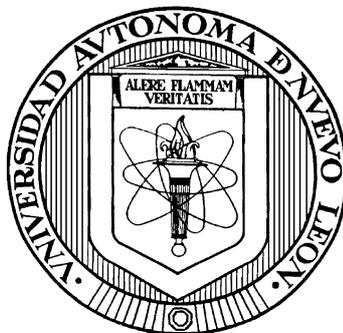


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ESTERASA
DEL ACIDO FERÚLICO DE *BACILLUS FLEXUS* NJY2 AISLADO
DEL NEJAYOTE DE MAÍZ**

Por:

EDGAR ALLAN BLANCO GÁMEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Industrial

2012

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Microorganismos alcalófilos	1
1.1.1 Mecanismo de sobrevivencia de microorganismos alcalófilos ..	2
1.1.2 Nejayote	4
1.2 Enzimas alcalinas	5
1.2.1 Esterasas	6
1.2.2 Esterasas del ácido ferúlico	7
1.2.3 Clasificación de las esterazas del ácido ferúlico	8
1.2.4 Nomenclatura de esterazas del ácido ferúlico	10
1.2.5 Principales fuentes de esterazas del ácido ferúlico	11
1.2.6 Mecanismo de acción de esterazas	15
1.2.7 Importancia de las esterazas del ácido ferúlico en la industria..	17
1.3 Microorganismos aislados del nejayote de maíz.	20
1.4 Optimización de producción de enzimas.....	21
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1 Hipótesis	23
2.2 Objetivo General	23
2.3 Objetivos específicos	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Materiales y equipos	25
3.1.1 Material biológico	25
3.1.2 Material químico	25

3.1.3 Material y equipo de laboratorio	26
3.2 Conservación de los microorganismos	27
3.2.1 Crecimiento de los microorganismos.....	28
3.3 .1 Identificación molecular de los microorganismos	28
3.3.2 Identificación bioquímica de los microorganismos	29
3.3.3 Estudios de tolerancia a pH, temperatura y NaCl.....	29
3.4 Análisis de actividad de la enzima esterasa del ácido ferúlico.....	31
3.4 .1 Determinación cualitativa de la actividad esterasa del ácido ferúlico ...	31
3.4.2 Cuantificación de proteína	32
3.4.3 Ubicación de la actividad enzimática	33
3.4.3.1 Preparación de células de <i>B. flexus</i> NJY2 en reposo metabólico	33
3.4.3.2 Preparación de enzima extracelular de <i>B. flexus</i> NJY2	33
3.4.4 Efecto del pH sobre la actividad esterases del ácido ferúlico	34
3.4.5 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de la esterasa del ácido ferúlico de <i>B. flexus</i> NJY2	34
3.5 Extracción de la enzima esterasa asociada a células.....	35
3.5.1 Ruptura mecánica de células de <i>B. flexus</i> NJY2	35
3.5.2 Extracción de enzima con SDS al 10%	36
3.6 Separación de proteínas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes	37
3.6.1 Tinción de geles de acrilamida	38
3.6.2 Zimograma con etilferulato.....	
3.7 Diseño de experimentos para la optimización en la producción de esterases del ácido ferúlico por <i>B. flexus</i> NJY2	39
3.8 Disposición de residuos	42

4 RESULTADOS	44
4.1 Identificación molecular de los microorganismos	44
4.2 Caracterización bioquímica de los microorganismos	47
4.2.1 Pruebas bioquímicas	47
4.2.2 Determinación de actividad hidrolítica	47
4.2.3 Estudio del crecimiento de <i>B. flexus</i> NJY2 y NJY4	48
4.2.4 Determinación cualitativa de la actividad esterasa del ácido ferúlico	50
4.3.1 Ubicación de la actividad enzimática	50
4.3.2 Efecto del pH en la actividad enzimática	51
4.3.3 Efecto de la fuente de carbono en la producción de la esterasa del ácido ferúlico	53
4.4 Determinación de la masa molecular de la esterasa del ácido ferúlico ..	54
4.5 Optimización de la producción de la esterasa del ácido ferúlico de <i>B. flexus</i> NJY2	55
4.5.1 Análisis del crecimiento de <i>B. flexus</i>	55
4.5.2 Análisis de la actividad enzimática del <i>B. flexus</i>	60
5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
6 CONCLUSIONES	74
ANEXO 1 Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic Bacillus flexus strains from maize processing waste water (nejayote)	75
ANEXO 2. Statistical optimization of culture media for the production of a cell associated ferulic acid esterase from <i>Bacillus flexus</i> NJY2.....	76
BIBLIOGRAFIA	77

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Principales esterasas del ácido ferúlico de origen fúngico	13
II. Principales esterasas del ácido ferúlico de origen bacteriano.....	14
III. Pruebas bioquímicas realizadas	30
IV. Componentes para la preparación de geles de poliacrilamida.....	37
V. Codificación del diseño de experimentos de superficie de respuesta de diseño central compuesto....	39
VI. Resultado de las pruebas bioquímicas de <i>B. flexus</i> NJY2 y NJY4.....	46
VII. Resultados del estudio de tolerancia a NaCl, pH y temperatura	49
VIII. Promedio de las velocidades específicas máximas de crecimiento en cada tratamiento.....	58
IX Análisis de varianza de los resultados de crecimiento y actividad.....	59
X. Máxima actividad EAF de cada tratamiento	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Mecanismo de regulación del sodio en la membrana celular	2
2.	Reacción general de las esterasas	6
3.	Xilano, polímero presente en la pared celular de los vegetales y las principales enzimas hidrolíticas	7
4.	Ácido ferúlico	18
5.	Liberación del Acido Ferúlico a partir del pericarpio de maíz por <i>B. flexus</i> NJY2	21
6.	Árbol filogenético que muestra las relaciones taxonómicas de los microorganismos aislados del nejayote con cepas tipo	45
7.	Determinación cualitativa de actividad enzimática en <i>B. flexus</i> NJY2.....	50
8.	Efecto del pH en el comportamiento de la enzima asociada a células	52
9.	Efecto del pH en el comportamiento de la enzima extracelular	52
10.	Efecto de la fuente de carbono en la producción de esterasas del ácido ferúlico por <i>B. flexus</i> NJY2	53
11.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en tris/glicina	55
12.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en tricina	55
13.	Cinética de crecimiento de <i>B. flexus</i> NJY2 en medios de cultivo con extracto de levadura como fuente de nitrógeno	56
14.	Cinética de crecimiento de <i>B. flexus</i> en medios de cultivo con peptona de caseína como fuente de nitrógeno	57
15.	Superficie de respuesta de los tratamientos con extracto de levadura	62
16.	Superficie de respuesta de los tratamientos con peptona de caseína	63
17.	Gráfica de valores estimados contra observados de actividad enzimática	64
18. (a y b)	Representación de la pared celular de <i>B. flexus</i> NJY2 desarrollada en medio neutro.	69
16. (c)	Representación de la pared celular de <i>B. flexus</i> NJY2 desarrollada en medio alcalino	70

NOMENCLATURA

pH	Potencial de hidrógeno
EAF	Esterasa del ácido ferúlico
AF	Acido ferúlico
kDa	kilodalton
pI	Punto isoeléctrico
°C	Grado centígrado
His	Histidina
Ser	Serina
Asp	Aspartato
MFA	Metilferulato
MpCA	Metil para-coumarato
MCA	Metil cafeato
MSA	Metil sinapato
FAX	Feruloil arabinosilano
MUTMAC	-Cloruro de Metilumbelliferuloil-7-(p-trimetilamonioicinamato
kGPM	Kilogramo pericarpio maíz
gAF	Gramo de ácido ferúlico
h	Hora
SDS	Dodecil sulfato de sodio
g/L	Gramo por litro
rpm	Revoluciones por minuto
DMF	N,N-Dimetilformamida
mg/mL	Miligramo por mililitro

v/v	Volume/volumen
p-NFF	p- nitrofenil ferulato
DMSO	Dimetilsufóxido
MOPS	Ácido 3- N-morfolinpropanesulfónico
μL	Microlitro
ϵ	Coefficiente de extinción molar
M^{-1}	Moles $^{-1}$
cm^{-1}	Centímetros $^{-1}$
U	Unidad enzimática
mL	Mililitro
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TEMED	Tetrametiletilendiamino
APS	Persulfato de amonio
p/v	Peso/volumen
lb/in^2	Libra sobre pulgada cuadrada
mU/mg	Miliunidades / miligramos
$\mu\text{máx}$	Velocidad específica de crecimiento máxima

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Microorganismos alcalófilos

Los microorganismos alcalófilos son aquellos que requieren de un pH alcalino entre 8 y 10 para su sobrevivencia, mientras que los alcalófilos facultativos son organismos con un pH óptimo de crecimiento de 8 a 10, pero que tiene la capacidad de desarrollarse en ambientes cercanos a la neutralidad. Microorganismos con estas características son de gran interés por su capacidad de producir y liberar enzimas activas en estas condiciones extremas de pH.¹

Para sobrevivir en ambientes hostiles, los microorganismos recurren a un amplio repertorio de herramientas que les permiten desarrollarse y ser totalmente funcionales bajo estas condiciones. La mayoría de las estrategias de sobrevivencia tienen relación con la regulación del ion Na^+ .²

1.1.1 Mecanismo de supervivencia a pH alcalino por microorganismos alcalófilos facultativos

En los microorganismos alcalófilos extremos, diversos mecanismos estructurales, fisiológicos, metabólicos y bioenergéticos se ponen en funcionamiento para su supervivencia. Sin embargo, en los alcalófilos facultativos, estos mecanismos pueden estar presentes aun cuando el microorganismo no se encuentra en condiciones extremas.

Uno de estos mecanismos está basado en la capacidad que presenta la membrana celular de regular el intercambio de los iones H^+ y Na^+ hacia o desde el exterior de la célula mediante el uso de antiportadores que pueden ser específicos para uno o ambos iones (Figura 1).

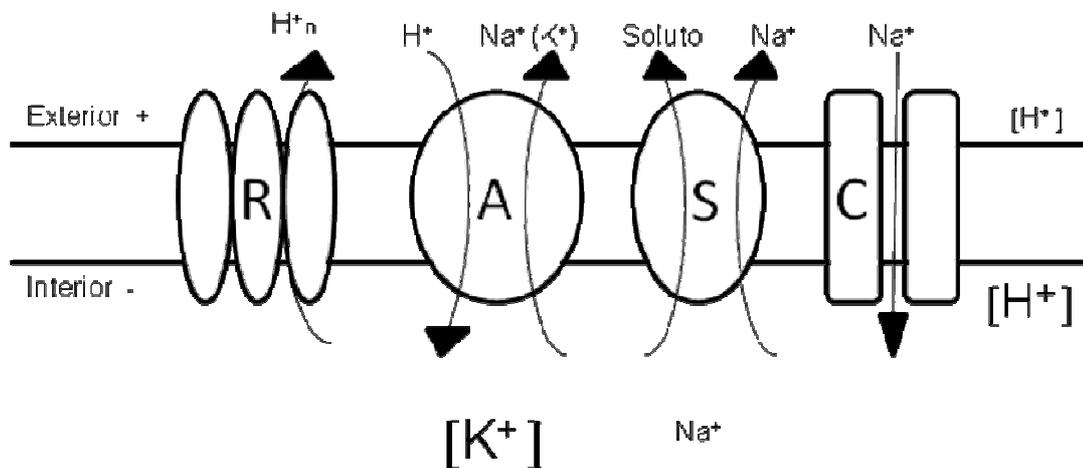


Figura 1. Mecanismo de regulación del sodio en la membrana celular.
R-Cadena respiratoria. A-Antiportador de iones monovalentes. S-Simportador de iones monovalentes. C-Canal de sodio.

Estos mecanismos pueden actuar de manera similar en ambientes alcalinos, donde el mantenimiento del equilibrio interno de la célula es fundamental para la sobrevivencia. *Kannan* (2009) demostró que el *Bacillus flexus* EMGA 5 desarrollado en un medio aerobio tiene una conductancia de membrana diferente a otros organismos neutrófilos. La conductancia de protones en la membrana fue disminuida de manera significativa en valores de pH 7 y 8, mientras que se aumentó en un pH de 10, permitiendo mejor la regulación del pH cercano a la membrana celular.

Sin embargo, el papel que cumple la pared celular en la regulación de la homeostasis del pH en el microorganismo no se ha establecido de modo completo. Hasta el momento existen varias hipótesis de la manera en que la pared celular contribuye a esta característica. Uno de los factores que influye en la resistencia al pH es la fisiología de la pared celular. Cuando *Bacillus lentus* C-125 crece en condiciones alcalinas, desarrolla una pared celular hasta 20% más gruesa y triplica la densidad de carga negativa alrededor de la pared celular, aumentando la cantidad de polímeros ácidos como ácidos galacturónico, glucónico, glutámico, aspártico y fosfórico, estos últimos que forman parte de los ácidos teicoicos. Esta carga negativa puede hacer las funciones de escudo que repele los grupos OH^- del medio y que permite la entrada de H^+ y Na^+ . El aislamiento de mutantes deficientes en la producción de estos polímeros de carácter ácido derivó en la pérdida de capacidad alcalófila del *Bacillus lentus*.⁴

1.1.2 Nejayote

La nixtamalización es un proceso de lixiviación alcalina en donde el maíz es cocido en agua con cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) para producir masa para tortillas y que ocasiona la modificación de diversos componentes del maíz; se hidroliza la hemicelulosa del pericarpio, se gelatiniza el almidón y se destruye una porción de aminoácidos y proteínas.⁵ De este proceso se obtienen dos corrientes, el nixtamal (maíz cocido) y el nejayote (agua de cocimiento). El nejayote es considerado un contaminante por el pH elevado (10-14) y la gran carga de materia orgánica en solución y en suspensión contenida en el mismo.^{6,7} En el nejayote se solubilizan minerales, grasas, vitaminas y algunas proteínas como las albúminas y las globulinas.⁵ Debido a estas características fisicoquímicas, el nejayote pudiera ser un excelente medio para el desarrollo y proliferación de microorganismos, sobre todo alcalófilos o alcalitolerantes.

Sin embargo, no se tienen reportes de microorganismos con estas características que fueran aislados del nejayote, ya que *Paenibacillus amylolyticus*, *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter sp.* fueron aislados de suelos contaminados con nejayote y no presentan la capacidad de crecer en condiciones alcalinas.⁷

Las enzimas producidas por los microorganismos en ambientes alcalinos, son de gran interés por su versatilidad en los procesos industriales, donde existen condiciones que pueden llegar a lo extremo.

1.2 Enzimas alcalinas

Un gran número de enzimas con actividad a pH alcalino, se utilizan ampliamente en la industria, los siguientes son algunos ejemplos:

- Las proteasas alcalinas son de las enzimas más vendidas en el mercado mundial. La principal aplicación de estas enzimas es en la industria de los detergentes. Esta industria cuenta con aproximadamente el 30% de la producción mundial total. La industria de las proteasas es un buen ejemplo de un producto biocatalítico comercial exitoso.¹

- Amilasas alcalinas con valores óptimos de pH mayores a 8 tienen un gran potencial de aplicaciones en las industrias del almidón, textiles y como aditivos de detergentes.⁸

- La gran mayoría de xilanasas aisladas tienen una actividad óptima a pH ácido o neutro.^{9,10} Por lo tanto, es necesario descubrir nuevas xilanasas alcalinas para ser usadas por ejemplo en la industria para el blanqueamiento del papel y reducir el uso de compuestos clorados.⁹

- La principal aplicación de las celulasas alcalinas es en la industria de los detergentes. Éstas eliminan microfilamentos de tejidos de algodón que permiten la liberación de las partículas de las manchas.^{11,12} Endo-1,1-β-glucanasas son las enzimas más usadas actualmente como aditivos en detergentes.¹²

1.2.1 Esterasas

Dentro del grupo de las hidrolasas de éster carboxílico, se ubican dos tipos de enzimas. Por mucho tiempo la diferencia entre lipasas y esterazas se ha basado en la especificidad de sustratos y su capacidad para hidrolizar ésteres en solución y emulsión.¹³ Generalmente se considera que las lipasas actúan sobre los enlaces éster de moléculas insolubles de triacilgliceroles, mientras que las esterazas hidrolizan estos enlaces de moléculas de cadena corta solubles en agua (Figura 2).

Recientes estudios sugieren fuertemente que la función ancestral lipasa había cambiado, con adaptaciones moleculares que derivaron en una nueva función enzimática esteraza.¹⁴ Sin embargo, se necesita más investigación para comprender mejor los cambios evolutivos y funcionales de lipasas y esterazas del ácido ferúlico(AF).

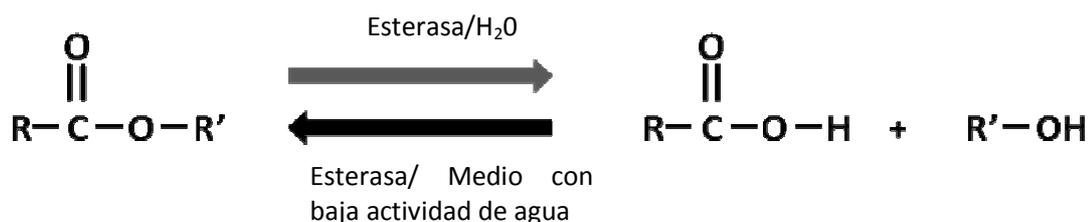


Figura 2. Reacción general de las esterazas.

1.2.2 Esterasas del ácido ferúlico

Las esterases del ácido ferúlico (EAF) son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura del enlace éster presente entre compuestos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico (principalmente el ácido ferúlico) y el arabinoxilano, sustrato presente de forma natural en la pared celular de los vegetales (Figura 3). Debido a la complejidad estructural y de los enlaces presentes entre los componentes del xilano, representan una seria dificultad para ser hidrolizado completamente por conjuntos de enzimas glicosilhidrolasas. Por esta razón, se necesita el sinergismo o colaboración de las esterases del ácido ferúlico con enzimas como acetilxilano esterases, xilanasas y α -L-arabinofuranosidasas.

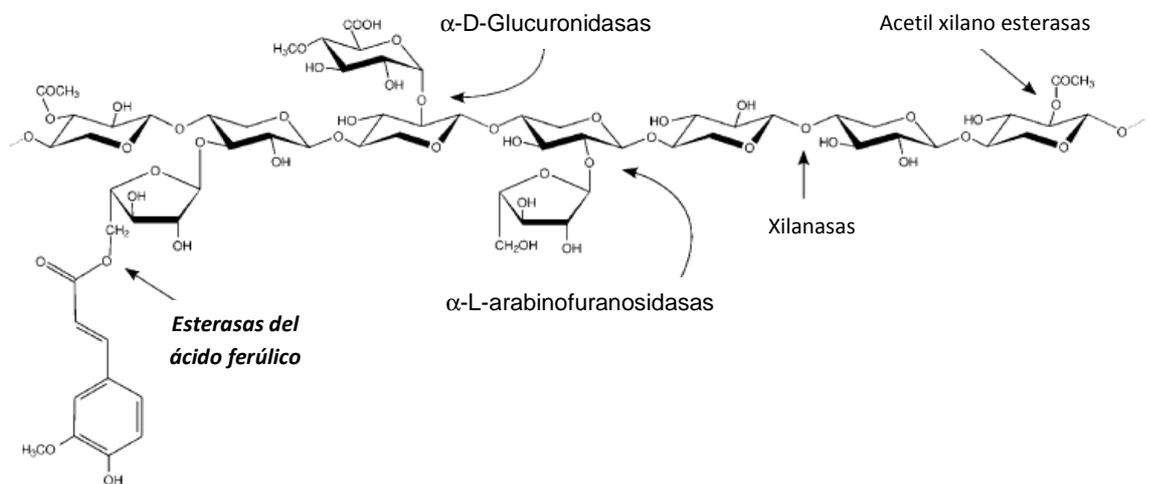


Figura 3. Xilano, polímero presente en la pared celular de los vegetales y las principales enzimas hidrolíticas.¹⁵

1.2.3 Clasificación de las esterasas del ácido ferúlico

En un inicio estas enzimas se clasificaban principalmente en 2 grupos de acuerdo a la acción sobre sustratos sintéticos como el metilsinapato y el metilcafeato. Actualmente se utiliza el sistema propuesto por Crepin (2004) que clasifica a las enzimas en 4 sub-clases de acuerdo a su proximidad con secuencias de otras familias de enzimas y el perfil de actividad contra 4 diferentes ésteres metílicos sintéticos derivados del ácido hidroxicinámico (incluyendo los dos ésteres anteriormente mencionados).

A continuación se detalla la clasificación de las esterasas del ácido ferúlico propuesto por Crepin.

Tipo A

Generalmente se inducen con sustratos derivados de cereales. Este tipo de enzimas libera AF esterificado con arabinosa y también puede liberar dímeros de AF de plantas cuando son tratadas previamente con xilanasas o se incuban las dos enzimas simultáneamente.

Este grupo muestra preferencia para actuar sobre el anillo fenólico con sustituciones metoxi, especialmente en los carbonos 3 y/o 5 como es el caso del ácido ferúlico y sinápico. Sin embargo, también es activo contra los ésteres metílicos sintéticos del ferulato, sinapato y *p*-coumarato, pero no sobre el metilcafeato. Las esterasas pertenecientes a este grupo tienen una gran homología con secuencias de lipasas.

Tipo B

Este tipo de enzimas se inducen principalmente con remolacha azucarera. Liberan el AF esterificado al C-2 de la arabinosa o C-6 de la galactosa, y es incapaz de liberar la forma dimerica del AF. También puede actuar sobre el AF esterificado con arabinosa, pero en menor proporción que las enzimas del tipo A.

Por otro lado, este grupo de enzimas muestran preferencia por los anillos con sustituciones hidroxilo en una o dos posiciones como el caso de los ácidos *p*-coumárico y caféico. La velocidad de la hidrólisis disminuye cuando sustituciones metoxi se encuentran presentes en el anillo fenólico. Así mismo, puede hidrolizar los ésteres metílicos sintéticos del *p*-coumarato, cafeato y ferulato, pero no el metil sinapato. Tienen una gran homología con la secuencia de la familia 1 de acetilxilano esterasas.

Tipo C

Este grupo no muestra preferencia alguna por un sustrato para su producción. No es capaz de liberar dímeros del AF. Muestra actividad sobre los enlaces presentes en los 4 ácidos fenólicos, y sus ésteres metílicos, ferulato, sinapato, *p*-coumarato y cafeato. Tiene una gran homología con las secuencias de clorogenato esterasas y tannasas.

Tipo D

Generalmente se inducen con sustratos derivados de cereales. Son capaces de liberar dímeros de AF. Muestra actividad sobre los enlaces presentes en los 4 ácidos fenólicos, y sus esteres metílicos, ferulato, sinapato, *p*-coumarato y cafeato. Tiene una gran homología con la secuencia de xilanasas.

Aunque la clasificación de Crepin es la utilizada hasta el momento, este método no toma en cuenta a las lipasas, enzimas que se pueden considerar como precursoras de las esterasas por su similitud estructural y funcional. Actualmente se propone otro método de clasificación, usando métodos computacionales que describen la interacción de farmacóforos con enzimas reportadas e hipotéticas y que agrupa estas enzimas en 12 familias.¹⁴

1.2.4 Nomenclatura de Esterasas del ácido ferúlico

Diversas nomenclaturas han sido propuestas para denominar de forma común a este tipo de enzimas; sin embargo, cuando comenzó a incrementarse el número de reportes sobre esterasas del ácido ferúlico, fue necesario establecer un sistema de nomenclatura para cada una de ellas. La nomenclatura más utilizada hasta el momento especifica la primera letra del género y la primera letra de la especie, seguida de las iniciales FAE (Ferulic Acid Esterase) y el tipo de enzima de la que se trata. Por ejemplo, la primer esterasa del ácido ferúlico reportada de *Aspergillus niger* se denomina **AnFAE**, estas siglas van seguidas de una letra que indica la clasificación de la enzima,

por lo que se pueden encontrar AnFAE A, B, C o D, para lo cual es necesario primero clasificar el tipo de enzima de la que se trata.

1.2.5 Principales fuentes de esterasas del ácido ferúlico

Los hongos, microorganismos con una gran capacidad hidrolítica, son la principal fuente de obtención de esterasas del ácido ferúlico. La primera enzima reportada con capacidad de hidrolizar el enlace éster del ácido ferúlico de hemicelulosa cruda de trigo pertenece a sistema que degrada celulosa y xilano de *Schizophyllum commune*. Sin embargo, los principales estudios se han enfocado en dos principales esterasas del ácido ferúlico aisladas del *Aspergillus niger* AnFAE-A y AnFAE-B. Estas enzimas fueron clonadas en *P. pastoris*, obteniéndose un monómero de 29 kDa con pI de 3.6 para AnFAE-A y un dímero de 132 kDa con pI de 3.0 para AnFAE-B. Algunas enzimas aisladas de *A. oryzae* y *A. awamori* tienen propiedades fisicoquímicas muy similares a AnFAE-A.

En la Tabla I se observan las principales características de las enzimas de origen fúngico, siendo el género *Aspergillus* el principal productor de esterasas del ácido ferúlico. Se observa que las enzimas de origen fúngico son proteínas de gran variedad de pesos moleculares (de 27 a 130 kDa) y tienen un óptimo funcionamiento en condiciones por debajo de la neutralidad, pH de 5 a 7, con rangos de temperatura que oscilan de los 37 a los 60 °C. Sin embargo, Topakas describió en el 2003 una esterasa de *Fusarium oxysporum* capaz de retener el

72 y 40% de actividad después de 6 horas a pH 9 y 10 respectivamente; y Hegde en el 2009 reportó una esterasa de *Aspergillus niger* con actividad óptima a pH 9. Además la mayoría de estas enzimas tienen bien caracterizada su especificidad hacia los ésteres metílicos sintéticos del ácido hidroxicinámico, ubicando al metilferulato, como el principal sustrato de las enzimas (solo las enzimas provenientes de *A. awamori* y *A. oryzae* no mostraron actividad contra éste).

Por otro lado, dos enzimas con doble funcionalidad (Xyn10A y Xyn10B) que contiene dominios de actividad esterasa y xilanasas fueron identificadas de un complejo multienzimático de *Clostridium thermocellum*. El gen Xyn10A contiene 2511 pares de bases que codifican para una proteína de 92kDa. La Xyn10B contiene un marco abierto de lectura de 3228 pares de bases que codifican para una proteína de 120 kDa. Ejemplos de enzimas provenientes de bacterias como el anterior, han ido en incremento en los últimos años, puesto que la tendencia actual es buscar enzimas que mantengan su actividad esterasa aún en condiciones hostiles, como las condiciones usadas normalmente en las reacciones a nivel industrial, condiciones tales como pH y temperatura extremos y presión osmótica elevada.

Como se puede observar la Tabla II, las esterazas de origen bacteriano presentan una mayor versatilidad en las condiciones de funcionamiento, encontrándose actividad en rangos de pH de 5.4 a 8.5, y temperatura de 20 a

Tabla I. Principales esterasas del ácido ferúlico de origen fúngico

Enzima	Microorganismo	Masa molecular (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Actividad contra metil ésteres
Fae-I	<i>Aspergillus niger</i>	63	-	-	MFA
Fae-B	<i>Aspergillus nidulans</i>	130	7.0	45	MpCA, MCA, MFA
FaeA	<i>Aspergillus awamori</i>	35	5	45	MpCA
Fae	<i>Aspergillus oryzae</i>	30	4.5 - 6	-	-
Fae-II	<i>Fusarium oxysporum</i>	27	7.0	45	MSA, MpCA, MCA, MFA
Fae-I	<i>Neurospora crassa</i>	29.3	6.0	55	MSA, MpCA, MCA, MFA
Fae	<i>Penicillium expansum</i>	65	5.6	37	MpCA, MFA
EstA	<i>Piromyces equi</i>	55.5	6.7	50 - 60	MSA, MpCA, MCA, MFA
StFae-A	<i>Sporotrichum thermophile</i>	33	6.0	55 - 60	MpCA, MCA, MFA
TsFae-A	<i>Talaromyces stipitatus</i>	35	-	-	MSA, MpCA, MCA, MFA
TsFae-B	<i>Talaromyces stipitatus</i>	35	-	-	MpCA, MCA, MFA

MFA-Metilferulato, MpCA-Metil-p-coumarato, MCA-Metilcoumarato, MSA-Metilsinapato.

45 °C, con un tamaño comparable a las enzimas de origen fúngico de 31 a 84 kDa. Sin embargo, aun no se ha reportado la especificidad que muestran estas enzimas contra ésteres sintéticos de ácidos hidroxicinámicos. Aun falta mucho trabajo respecto a la caracterización de enzimas de origen bacteriano.

Tabla II. Principales esterasas del ácido ferúlico de origen bacteriano

Enzima	Microorganismo	Masa molecular (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Actividad contra metil ésteres
Axe	<i>Bacillus pumilus</i>	36	8.5	45	<i>p</i> -nitrofenil acetato
CinI	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	46	5.4	-	MUTMAC
	<i>Cellvibrio japonicus</i>	58.5			<i>p</i> -nitrofenil acetato
Xil	<i>Clostridium thermocellum</i>	-	-	-	Etilferulato
Cin I	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	31	7.8	20	Etilferulato, <i>p</i> -nitrofenil acetato
Fae	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	36	5.6	37	FAX
Xil-Fae	<i>Prevotella ruminicola</i>	84	-	-	FAX
Fae	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	60	8.0	20	MUTMAC
Xil	<i>Ruminococcus flavecians</i>	80	-	-	MFA, MUTMAC

MUTMAC-Cloruro de Metilumbelliferuloil-7-(*p*-trimetilamoniocinamato); FAX-Feruloil arabinosilano; MFA-Metilferulato.

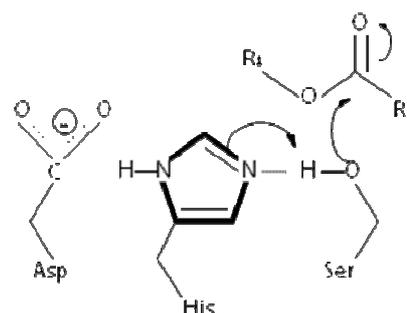
Actualmente sólo se tienen las estructuras obtenidas por cristalografía de AnFAE-A y de la Xyn10A. A través de estas estructuras se obtuvieron datos para la deducción del mecanismo de reacción que utilizan y los sitios de reconocimiento del sustrato por parte de la enzima.

1.2.6 Mecanismo de acción de esterasas

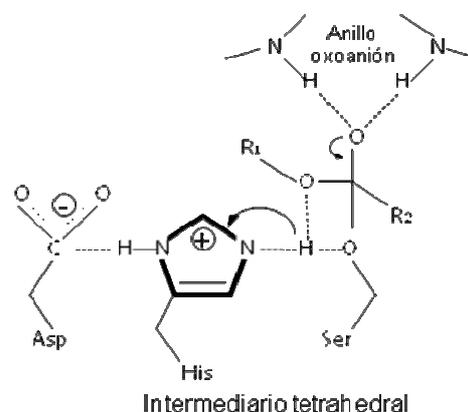
Las estructuras cristalinas reportadas hasta el momento de las FAE de *Aspergillus niger* y de *Clostridium thermocellum*, muestran plegamiento α/β con una triada catalítica de His-Ser-Asp en el sitio activo, triada clásica reportada en serin proteasas, lipasas y otras esterasas. Es lógica la suposición de definir un mecanismo hidrolítico similar al reportado en serin proteasas, con la formación de un estado de transición tetrahedral, la estabilización de un anillo oxoanión en el residuo carbonilo del sustrato y la participación de una molécula de agua para finalizar la reacción. Este proceso se puede resumir en dos etapas, la acilación y posterior desacilación de la enzima.

Primera Etapa: Acilación

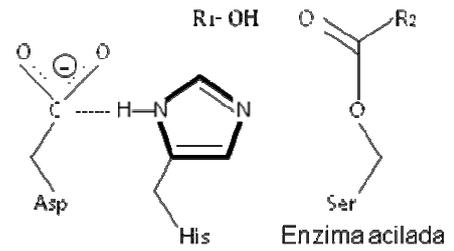
La catálisis comienza con un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del éster, por parte de la OH-Ser, residuo activado por la influencia de la Histidina catalítica.



En el segundo paso, se forma el intermediario tetrahedral y se estabiliza del anillo oxoanión con residuos de aminoácidos cercanos al sitio activo. La necesidad de estabilizar el anillo imidazol, rompe el intermediario tetrahedral.



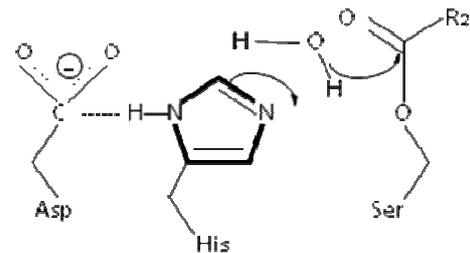
La primer etapa termina con la liberación del alcohol como producto y con la serina del sitio activo acilada.



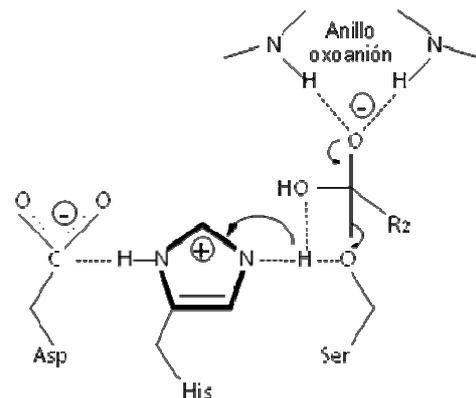
Segunda etapa: Desacilación

El segundo paso de la hidrólisis, incluye la desacilación de la enzima y la liberación del ácido carboxílico como producto final.

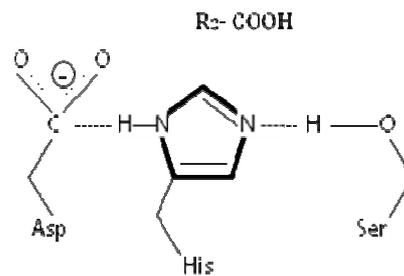
La segunda etapa comienza con un nuevo ataque nucleofílico hacia el carbono carbonilo por una molécula de agua, asistida de nuevo por la Histidina catalítica.



Lo siguiente es la formación de nuevo del intermediario tetrahedral y la estabilización del anillo oxoanión por aminoácidos cercanos al sitio activo. La necesidad de estabilizar al anillo imidazólico de la Histidina permite el siguiente paso de la reacción.



La hidrólisis es finalizada con la liberación del ácido carboxílico como producto final y la enzima libre. Como consecuencia se obtiene la hidrólisis del éster.



El mecanismo de especificidad de estas enzimas hacia el residuo ferulato del sustrato, es lo que hace la diferencia respecto a otras esterasas, además puede estar sujeto también al reconocimiento de oligosacáridos presentes en los sustratos naturales, sin llegar a ser esenciales para la catálisis.

1.2.7 Importancia de las feruloil esterasas en la industria

El uso de las esterasas del ácido ferúlico consiste desde aplicación directa de las enzimas en los procesos, hasta la utilización del producto de estas.

Liberación del ácido ferúlico.

El ácido ferúlico es un compuesto fenólico derivado del ácido cinámico y como tal presenta propiedades interesantes para la industria farmacéutica, alimentaria y de cosméticos (Figura 4).

Posee actividad antioxidante debido ya que se ha demostrado que estabiliza radicales libres por resonancia. Se ha demostrado que el ácido ferúlico además incrementa la actividad de enzimas que neutralizan a los radicales libres e inhibe a las enzimas que los producen como la tirosinasa y la superóxido dismutasa. Las propiedades antioxidantes de los derivados hidroxicinámicos

han sido ampliamente estudiadas *in vitro*, y el efecto potencial ha sido estudiado en modelos animales.^{17,18}

Debido a la inhibición sobre la arilamina *N*-acetiltransferasa¹⁹, presenta una importante actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras.²⁰

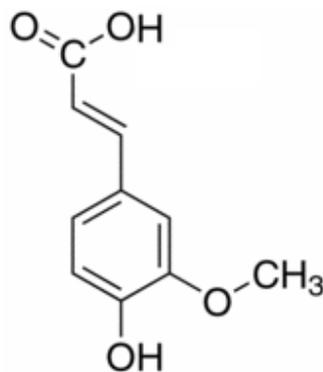


Figura 4. Ácido ferúlico.

Producción de Vainillina.

La vainillina es el principal saborizante utilizado a nivel mundial. La extracción de vainillina de las plantas es un proceso altamente costoso, y al ser un producto de alto valor económico una opción de producción es por síntesis química; sin embargo, el producto obtenido es considerado como saborizante sintético. Una alternativa para la producción del saborizante de manera natural, es la bioconversión del ácido ferúlico a vainillina usando esterasa del ácido ferúlico y feruloil CoA de *Pseudomonas fluorescens* BF13.²¹

Eliminación de lignina por vía enzimática

El principal problema que se presenta en la industria del papel, son los residuos de lignina presentes en las fibras que provocan un oscurecimiento indeseado en el producto final. El proceso *Kraft*, tratamiento de blanqueado con cloro, elimina los residuos de lignina; sin embargo, alrededor del 5% del cloro utilizado se queda en la pasta, de éste porcentaje el 90% se convierte en iones cloruro y un 10% se transforma en compuestos organoclorados altamente contaminantes.

La eliminación de los residuos de lignina embebidos en las cadenas de celulosa y hemicelulosa por acción enzimática, representa una alternativa ecológica debido a su naturaleza más específica y sin la producción de compuestos contaminantes. Un tratamiento con enzimas combinadas de AnFae-A, xilanasas, y lacasas mostró ser efectivo en la remoción de la lignina en pulpa de paja de trigo.²²

Síntesis de ésteres derivados del ácido hidroxicinámico.

La poca solubilidad del ácido ferúlico es un problema que afecta su uso en productos de base acuosa y oleosa. La síntesis de derivados de este ácido puede resolver estas dificultades de solubilidad.²³

Además se pueden sintetizar productos esterificados que presenten mayor actividad antioxidante, por ejemplo cuando se esterifica con *L*-arabinosa.²⁴

Producción de biocombustibles.

La necesidad de encontrar fuentes de energía alternativa al uso de combustibles fósiles ha dirigido las investigaciones hacia el área de energía renovable. La combinación de esterasas del ácido ferúlico con enzimas glicosil hidrolasa puede ser usada en la bioconversión de residuos lignocelulósicos en azúcares fermentables para la producción de bioetanol. Se ha demostrado que durante la etapa de sacarificación de la paja de trigo, se aumenta hasta un 80% la liberación de glucosa por la acción sinérgica de enzimas de tipo esterasa del ácido ferúlico, celulasas y xilanasas en alta temperatura (50°C) y en presencia del detergente Tween 20.²⁵

De igual forma, se puede aumentar la liberación del AF a partir de la cascarilla de avena hasta un 69% más, cuando se agregan xilanasas de *Trichoderma* a las esterasas del ácido ferúlico de *Aspergillus*.²⁵ Esta colaboración entre los grupos de enzimas, pueden facilitar la hidrólisis y liberación de productos deseados a partir de residuos agroindustriales.

1.3 Microorganismos aislados del nejayote de maíz.

En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, fueron aisladas del nejayote 6 cepas con gran potencial hidrolítico, siendo especialmente interesante la actividad esterasa del ácido ferúlico encontrada en 2 de estas cepas. Como se observa en la Figura 5, una de estas cepas presentó la capacidad de liberar hasta el

50% del ácido ferúlico del pericarpio de maíz en condiciones alcalinas aproximadamente a las 100 horas de fermentación (Figura 5).²⁶

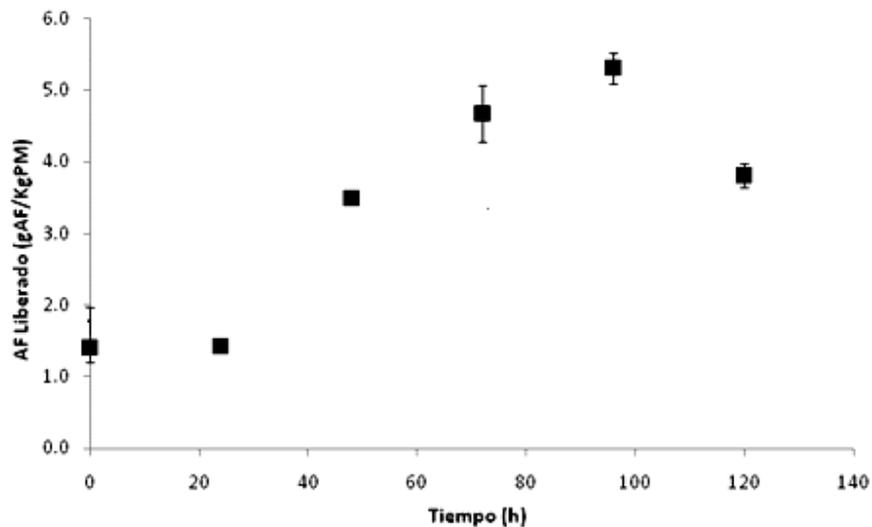


Figura 5. Liberación del Acido Ferúlico a partir del pericarpio de maíz por *B. flexus* NJY2.

1.4 Optimización de producción de enzimas.

El método tradicional empleado para la optimización de un proceso en base a su parámetro respuesta (en este caso la actividad enzimática), se lleva a cabo cambiando un factor a la vez mientras los demás se mantienen en valores constantes. Sin embargo, este método necesita una gran cantidad de tiempo, trabajo y experimentos para funcionar, y no siempre permite un análisis completo de la influencia de los factores utilizados y la interacción entre ellos.^(27,28) La mayoría de los estudios enfocados en aumentar la producción de

feruloil esterasas bacterianas utilizan el método clásico.^(29,30) Hasta ahora ningún estudio ha empleado un Diseño Central Compuesto (DCC) para analizar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de feruloil esterasas bacterianas. El uso de un diseño de experimentos proporciona modelos estadísticos e información sobre el proceso en un número mínimo de experimentos, sin embargo con este número de experimentos, la importancia de cada variable y su interacción entre ellas puede ser determinada.

Otra alternativa utilizada es el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), una combinación de técnicas estadísticas usadas para estudiar el efecto combinado de ciertas variables, para optimizar las condiciones en un sistema multivariable (como suelen ser los medios de cultivo) y estimar los coeficientes para genera un modelo matemático de respuesta.^(31,32,33) Esta técnica generalmente produce gráficas de superficie y de contorno a partir de los efectos lineales y cuadráticos de dos o más factores, además ajusta los valores experimentales a los calculados con el modelo, para optimizar la respuesta del proceso.

CAPITULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1 Hipótesis

El microorganismo aislado a partir del nejayote de maíz presentara importantes capacidades hidrolíticas, principalmente asociadas a la liberación del ácido ferúlico a partir del pericarpio de maíz.

2.2 Objetivo General

Identificar, caracterizar y optimizar el potencial hidrolítico sobre ésteres de ácido ferúlico del microorganismo aislado a partir del nejayote de maíz

2.3 Objetivos Específicos

Determinar el perfil bioquímico de los microorganismos aislados del nejayote.

Realizar la identificación molecular del microorganismo mediante la secuencia del 16SDNA.

Determinar la presencia de esterasas de ácido ferúlico en los microorganismos aislados del nejayote.

Caracterizar la actividad feruloil esterasa producida por los microorganismos aislados del nejayote.

Optimizar la producción de la esterasa del ácido ferúlico por el microorganismo.

.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y equipos

3.1.1 Material Biológico

Las cepas de microorganismos aislados del nejayote e identificadas como NJY2 y NJY4, son conservadas por resiembras periódicas cada 5-6 meses en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

3.1.2 Material Químico

- *p*-nitrofenil ferulato (pNFF), (Institute of Chemistry, Slovak Academy of Science)
- Ácido acético glacial (Fisher scientific), ácido clorhídrico (Desarrollo de Especialidades Químicas S.A.)
- Ácido ferúlico (SAFC)
- Acrilamida (Amresco)
- Agar bacteriológico (BD Bioxon)
- Alcohol etílico (DEQ)
- Azul de Coomasie R-250 (Bio-Rad)

- Azul de bromofenol (Amresco)
- Bicarbonato de sodio (Productos Químicos Monterrey S.A.)
- Bisacrilamida (Amresco)
- Carbonato de sodio (CTR scientific)
- Cloruro de calcio (J.T. Baker)
- Dextrosa anhidra (CTR scientific)
- Dimetil sulfoxido (Research organics)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Extracto de levadura (BD Bioxon)
- Fosfato de potasio dibásico (Productos Químicos Monterrey)
- Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker),
- Glicina (Amresco)
- Hidróxido de calcio (CTR scientific)
- Hidróxido de sodio (Fermont),
- Metilferulato (Alfa Aesar)
- MOPS (3-(N-morfolino)ácido propanesulfónico) (Amresco)
- N,N-dimetilformamida (DMF) (Sigma)
- Peptona de caseína (BD Bioxon)
- Pericarpio de maíz (donado por CIASA sucursal Ruiz Cortinez, Monterrey)
- Persulfato de amonio (Amresco)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina) (Amresco)
- Tricina (N-(2-Hidroxi-1,1-bis(hidroximetil), etil)
- Tris (tris(hidroximetil), aminometano) (Research organics)
- Triton X-100 (Merck)

3.1.3 Material y equipo de laboratorio

- Autoclave (All american)
- Balanza analítica (AND)

- Baño de agua (Polyscience)
- Campana de flujo laminar (NOVATECH)
- Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 (Varian)
- Espectrofotómetro UV-Vis SPECTROstar Omega (BMG LABTECH)
- Estufa de vacío (Thelco)
- Fuente de poder Modelo 300 Accu Power (VWR Scientific Products)
- Incubadora (Lab line 3525)
- Incubadora con agitación SHKA4000 (Lab-Line)
- Medidor de pH Orion* 3-Star Plus (Thermo Fischer scientific)
- Micro centrífuga refrigerada (Hettich Zentrifugen)
- Molino de café Aromatica (Braun)
- Pipeta automática Pipetman® P1000 (Gilson)
- Pipeta automática Pipetman® P20 (Gilson)
- Pipeta automática Pipetman® P200 (Gilson)
- Plancha con agitación (Thermoline)

3.2 Conservación de los microorganismos

Los microorganismos aislados del nejayote de maíz fueron conservados en placas de agar Pericarpio modificado compuesto por 20 g/L de pericarpio nixtamalizado, 5 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de CaCO₃ a 4°C y resembrados en medio nuevo cada 6 meses. En cada resiembra se realizaron tinciones Gram y observaciones al microscopio para verificar la integridad celular, morfología y pureza de las cepas.

3.2.1 Crecimiento de los microorganismos

Para el crecimiento del microorganismo se realizaron cultivos en dos etapas, partiendo del microorganismo conservado a 4°C. En la primera se sembró una asada del microorganismo en caldo Pericarpio modificado y se incubó por 24 horas a 37 °C y 150 rpm. En la siguiente etapa se transfirió 2.5 mL de este cultivo a un matraz con 50 mL de medio fresco estéril.

3.3 Identificación de los microorganismos aislados del nejayote

3.3.1 Identificación molecular de los microorganismos

Para la identificación molecular, los microorganismos se cultivaron en caldo Pericarpio modificado a 37°C y 150 rpm por 12 horas. Después de la incubación se centrifugó el cultivo a 12000xg por 2 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar restos del sobrenadante. Por último se obtuvo el ADN genómico con el UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit de MOBIO Laboratories. Este método consiste en una lisis celular combinada de detergente, calor y fuerza mecánica contra perlas especiales en un agitador tipo vórtex. El ADN liberado se recupera en un filtro de sílica, se lava con amortiguadores para eliminar impurezas y se recupera con amortiguador Tris.

Las muestras obtenidas de ADN fueron enviadas a secuenciación a los laboratorios MIDI, Inc. 125 Sandy Drive, Newark, DE.

La secuencia obtenida se analizó utilizando el editor Bioedit y el programa CLUSTALW. El árbol filogenético se construyó utilizando la serie de programas Phylip versión 3.67.

3.3.2 Identificación bioquímica de los microorganismos

Para las pruebas bioquímicas se realizaron los cultivos en dos etapas, primero se incubaron por 24 horas en caldo pericarpio modificado y posteriormente se resembraron en el medio requerido según la prueba bioquímica ³⁴, los medios requeridos para la segunda etapa se detallan en la Tabla III.

3.3.3 Estudio de tolerancia pH, temperatura y NaCl

Además de estas pruebas se realizaron estudios de tolerancia de los microorganismos a diferentes niveles de pH, temperatura y concentración de NaCl en medios sólidos. Para los estudios de tolerancia a pH, se prepararon cajas de agar pericarpio modificado con el amortiguador de acuerdo al nivel de pH deseado (pH 5 en amortiguador de acetatos, pH 7 en fosfatos, pH 9 en MOPS y pH 12 en carbonatos) y se incubaron por 48 horas a 37° C. En los estudios de tolerancia a temperaturas (30-60°), se prepararon cajas de agar pericarpio modificado y se incubaron por 48 horas a diferentes temperaturas (30 – 60 °C). Para la tolerancia a NaCl, se añadieron concentraciones de 2 a 10% de NaCl al agar pericarpio modificado y se incubaron por 48 horas a 37 °C.

Tabla III. Pruebas bioquímicas realizadas

Medio de cultivo	Objetivo	Inoculación /Incubación	Tratamiento después de incubación	Interpretación de la prueba	
				Positivo	Negativo
Medio SIM	Producción de indol			Anillo rojo en superficie	Ausencia de color rojo en superficie
	Producción de H ₂ S	Por picada hasta el fondo/48 horas a 37°C	2 o 3 gotas de reactivo de Kovac	Medio color negro	Ausencia de color negro
	Prueba de movilidad			Crecimiento en todo el medio	Crecimiento solo en la picada
Agar Citrato de Simmons	Utilización de citrato como fuente de carbono	Por picada al fondo y estría/ 24-48 horas 37°C	-	Coloración azul	Ausencia de coloración azul
Medio RMVP	Fermentación de glucosa	Asada/7 días 37°C	2 o 3 gotas de rojo de metilo	Coloración roja en el medio	Ausencia de color rojo en el medio
	Producción de acetoina	Asada/48 horas 37°C	10 gotas de α-naftol y 5 gotas de KOH (10%)	Anillo rojo o rosa fuerte	Ausencia de anillo rojo o rosa fuerte
Caldo nitrado	Reducción de nitratos	Asada/24-48 horas 37°C	Acido sulfanílico y 1 naftilamina	Coloración roja	Ausencia de coloración roja
-	Oxidasa	-	Reactivo de Kovac sobre una colonia	Color negro intenso	Ausencia de color negro
-	Catalasa	-	H ₂ O ₂ sobre una colonia	Formación de burbujas	Ausencia de burbujas
-	Hidrólisis de gelatina (pH 6-9)	-	Tinción azul de Coomasie	Ausencia de coloración	Coloración azul
-	Hidrólisis de celulosa	Estría/7 días	Tinción con rojo congo	Ausencia de color rojo	Color rojo
-	Hidrólisis de almidón (pH 8)	Estría/7 días	Tinción con lugol	Color amarillo	Color azul
	Hidrólisis de xilano	Estría/7 días	-	Crecimiento	Ausencia de crecimiento
Caldos con rojo fenol	Fermentación de azúcares	Asada/7 días	-	Color amarillo y formación de gas	Color rojo o amarillo sin gas
	Actividad esterasa del ácido ferúlico	-	-	Presencia de AF	Ausencia de AF

3.4 Análisis de la actividad de la enzima esterasa del ácido ferúlico

3.4.1 Determinación cualitativa de la actividad de la enzima esterasa del ácido ferúlico

Para la determinación cualitativa de la actividad enzimática se utilizó el éster etílico del ácido ferúlico, que tiene la propiedad de ser un sustrato insoluble en agua por lo que le confiere turbidez a medios acuosos, esta característica es eliminada al ser hidrolizado generando ácido ferúlico y metanol, los cuales son más solubles en el medio que el sustrato (v/v).³⁵

El etilferulato disuelto previamente en N,N-dimetilformamida (DMF) en concentración 100 mg/mL, se añadió a agar bacteriológico estéril caliente (aproximadamente 60°C) para alcanzar una concentración igual a 0.1% (v/v). Una vez que la preparación se vació en placas petri, se dejaron por 15 minutos en exposición directa a luz ultravioleta al mismo tiempo que solidificaba el agar para mantener el ambiente y la superficie del agar estéril.

Una vez sólido el agar, se sellaron las placas con parafilm y se guardaron en refrigeración hasta su uso.

Para la determinación de actividad enzimática se utilizó el *p*-nitrofenil ferulato como sustrato (*p*-NFF). Este se preparó inmediatamente antes

de su utilización disolviendo 3.3 mg del reactivo por cada mililitro de dimetil sulfóxido (DMSO).

Posteriormente el sustrato se diluyó 9 veces utilizando amortiguador MOPS 100 mM pH 7 con Triton X-100 al 2.5 % (v/v) lentamente y con agitación constante. Se añadieron 5 μ L de muestra por cada 100 μ L de sustrato y se siguió la cinética enzimática durante 10 minutos a 410 nm con temperatura constante de 37°C.

Para el cálculo de actividad enzimática se utilizó la ecuación de Lambert-Beer:

$$\text{Absorbancia} = \varepsilon * d * c$$

considerando el valor de ε del *p*-nitrofenol de 17800 M⁻¹cm⁻¹ a 410 nm,³⁶ *d* la longitud que atraviesa el haz de luz en la celda del espectrofotómetro (1 cm) y *c* el cambio en la concentración del producto formado durante el tiempo (dP/dt) representado en la pendiente de la cinética enzimática.

Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol a partir del *p*-nitrofenil ferulato por minuto.

3.4.2 Cuantificación de proteína

Se cuantificó la proteína de las muestras utilizando el protocolo establecido y los reactivos del kit *CD Protein Assay* de BioRad, y se utilizó albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar.

3.4.3 Ubicación de la actividad enzimática

Para ubicar la actividad enzimática se utilizó un cultivo de *B. flexus* NJY2 y NJY4 en caldo pericarpio modificado incubado por 48 horas a 37 °C y 150 rpm. Se centrifugó por 20 minutos a 2600 g y se separó la fracción celular y la fracción del sobrenadante. Estas fracciones se prepararon como se menciona en los siguientes apartados 3.4.3.1 y 3.4.3.2 respectivamente. Posteriormente se determinó la actividad enzimática con *p*-NFF.

3.4.3.1 Preparación de células de *B. flexus* NJY2 en reposo metabólico

El paquete celular se lavó en 3 volúmenes de amortiguador MOPS 100 mM pH 7 enfriado previamente a 4 °C y por último se resuspendieron en el mismo amortiguador con un décimo del volumen original y se conservó a 4 °C.

3.4.3.2 Preparación de enzima extracelular de *B. flexus* NJY2

La fracción del sobrenadante del cultivo se concentró de 15 a 20 veces utilizando una celda de ultrafiltración con agitador Amicon® (Milipore) y membranas Amicon® con tamaño de corte de 10 kDa. El extracto concentrado se lavó 2 veces con volúmenes iguales de amortiguador MOPS 100 mM pH 7 enfriado previamente a 4 °C y se conservó a 4 °C hasta su uso.

3.4.4 Efecto del pH sobre la actividad de la esterasa del ácido ferúlico

El efecto del pH sobre la enzima se determinó en la fracción celular y en el extracto concentrado de la fermentación, obtenidas como se describe en el apartado anterior.

Se varió el pH en un rango de 4-10, empleando los siguientes amortiguadores en una concentración de 100 mM: ácido acético/acetato de sodio (pH 4 y 5), $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6 y 7), MOPS (pH 8) y $\text{NaH}_2\text{CO}_3/\text{Na}_2\text{HCO}_3$ (pH 9 y 10).

Para medir la actividad enzimática se utilizó *p*-NFF. La solución *p*-NFF en DMSO (3.3 mg/mL) se diluyó en el amortiguador con el pH correspondiente y posteriormente se agregó H_2O destilada hasta alcanzar una concentración de 1.1 mg/mL. Finalmente se añadieron 5 μL de muestra por cada 100 μL de sustrato y se siguió la cinética enzimática durante 10 minutos a 410 nm con temperatura constante de 37°C.

3.4.5 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de la esterasa del ácido ferúlico por *B. flexus* NJY2

Se determinó el efecto de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo sobre la producción de la esterasa del ácido ferúlico por el *Bacillus flexus* NJY2.

Previo a este estudio se incubó el microorganismo en medio LB y se realizaron 4 etapas de resiembra en este medio, para eliminar todo el ácido ferúlico posible del medio. Posteriormente se inoculó el microorganismo en el medio de prueba.

Para tal fin se utilizaron medios con pericarpios de maíz, trigo y arroz que contienen ácido ferúlico esterificado como parte natural de su estructura, medio LB con 1 mg/mL de ácido ferúlico añadido y medios LB y xilano a los que no les fue añadido ácido ferúlico. Después de 48 horas de incubación se recuperaron las células de la fermentación como se describe en el apartado 3.4.3.1 y la actividad enzimática asociada a célula se cuantificó como se describe en el apartado 3.4.1.

3.5 Extracción de la enzima esterasa del ácido ferúlico asociada a células

3.5.1 Ruptura mecánica de células de *B. flexus* NJY2.

La fracción celular de un cultivo de *B. flexus* NJY2 en medio pericarpio modificado incubado por 48 horas a 37 °C y 150 rpm, fueron recolectadas al centrifugar a 2600g y 4 °C. El paquete celular se lavó con 3 volúmenes de amortiguador MOPS 100 mM pH 7 enfriado previamente a 4 °C y por último se resuspendieron en el mismo amortiguador con un décimo del volumen original y se conservó a 4 °C hasta su uso. Durante el proceso de ruptura se mantuvo la temperatura de las muestras a 4 °C para evitar la degradación de la enzima.

Las células fueron lisadas utilizando un disruptor celular Mini-BeadBeater (Biospec), para lo cual se añadió arena de mar a 4 °C hasta alcanzar la mitad del vial de lisis (aproximadamente 1 mL), posteriormente se agregó 1 mL de suspensión celular descrita previamente, la mezcla se sometió a lisis proporcionando al vial 3 pulsos de agitación a 4200 rpm por 10 segundos. Para evitar la degradación de la enzima, el vial fue enfriado en hielo después de cada pulso.

Para recuperar el sobrenadante, se centrifugó la mezcla por 10 segundos a 12000 g y el sobrenadante posteriormente se transfirió a tubos eppendorf de 1.6 mL donde se centrifugó a 15000xg por 10 minutos para eliminar los restos celulares. Por último el sobrenadante se concentró 5 veces con membranas de ultrafiltración Amicon® con tamaño de corte de 10 kDa 5 veces y el concentrado se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

3.5.2 Extracción de enzima con 10% SDS

Para extraer la enzima a partir de la suspensión de células descritas previamente, se le agregó 1 volumen de SDS al 10% (p/v). La mezcla se agitó y se dejó reposar por 12 horas en refrigeración a 4°C.

Después de la incubación la mezcla se centrifugó a 2600xg por 20 minutos a 4 °C, posteriormente el sobrenadante se c oncentró 5 veces utilizando membranas de filtración Amicon® de tamaño de corte de 10 kDa. Este concentrado se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

3.6 Separación de proteína por electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Para la electroforesis de proteínas en geles de acrilamida, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se utilizó el sistema Mini Protean II system (BioRad), siguiendo el método propuesto por *Laemmli*. Las composiciones del gel separador y espaciador fueron las siguientes:

Tabla IV. Componentes para la preparación de los geles de poliacrilamida.

Reactivo	Gel separador	Gel espaciador
	12% (p/v)	4% (p/v)
Acrilamida al 30%	2 mL	0.17 mL
Tris 0.5 M pH 8.8	1.3 mL	0.13 mL (pH 6.8)
H2O	1.7 mL	0.68 mL
SDS al 10%	50 μ L	10 μ L
APS al 10%	50 μ L	10 μ L
TEMED	5 μ L	2 μ L

Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga compuesto por 60 mM Tris-HCl; pH 6.8; 2% (p/v) SDS, 40% glicerol (v/v) y 0.01 % (p/v) azul de bromofenol. Las electroforesis se corrieron con un amperaje constante de 25 mA durante 50 minutos. Como amortiguador de corrida

se utilizaron dos variantes; la primera contenía 3 g/L Tris, 14.4 g/L glicina y 1 g/L SDS ajustando con HCl a pH 8.3; y la segunda con 17.9 g/L Tris, 12 g/L tricina y 1g/L SDS ajustando con HCl a pH 8.25.

3.6.1 Tinción de geles de poliacrilamida

Para la tinción de geles de acrilamida se utilizó una solución compuesta con 0.625g azul de Coomasie, 250 mL metanol, 50 mL ácido acético y H₂O hasta completar 500 mL.

Se sumergió el gel de poliacrilamida durante 25 minutos en la solución de colorante y posteriormente se puso en contacto por 15 minutos con una solución de desteñido I compuesta con 500 mL metanol, 100 mL ácido acético y H₂O a completar 1 L. Por último se sumergió en una solución de desteñido II compuesta por 500 mL metanol, 700 mL ácido acético y H₂O a completar 10 L.

3.6.2 Zimograma con etilferulato

Para comprobar la actividad de las bandas de proteínas obtenidas por electroforesis, los geles de acrilamida se lavaron 2 veces con 25 mL de amortiguador 100 mM MOPS pH 7 con 0.1% (v/v) Tween 60 durante 30 minutos por cada lavado.

Posteriormente los geles se colocaron sobre placas petri con agar bacteriológico conteniendo 0.1% (p/v) etilferulato y se dejaron incubar a 28 °C. Después de 12 horas de incubación se observó el gel en

búsqueda de anillos de claridad indicativos de la actividad esterasa del ácido ferúlico.

3.7 Diseño de experimentos para la optimización en la producción de esterasa del ácido ferúlico de *Bacillus flexus* NJY2.

Se realizó un diseño de experimentos factorial para optimizar la producción de la enzima. No se utilizó un punto central, 4 factores fueron utilizados a dos niveles separados (-1 y +1), con un total de 8 experimentos con sus respectivos triplicados. Las variables del diseño naturaleza del catión y concentración del amortiguador y la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Codificación del diseño de experimentos de superficie de respuesta de diseño central compuesto.

T	Amortiguador de carbonatos				Fuente de Nitrógeno			
	Nivel	Catión	Nivel	Concentración g/L	Nivel	Tipo	Nivel	Concentración g/L
t ₁	-1	Ca ⁺⁺	-1	2	-1	Extracto levadura	-1	5
O ₂	-1	Ca ⁺⁺	-1	2	1	Peptona	1	10
d ₃	-1	Ca ⁺⁺	1	15	-1	Extracto levadura	1	10
O ₄	-1	Ca ⁺⁺	1	15	1	Peptona	-1	5
S ₅	1	Na ⁺	-1	2	-1	Extracto levadura	1	10
6	1	Na ⁺	-1	2	1	Peptona	-1	5
l ₇	1	Na ⁺	1	15	-1	Extracto levadura	-1	5
O ₈	1	Na ⁺	1	15	1	Peptona	1	10

A los medios de cultivo se les agregó 20 g/L pericarpio de maíz y 0.5 g/L CaCl_2 y el resto de los componentes según la tabla V, el amortiguador se esterilizó por separado del resto de los componentes en autoclave a 121°C con presión de 15 lb/in^2 por 25 minutos. Después de la esterilización se mezcló el amortiguador con el resto de los componentes a temperatura ambiente y se ajustó a 10 el pH.

Los medios se inocularon con 5% de un cultivo de 24 horas en pericarpio modificado y se incubaron a 150 RPM de agitación, 28°C por 72 h, todo el diseño se realizó por triplicado. Para la toma de muestras, los matraces se dejaron sedimentar 5 minutos para permitir que las partículas de pericarpio se asentaran y no interfirieran con el pipeteo.

Las muestras fueron posteriormente centrifugadas por 5 segundos a $500\times g$ para eliminar cualquier rastro de pericarpio en el medio y se les midió el pH y la densidad óptica a 650 nm. Posteriormente se separó el paquete celular por centrifugación a $12000\times g$ por 5 minutos. Las células obtenidas fueron lavadas dos veces con 1 volumen de amortiguador 100 mM MOPS pH 7. Por último las células fueron resuspendidas en el volumen original y se dividió la muestra en dos partes, una para determinar el peso seco y la otra para determinar la actividad esterasa del ácido ferúlico.

Los efectos de los factores fueron observados sobre dos parámetros principalmente, el crecimiento bacteriano (capacidad de carga del sistema y la máxima velocidad específica de crecimiento) y la actividad enzimática (producción de feruloil esterasa) del *B. flexus* NJY2.

El modelo cuadrático, utilizando una ecuación polinomial de segundo orden, para estimar el modelo matemático y predecir la respuesta, está dado a continuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{14}X_1X_4 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde Y es la predicción de la respuesta, β_0 es la intercepción; $\beta_1\beta_2\beta_3$, son los coeficientes lineales; $\beta_{12}\beta_{13}\beta_{14}$, son las interacciones de los coeficientes y X son los niveles codificados. La calidad del ajuste al modelo polinomial fue determinado por el valor del coeficiente de determinación R^2 .

Los datos de crecimiento (peso seco) fueron ajustados a la ecuación 1, a través de regresión no lineal utilizando Polymath 6.0 (Control Data Corporation).

$$PS = \frac{PoK}{Po + (K - Po)e^{-rt}} \quad \text{Ec. 2}$$

En la ecuación 2, Ps es el peso seco, Po es la población del inóculo inicial, K es la capacidad de carga del sistema y t es el tiempo.

Se calculó la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}), utilizando la ecuación 2 en la que Ps_1 y Ps_2 corresponden a los valores de peso seco de dos puntos pertenecientes a la fase exponencial, mientras que t_1 y t_2 son los tiempos correspondientes.

$$\mu_{\max} = \frac{\log Ps_2 - \log Ps_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ec. 3}$$

El análisis de varianza (ANOVA) de cada parámetro fue realizado con el programa Statistica versión 6.0 (Soft Stat, Tulsa, OK, US).

3.8 Disposición de Residuos

Los residuos generados durante el desarrollo experimental de este proyecto fueron dispuestos como se describe a continuación:

Los medios de cultivo (líquidos) usados para las fermentaciones fueron esterilizados después de su uso, posteriormente se filtró con gasa para retener las partículas de gran tamaño, después el desecho líquido se dispuso en el drenaje y el sólido en bolsas especiales para residuos biológico-infeccioso.

Los reactivos usados para las determinaciones de actividad enzimática fueron desechados al contenedor para colorantes y/o solventes orgánicos no halogenados, según fuera el caso.

Los reactivos utilizados para la determinación de proteínas fueron almacenados en un contenedor especial para su tratamiento posterior por el Departamento de Residuos de la FCQ.

Los colorantes y residuos utilizados para las tinciones Gram fueron desechados al contenedor especial para colorantes y luego.

Los reactivos que estuvieron en contacto con acrilamida, fueron desechados en el contenedor especial para soluciones muy tóxicas o cancerígenas.

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Identificación molecular de los microorganismos

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se aislaron dos bacterias del nejayote NJY2 y NJY4. Estos microorganismos presentaron la capacidad de crecer en medios alcalinos e hidrolizar el ácido ferúlico de residuos de la industria de la tortilla.²⁶ Por lo anterior se procedió a identificarlos. Se realizó el análisis de las secuencias genéticas del 16S ARN alineando y comparando regiones correspondientes a las posiciones 45 a 526 que incluyen las regiones hipervariables V1-3³⁷, con secuencias de 18 especies de bacterias relacionadas, reportadas en bases de datos públicas. Como se aprecia en la Figura 6, los microorganismos aislados del nejayote fueron ubicados dentro del género *Bacillus* y filogenéticamente con un 99.8 y 100% de similitud al *Bacillus flexus*³⁸ para NJY2 y NJY4 respectivamente.

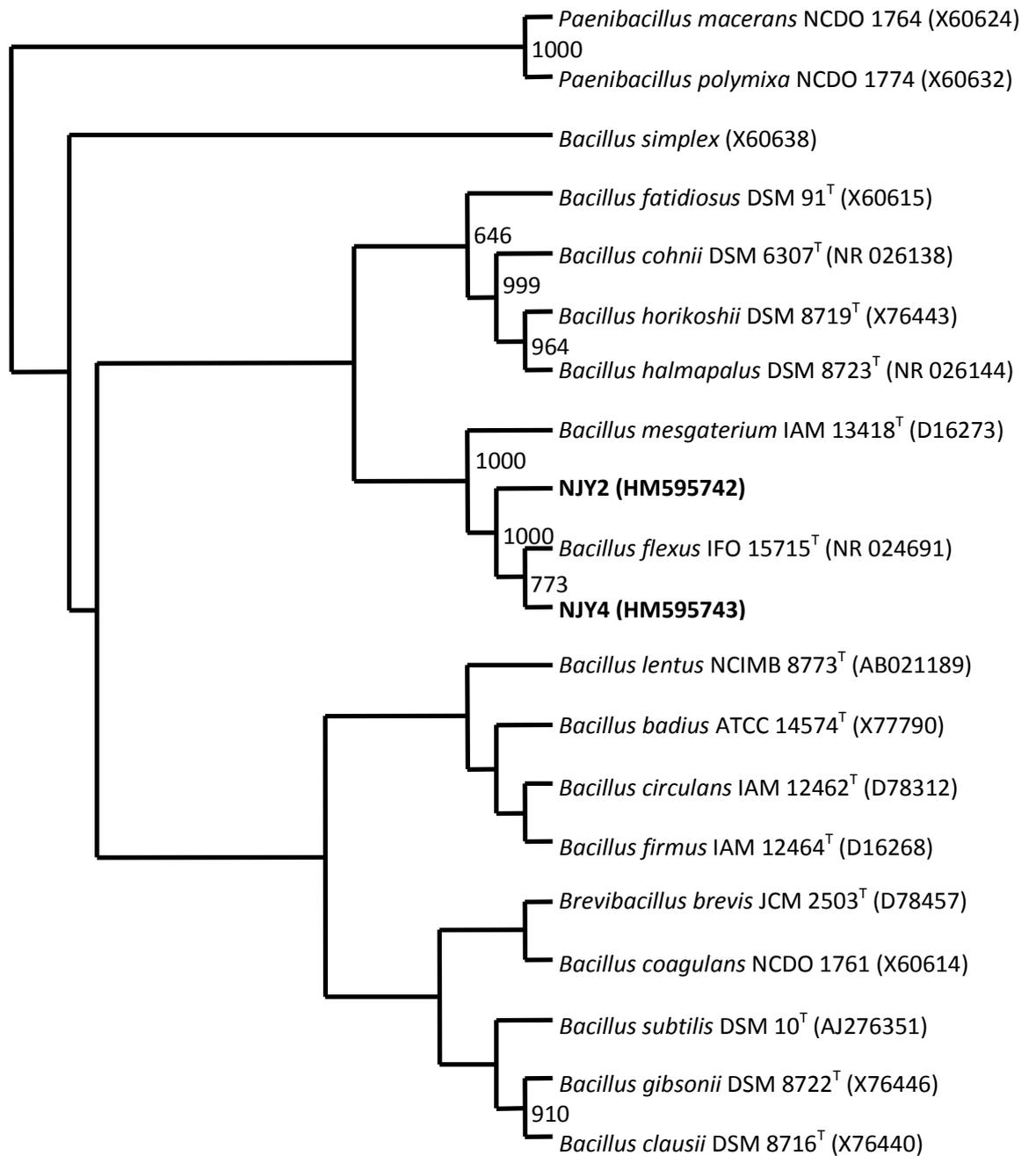


Figura 6. Árbol filogenético que muestra las relaciones taxonómicas de los microorganismos aislados del nejayote con cepas tipo. Los números de acceso al Gene bank se agregaron en el paréntesis.

Tabla VI. Resultado de las pruebas bioquímicas de *B. flexus* NJY2 y NJY4.

Objetivo	Resultado	
	NJY2	NJY4
Producción de indol	Negativa	Negativa
Producción de H ₂ S	Negativa	Negativa
Prueba de movilidad	Positiva	Positiva
Utilización de citrato como fuente de carbono	Negativa	Positiva
Fermentación de glucosa	Negativa	Negativa
Producción de acetoina	Negativa	Negativa
Reducción de nitratos Denitrificación	Positiva	Positiva
Oxidasa	Negativa	Negativa
Catalasa	Positiva	Positiva
Fermentación de azúcares	Positiva(color amarillo) Negativa (producción de gas)	Positiva(color amarillo) Negativa (producción de gas)
Hidrólisis de celulosa	Negativa	Negativa
Hidrólisis de almidón (pH8)	Positiva	Positiva
Hidrólisis de xilano	Positiva	Positiva
Hidrólisis de gelatina (pH 6-9)	Positiva	Positiva
Liberación de ácido ferúlico	Positiva	Positiva

4.2 Caracterización bioquímica de los microorganismos

4.2.1 Pruebas bioquímicas

Los microorganismos identificados como cepas de *Bacillus flexus*, fueron caracterizados bioquímicamente. Los resultados se muestran en la Tabla V.

Los microorganismos no produjeron H₂S o indol en el medio SIM; sin embargo, presentaron movilidad dentro de este medio semi-sólido. Es probable que esta característica sea originada por la presencia de flagelos en la bacteria.

La cepa NJY2 no utilizó el citrato como fuente de carbono, contrario a la cepa NJY4 que obtuvo un resultado positivo en esta prueba. Del producto de fermentación de azúcares, solo produjo ácido, confirmado por el vire del indicador rojo fenol a amarillo. Estas propiedades bioquímicas, así como la ausencia de la oxidasa y la producción de la enzima catalasa por el microorganismo, fueron indicativas de un miembro del género *Bacillus* de acuerdo al manual de Bergey.³⁴

4.2.2 Determinación de actividad hidrolítica

Se determinó la capacidad proteolítica extracelular de los microorganismos a través de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE), incluyendo gelatina en el gel separador e incubando a pH 6-9, tal como se describió en materiales y métodos. La mejor actividad proteolítica se observó a pH 8 y 9 (resultados no mostrados).

Los microorganismos también fueron capaces de crecer en agar almidón formando halos de claridad alrededor de las colonias después de teñir la placa con lugol, resultado que indica la producción de amilasas.

Por otro lado, las bacterias fueron capaces de crecer en placas de agar con celulosa, sin embargo, no hubo formación de halo de claridad después del tratamiento de tinción con el colorante rojo congo. Debido a que el medio de cultivo contiene otros componentes (polipeptona y extracto de levadura) que permiten el crecimiento del microorganismo sin la degradación de celulosa, se concluyó que no había producción de celulasas.

La actividad esterasa del ácido ferúlico de las cepas de *B. flexus* NJY2 y NJY4 se puso en evidencia al producir halos de claridad en un medio que contenía el éster etílico del ácido ferúlico.

4.2.3 Estudio del crecimiento de *B. flexus* NJY2 y NJY4

En la tabla VII se muestran los resultados de la capacidad de *B. flexus* NJY2 y NJY4 para crecer a diferente pH, temperatura y concentraciones de NaCl. *Bacillus flexus* NJY2 y NJY4 tuvieron la capacidad de crecer en un intervalo de temperatura entre 30 y 50°C, valores donde se desarrollan microorganismos mesófilos. Las temperaturas a las que se presentó mayor crecimiento fueron 40 y 50 °C. En los estudios de pH se observó que las bacterias presentaron mayor crecimiento en valores de 10-12; sin embargo, los microorganismos también

crecieron en pH's cercanos a la neutralidad (pH 7), característica de microorganismos alcalófilos facultativos.

Un gran número de microorganismos alcalófilos presentan capacidad de crecer en altas concentraciones de NaCl. Las cepas de *B. fexus* crecieron en medios que contenían concentraciones de NaCl hasta del 10% (p/v). Estos resultados indicaron que los microorganismos son halotolerantes.

Tabla VII. Resultados del estudio de tolerancia a NaCl, pH y temperatura.

Estudio	Resultados	
	NJY2	NJY4
Crecimiento en pH		
5	-	-
7	++	++
10	+++	+++
12	+++	+++
Crecimiento en NaCl		
2%	+++	+++
5%	+++	+++
7%	++	++
10%	+	+
Crecimiento en °C		
30	++	++
40	+++	++
50	+++	+++
60	-	-

4.2.4 Determinación cualitativa de la actividad esterasa del ácido ferúlico

Como una prueba rápida de confirmación de la presencia de EAF en las cepas, se añadieron 20 μ L de una suspensión de células en una caja de agar con etilferulato, observándose la presencia de un halo de claridad alrededor de la muestra colocada, confirmando la presencia de enzimas presentes en las células del cultivo.

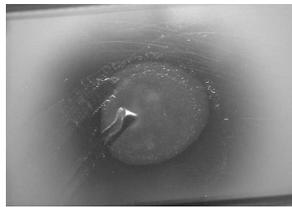


Figura 7. Determinación cualitativa de actividad en *B. flexus* NJY2

4.3.1 Ubicación de la actividad enzimática

Después de evidenciar la producción de esterases fenólicas por *B. flexus* NJY2 y NJY4, se procedió a determinar si la actividad enzimática estaba asociada a las células o era extracelular. Después de medir la actividad presente en suspensiones celulares y sobrenadantes de cultivo utilizando 4-NFF como sustrato, se concluyó que en ambos microorganismos la enzima se ubicaba principalmente asociada a las células (56 mU/mg de proteína en NJY2 y 29 mU/mg de proteína en NJY4), mientras que la actividad encontrada en la fracción extracelular fue mínima (2.2 mU/mg de proteína en NJY2 y 3.1 mU/mg de proteína en NJY4). Se decidió seguir el estudio utilizando la cepa NJY2 debido a que presentó la mayor actividad esterasa.

4.3.2 Efecto del pH en la actividad enzimática

Las enzimas producidas por microorganismos alcalófilos son de gran interés industrial por su capacidad de catalizar reacciones a pH alcalinos, principalmente si estas reacciones son de hidrólisis sobre ésteres.³⁹ Por lo anterior, se estudió el efecto que ejerce el pH sobre la actividad enzimática de la esterasa de ácido ferúlico. Estos estudios se realizaron midiendo la actividad presente en las células completas y en el sobrenadante de cultivos de *B. flexus* NJY2. Para este estudio el microorganismo fue crecido a pH 7 y 10 para comparar el efecto del pH de cultivo en la naturaleza de la enzima.

El comportamiento de la enzima asociada a células obtenida de cultivos realizados a pH 7 se muestra en la Figura 8. Se puede apreciar que la actividad esterasa máxima se obtuvo a pH 6 y decayó conforme se alcalinizaba el medio de reacción.

Por lo que respecta a la enzima asociada a células obtenidas de cultivos a pH 10, ésta presentó un comportamiento diferente. En la Figura 8 se observa que en pH 5-7 no se aprecia un cambio importante en la actividad; sin embargo, a pH 8 se obtiene el máximo y parece mantenerse hasta pH 9 disminuyendo en gran proporción a pH 10.

La enzima extracelular presentó un comportamiento diferente a la enzima asociada a células. Como se puede apreciar en la Figura 8, el máximo de actividad se presentó a pH 6, manteniendo una actividad mínima a pH 9 y 10, sin importar el pH del cultivo a partir del cual fue obtenida la enzima.

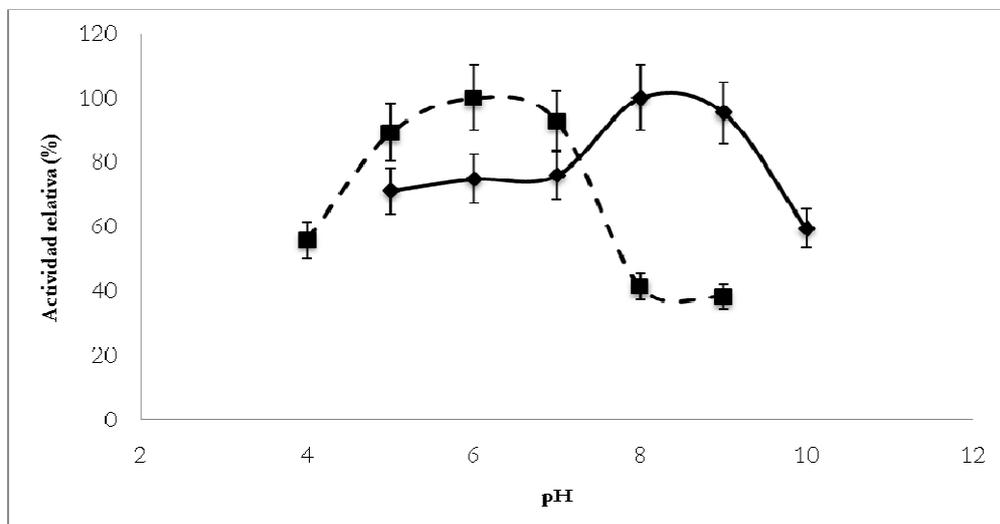


Figura 8. Efecto del pH en el comportamiento de la enzima asociada a células. —■—Células obtenidas de cultivos a pH 7 --♦-- Células obtenidas de cultivos a pH 10

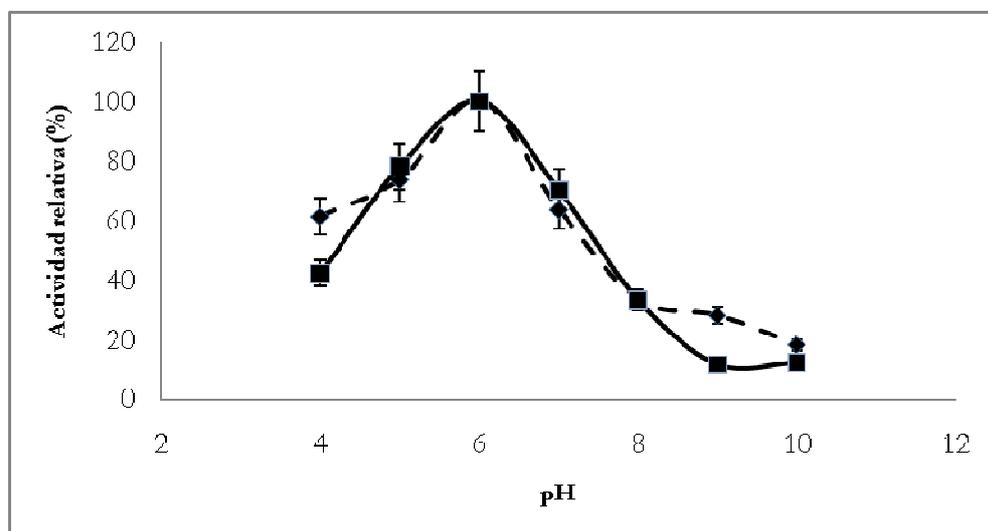


Figura 9. Efecto del pH en el comportamiento de la enzima extracelular.--♦-- Enzima presente en el sobrenadante de un cultivo a pH 7. —■— Enzima presente en el sobrenadantes de un cultivo a pH 10

4.3.3 Efecto de la fuente de carbono en la producción de la esterasa del ácido ferúlico de *Bacillus flexus* NJY2

Se determinó el efecto de diferentes fuentes de carbono en la producción de la esterasa de ácido ferúlico de *B. flexus* NJY2. Como se puede apreciar en la Figura 9, la actividad asociada a células se produjo en todos los medios de cultivo; sin embargo, los niveles de actividad más altos se obtuvieron al utilizar fuentes de carbono que contenían ácido ferúlico en forma esterificada (pericarpios de maíz, trigo y arroz) y/o libre (medio LB con ácido ferúlico adicionado).

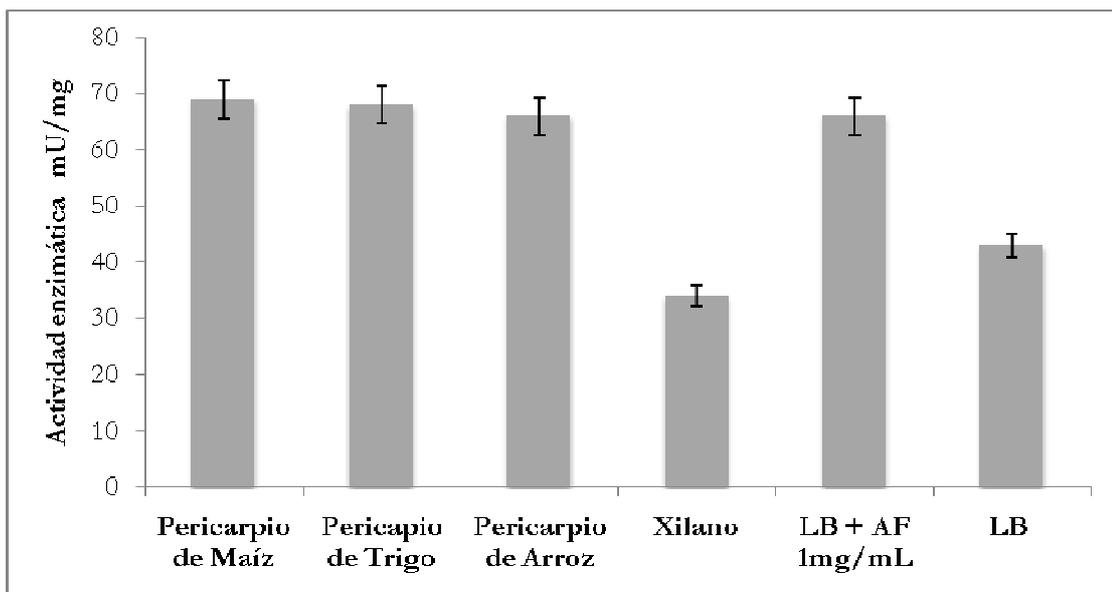


Figura 10. Efecto de la fuente de carbono en la producción de esterasas del ácido ferúlico por *B. flexus* NJY2.

Las fuentes de carbono sin ácido ferúlico presentaron las menores actividades (medios xilano y LB), Cuando se adicionado AF en concentraciones de 2 mg/mL, este inhibió el crecimiento microbiano y con eliminó cualquier rastro de actividad enzimática asociada a él.

4.4 Determinación de la masa molecular de la esterasa de ácido ferúlico

La masa molecular de la esterasa de ácido ferúlico fue determinada por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes. Para lo cual con el fin de identificar la banda de proteína con actividad esterasa, los geles de acrilamida se lavaron para quitar el exceso de SDS e incubaron sobre una placa de agar que contenía 0.1% (p/v) etilferulato. En la Figura 10, se aprecia un halo de claridad en el frente del gel indicando que la enzima posee una masa molecular muy pequeña. Para mejorar la resolución, se decidió modificar las condiciones electroforéticas.

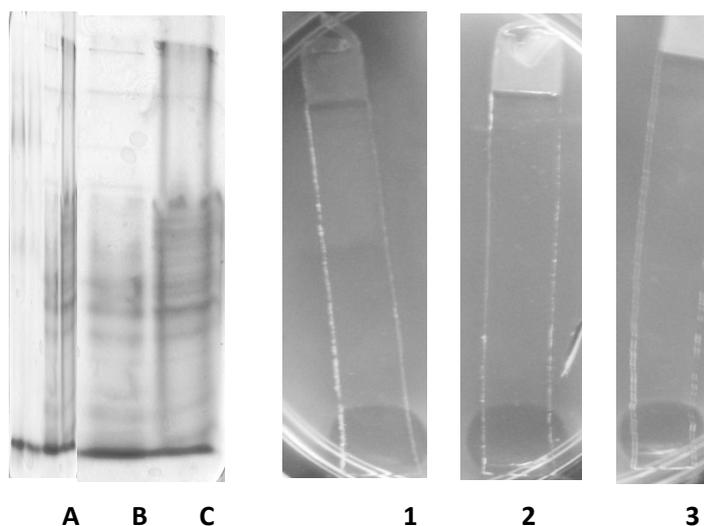


Figura 11. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en tris/glicina. **Muestras teñidas con azul de coomasie** A. DEPOL 740L (Control positivo) B. Sobrenadante concentrado 30 veces C. Células completas. **Muestras Zimogramas** 1. DEPOL 740 L 2. Sobrenadante concentrado 30 veces 3. Células completas

Los geles fueron desarrollados utilizando el amortiguador tricina en lugar del Tris/glicina. Como se puede observar en la Figura 10 las proteínas presentaron menor movilidad y se pudo determinar que la masa molecular de la esterasa de ácido ferúlico de *B. flexus* fue de 9.8 kDa. Este dato se obtuvo utilizando como referencia las movilidades de estándares proteínicos de masa molecular conocida (carril A de la Figura 11).

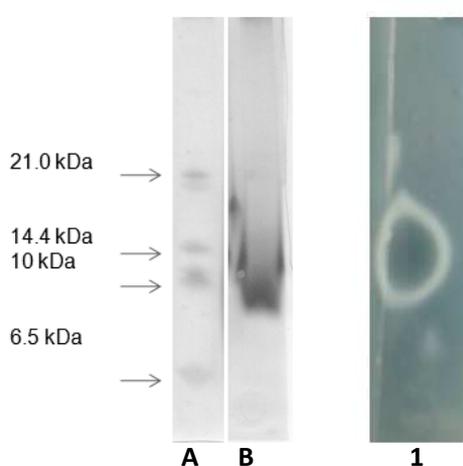


Figura 12. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en tricina. **Muestras teñidas con azul de Coomassie:** **A.** Marcador de peso molecular, **B.** Extracto de enzima con SDS al 10%. **Zimograma 1.** Extracto de enzima con SDS al 10%

4.5 Optimización de la producción de la feruloil esterasa de *B. flexus* NJY2

4.5.1 Análisis del crecimiento de *B. flexus* en los diferentes tratamientos

Para optimizar las condiciones de producción de la esterasa de ácido ferúlico de *B. flexus* NJY2, se utilizó la metodología de superficie de respuesta soportada por un diseño central compuesto. Las variables involucradas en los medio de cultivo se establecieron en el Tabla V.

Primero se analizó el comportamiento del crecimiento del *B. flexus* NJY2 en los diferentes tratamientos del diseño de experimentos. Las curvas de crecimiento del microorganismo en los diferentes medios de cultivo se presentan en las Figuras 13 y 14 con su respectivo modelo matemático.

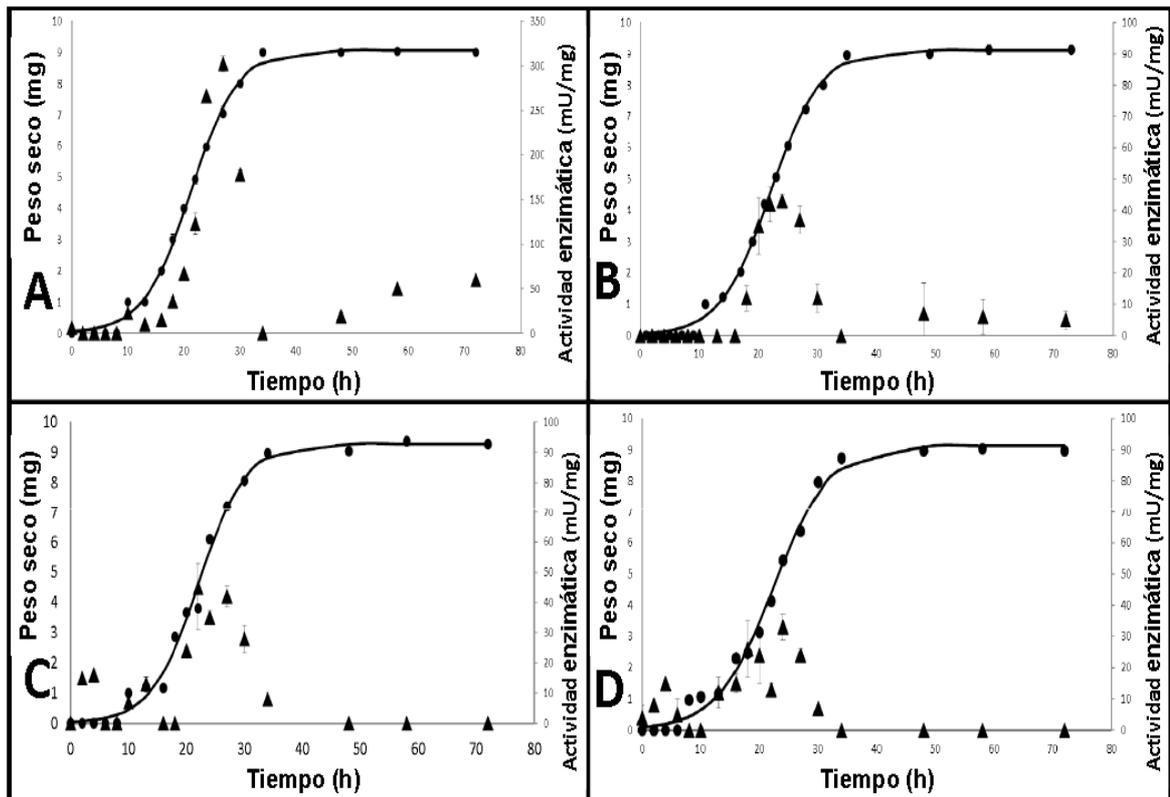


Figura 13. Cinética de crecimiento y actividad de *B. flexus* NJY2 usando extracto de levadura como fuente de nitrógeno. (A) Tratamiento 1 (B) Tratamiento 2 (C) Tratamiento 3 (D) Tratamiento 4. (●) Datos experimentales de peso seco (—) Modelo de regresión no lineal (▲) Actividad esterasa del ácido ferúlico.

Se observa que las cinéticas de crecimiento de *B. flexus* NJY2 en todos los tratamientos son similares, caracterizadas por una fase lag de 10 horas aproximadamente, seguida de un crecimiento exponencial de 15 horas de duración.

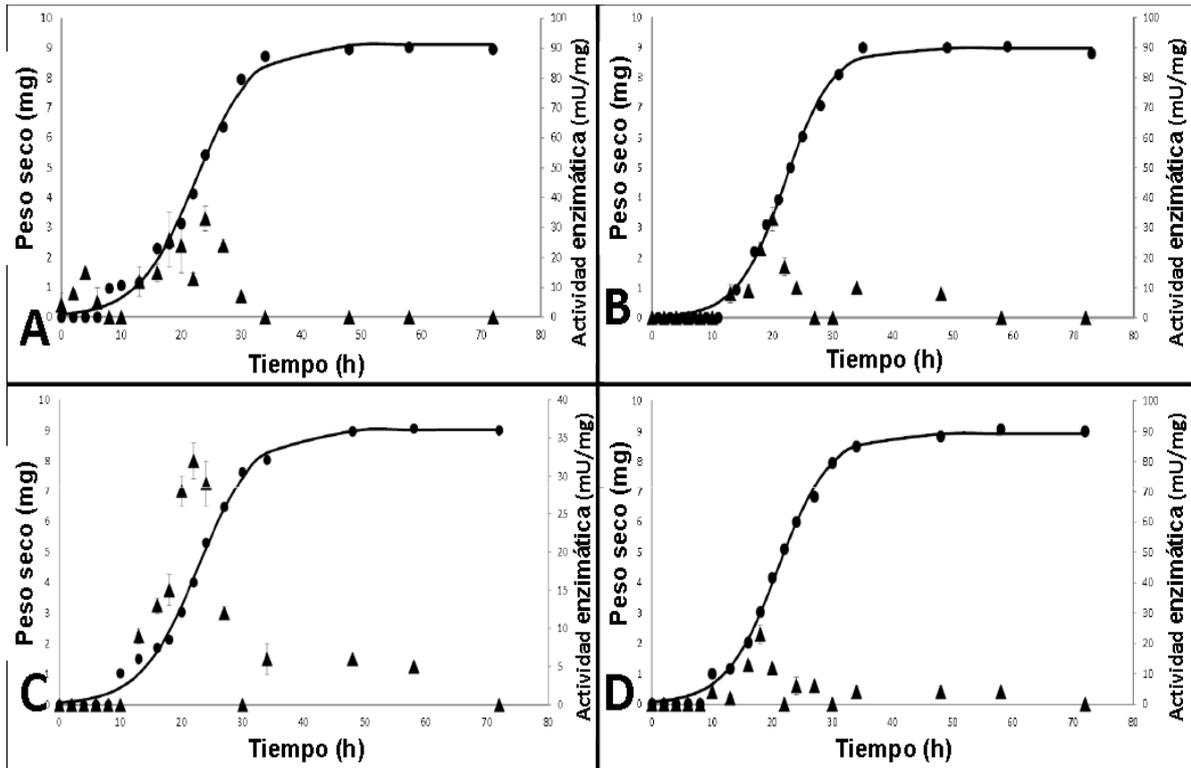


Figura 14. Cinética de crecimiento y actividad de *B. flexus* NJY2 usando peptona de caseína como fuente de nitrógeno. (A) Tratamiento 5 (B) Tratamiento 6 (C) Tratamiento 7 (D) Tratamiento 8. (●) Datos experimentales de peso seco (–) Modelo de regresión no lineal (▲) Actividad esterasa del ácido ferúlico.

Posteriormente se calcularon las constantes de crecimiento del *B. flexus* NJY2 en cada uno de los tratamientos, los resultados obtenidos de velocidad específica de crecimiento máxima $\mu_{\text{máx}}$ y la carga del sistema K se mencionan en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Promedio de las velocidades específicas máximas de crecimiento en cada tratamiento.

T	K (mg/mL) ± desviación estándar	$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹) ± desviación estándar
1	9.06 ± 0.02	0.044 ±0.0004
2	9.11 ± 0.08	0.043 ±0.0006
3	9.27 ± 0.04	0.051 ±0.0006
4	9.13 ± 0.06	0.044 ±0.0004
5	8.97 ± 0.03	0.046 ±0.0010
6	9.33 ± 0.05	0.044 ±0.0008
7	9.01 ± .01	0.047 ±0.0002
8	8.92 ± 0.02	0.042 ±0.0002

En todos los tratamientos se obtuvieron valores de K muy similares (Tabla VIII), sin embargo, se aprecia que el mayor K (9.33 mg/mL, tratamiento 6) se obtuvo al utilizar peptona de caseína como fuente de nitrógeno, en combinación con el amortiguador de sodio al menor nivel (2 g/L), sin embargo, con el aumento en la concentración del mismo amortiguador al nivel alto (15 g/L), produce una pérdida en la capacidad de carga del sistema al mínimo nivel posible obtenido en todos los tratamientos (8.92 mg/mL). El cambio en la concentración del amortiguador de sodio utilizando en combinación con extracto de levadura no produjo un cambio notable en el valor de K .

La combinación de extracto de levadura con el amortiguador de calcio tuvo un efecto directamente en la capacidad de carga, con el aumento de la

concentración del amortiguador, se incrementa el valor de K , mientras que el cambio en la concentración del amortiguador de sodio no produce un efecto remarcable. En el análisis de ANOVA (Tabla IX), se evaluó la significancia de las variables mediante el valor- p , entre más pequeño el valor, mayor es el efecto de la variable sobre la respuesta. El tipo y la concentración de la fuente de nitrógeno, así como las interacciones entre el tipo de catión del amortiguador y el la naturaleza de la fuente de nitrógeno fueron los factores más significantes que afectan el valor de K ($p \geq 0.001$).

Tabla IX Análisis de varianza de los resultados de crecimiento y actividad enzimática.

MS-Media cuadrática. F- Valor de Fischer. p- Nivel de significancia.

Table 2. Análisis de varianza (ANOVA) del DCC

F	K (mg)			μ_{max} (h ⁻¹)			Enzymatic activity (mU/mg)		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	P
X ₁	0.0122	5.47	0.032	0.000075	192.2	0.000	26433.84	900.4	0.006
X ₂	0.0067	3.00	0.102	0.000016	40.7	0.000	36309.26	1236.8	0.000
X ₃	0.0417	18.65	0.000	0.000004	10.6	0.004	37786.47	1287.1	0.000
X ₄	0.0241	10.81	0.004	0.000001	1.9	0.184	18866.43	642.6	0.007
X ₁ X ₂	0.1551	69.34	0.000	0.000075	192.2	0.000	26433.84	544.0	0.000
X ₁ X ₃	0.0498	22.30	0.000	0.000016	40.7	0.000	36309.26	752.8	0.000
X ₁ X ₄	0.1356	60.64	0.000	0.000004	10.6	0.004	37786.47	1039.2	0.000

La velocidad máxima específica de crecimiento $\mu_{\text{máx}}$ fue afectada directamente por la naturaleza de la fuente de nitrógeno, obteniéndose los valores más altos de velocidad cuando se utilizó el extracto de levadura (0.051, 0.047, 0.046 h⁻¹) independientemente de la concentración y el tipo de catión utilizado en el amortiguador. De acuerdo con el análisis de ANOVA, los principales factores que afectan la $\mu_{\text{máx}}$ son el tipo de catión y la concentración del amortiguador, y la naturaleza de la fuente de nitrógeno, además de la interacción entre los mismos factores ($p \geq 0.001$).

4.5.2 Análisis de la actividad enzimática del *B. flexus* en todos los tratamientos

En la Tabla X se muestran los valores máximos de actividad enzimática presentada por *B. flexus* NJY2 y el tiempo en el que se observó esta actividad, presentándose la máxima actividad enzimática durante la fase exponencial en todos los casos. Se puede apreciar que la máxima producción de actividad enzimática ocurrió con el tratamiento 1 (2g/L CaCO₃, 5 g/L extracto de levadura) y el tratamiento 5 (Na₂CO₃ 2 g/L, extracto de levadura 10 g/L).

El análisis de varianza realizado con Statistica 7.0 a los resultados de actividad esterasa del ácido ferúlico se presentaron en la Tabla IX. El ANOVA de los resultados de la actividad feruloil esterasa, confirmó que solo dos factores no fueron significantes para la actividad enzimática, estos fueron catión usado en el amortiguador y la concentración de la fuente de nitrógeno ($p \geq$

0.001), el resto de los factores así como sus interacciones obtuvieron un valor-*p* igual o menor a 0.001.

Tabla X. Máxima actividad EAF de cada tratamiento (los valores representan los triplicados de cultivos con su respectiva desviación estándar).

T	EAF (mU/mg) ±desviación estándar	Tiempo de máxima actividad enzimática (horas)
1	302.4 ± 8.9	27
2	35.0 ± 1.6	24
3	45.7± 8.0	27
4	33.0 ± 4.1	24
5	67.7 ± 4.6	22
6	33.8 ± 3.5	20
7	26.3 ± 4.6	22
8	22.8 ± 3.5	20

Para observar mejor el efecto de las variables utilizadas en la producción de la esterasa del ácido ferúlico de *B. flexus* NJY2, se construyeron modelos de contorno en 2D.

Las gráficas de contorno se modelaron en función de dos factores manteniendo los demás a valores constantes. Primero se utilizó el extracto de levadura como factor fijo (Figura 14). Se observó el aumento de la actividad enzimática al disminuirse las concentraciones de los amortiguadores utilizados,

tanto de calcio y sodio, mientras que la actividad disminuye cuando se utilizan concentraciones altas.

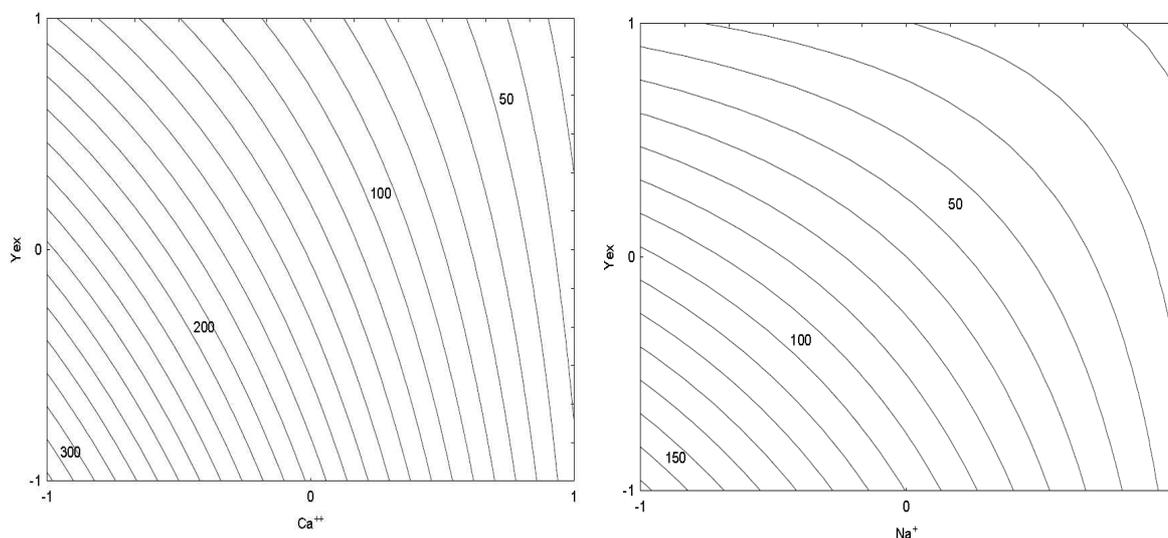


Figura 15. Superficie de respuesta de los tratamientos con extracto de levadura (A) Cation del buffer (Ca) (-1, 2 g/L; 1, 15g/L) Tipo de fuente de nitrógeno (Extracto de levadura) (-1, 5 g/L; 1 10g/L)
(B) Cation del buffer (Ca) (-1, 2 g/L; 1, 15g/L) Tipo de fuente de nitrógeno (Extracto de levadura) (-1, 5 g/L; 1 10g/L)

Después se modeló la actividad enzimática producida por *B. flexus* NJY2 en función de la peptona de caseína como factor fijo (Figura 15). Se observó que la actividad enzimática aumenta cuando se utiliza el catión de calcio en el amortiguador en pequeñas concentraciones o el de sodio en altas concentraciones. Sin embargo, los niveles de actividad enzimática no son comparables a los alcanzados por el uso de extracto de levadura en el medio.

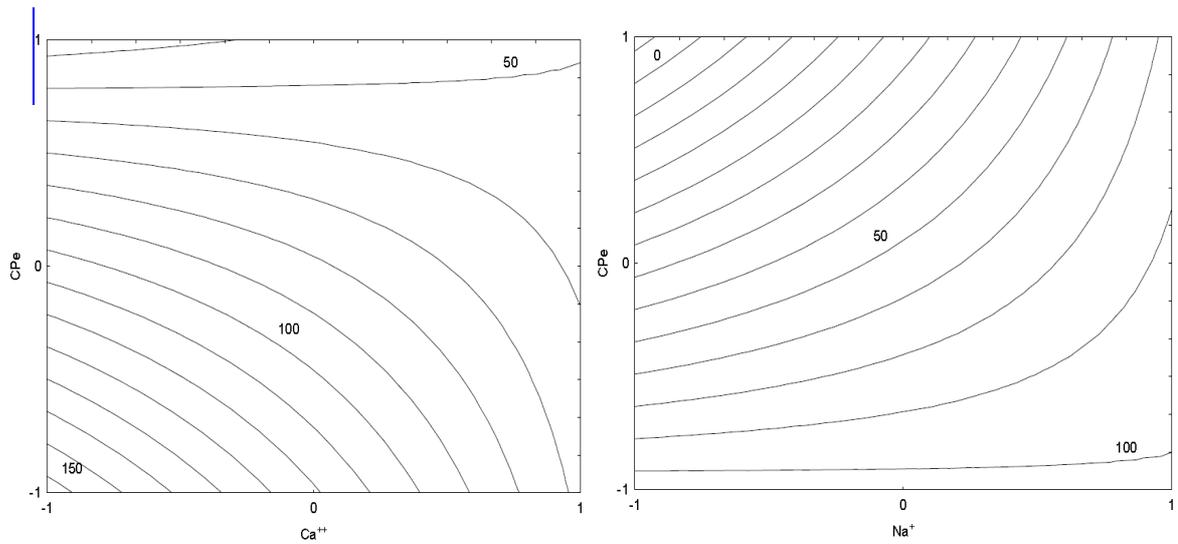


Figura 16. Superficie de respuesta de los tratamientos con peptona de caseína (A) Cation del buffer (Ca) (-1, 2 g/L; 1, 15g/L) Tipo de fuente de nitrógeno (Peptona de caseína (-1, 5 g/L; 1 10g/L)
 (B) Cation del buffer (Ca) (-1, 2 g/L; 1, 15g/L) Tipo de fuente de nitrógeno (Peptona de caseína) (-1, 5 g/L; 1 10g/L)

Cada curva en la gráfica representa un número infinito de combinaciones de dos factores manteniendo los otros en un nivel medio. El nivel más alto de actividad se encuentra conforme decrece el tamaño de la elíptica. Esta interacción permite estimar los valores actividad enzimática a ciertos valores dados de los factores, con ayuda de los coeficientes obtenidos a partir del análisis ANOVA, modelo dado a continuación:

$$\begin{aligned}
 EAF(mU / mg) = & 70.78 + 33.18X_{BCat} + 38.89X_{BCon} + 39.67X_{NS} + 28.03X_{NCon} \\
 & + 25.03X_{BCat}X_{BCon} + 30.34X_{BCat}X_{NS} + 35.65X_{BCat}X_{NCon}
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 4}$$

Por último se graficaron los valores obtenidos con la ecuación anterior, contra los valores experimentales (Figura 17), para estimar la calidad del

modelo propuesto. Una buena correlación fue observada y expresada como un coeficiente de regresión ($R^2 = 0.0978$).

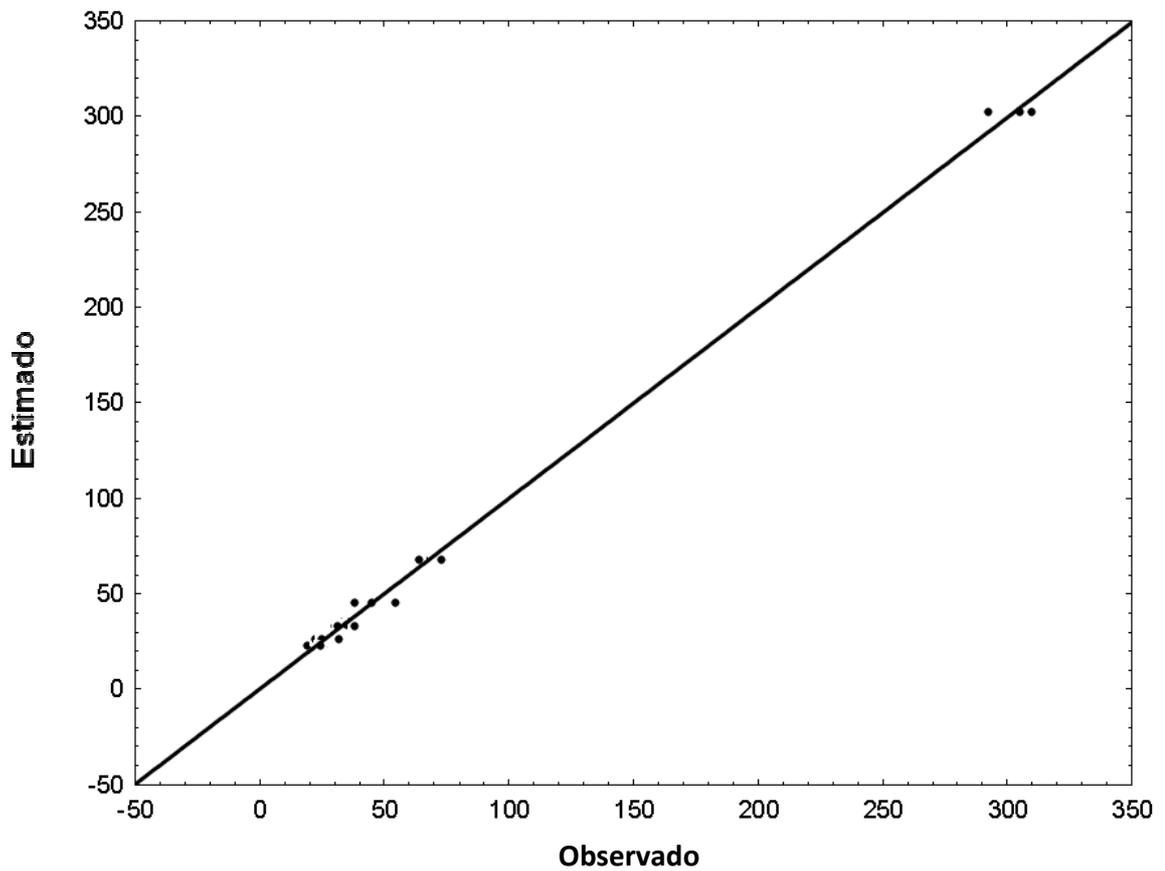


Figura 17. Gráfica de valores estimados contra observados de la actividad esterasa del ácido ferúlico.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

El género *Bacillus* es conocido por tener una gran versatilidad en los procesos industriales, debido a gran capacidad hidrolítica y a tolerar ambientes hostiles, donde es capaz de sobrevivir y producir enzimas que pueden actuar bajo estas condiciones extremas.^{40,41} En este caso los microorganismos aislados del nejayote e identificados bioquímica y genéticamente como *B. flexus* NJY2 y NJY4, no fueron la excepción pues demostraron capacidad para sobrevivir y funcionar en ambientes neutros y alcalinos. Así mismo, presentaron capacidad para hidrolizar sustratos naturales y sintéticos, siendo la principal actividad de interés en este estudio la esterasa de ácido ferúlico de la cepa NJY2. Estas enzimas se obtienen principalmente de fuentes fúngicas que trabajan en condiciones cercanas a la neutralidad, de aquí radica la importancia de encontrar nuevas fuentes de producción de esterases del ácido ferúlico debido a que pueden presentar variabilidad en la especificidad y facilidad de obtención a partir de las fermentaciones.⁴²

El comportamiento de la EAF de *B. flexus* NJY2 frente al pH estuvo directamente relacionado con las condiciones de cultivo del microorganismo, de tal manera que cuando *B. flexus* fue cultivado a pH 7, el pH al cual se determinó la máxima actividad correspondió a 6, mientras que cuando fue crecido en condiciones alcalinas (pH 10) la actividad máxima determinada se obtuvo a pH 8. Diversas hipótesis pueden ser plantadas para explicar este fenómeno.

La primera hipótesis planteada propuso que *B. flexus* NJY2 producía dos tipos de EAF, una enzima inducida en pH neutro con una actividad máxima detectado a pH 6 y otra enzima inducida en pH alcalino con capacidad de catalítica máxima detectada a pH 8. Esta hipótesis fue descartada pues se elaboraron extractos libres de células utilizando tanto cultivos obtenidos a pH 7 como a pH 10 y en ambos casos la enzima presentó la máxima actividad a pH 6. Esto nos indicó que independientemente del pH del cultivo el microorganismo produce la misma enzima. Sin embargo, quedaba la duda si la enzima extracelular era resistente a valores de pH's alcalinos y como se muestra en la Figura 7, la enzima extracelular presentó su máxima actividad a pH 6 independientemente de las condiciones de cultivo. Al parecer esta enzima es la misma que la asociada a células y es excretada al medio de cultivo posiblemente debido a un proceso de lisis celular.

Contrariamente a lo esperado, la enzima producida por *B. flexus* NJY2 posee poca actividad bajo condiciones alcalinas y únicamente puede realizar su función cuando está asociada a la células cultivadas bajo condiciones alcalinas.

Esto es debido a estrategias utilizadas por el microorganismo para proteger a sus enzimas y a otros sistemas proteicos contra la desnaturalización.

La primera de estas opciones es mantener a la enzima ligada a membrana o en el espacio periplasmático, donde no puede ser atacada fácilmente por el ambiente alcalino exterior.

Una alternativa relacionada con la anterior es desarrollar, bajo condiciones alcalinas, una pared celular hasta un 20% más gruesa y con un incremento en la cantidad de ácido aspártico, glutámico, galacturónico, glucónico y fosfórico presentes en los ácidos teicoicos.^{3,4,43} Los ácidos teicoicos generados bajo condiciones alcalinas ocasionan una gran densidad de cargas negativas alrededor de la pared celular las cuales permiten la absorción de iones de sodio e hidronio y repele los iones hidroxilo evitando su participación en la hidrólisis de la pared celular y el contacto con las enzimas asociadas a células o periplasmática. Este mecanismo ayuda a mantener condiciones cercanas a la neutralidad en los alrededores de la membrana celular.¹ Los microorganismos alcalófilos facultativos al crecer bajo condiciones cercanas a la neutralidad, no desarrollan estas características en la pared celular y cuando las células obtenidas en medios neutros son puestas en contacto con medios alcalinos, se inicia un proceso de lisis química y enzimática de la pared celular exponiendo las enzimas periplasmáticas y/o asociadas a la membrana celular al medio de reacción.

Las explicaciones anteriores y los resultados obtenidos nos indican que la enzima la EAF sintetizada por *B. flexus* NJY2 no es capaz de trabajar bajo condiciones alcalinas. El microorganismo crecido bajo condiciones alcalinas crea un microambiente neutro ya que la pared celular evita el contacto de la enzima con el medio de reacción de tal manera que se puede apreciar actividad bajo condiciones alcalinas (Figura 16 A). Cuando *B. flexus* crece bajo condiciones neutras, este efecto protector no está presente y la enzima queda expuesta al medio de reacción (Figura 16 B y C).

La esterasa del ácido ferúlico de *Bacillus flexus* NJY2, puede ser utilizada entonces como un biocatalizador de células completas lo cual asegura estabilidad de la enzima en ambientes alcalinos, bajo costo en la preparación y facilidad en la recuperación del biocatalizador, entre otros beneficios. Existe un escaso número de géneros bacterianos con capacidad para sintetizar EAF. Entre los reportados en la literatura se encuentran *Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Fibrobacter*, *Clostridium* y *Bacillus*. Respecto al género *Bacillus*, no existen estudios referentes a la caracterización de sus enzimas sólo se conoce que, al igual que en *B. flexus* NJY2, las EAF están asociadas a la células.

En este estudio además de caracterizar el efecto del pH sobre la actividad de la enzima se determinó que la enzima tiene una masa molecular de 9.8 kDa. Esta enzima es muy pequeña respecto a otras EAF reportadas (con masas moleculares de 20-200 kDa), lo que podría indicarnos que la banda de actividad observada sobre geles que contienen etilferulato, correspondan a unidades monoméricas de la enzima o bien a productos de procesamiento proteolítico

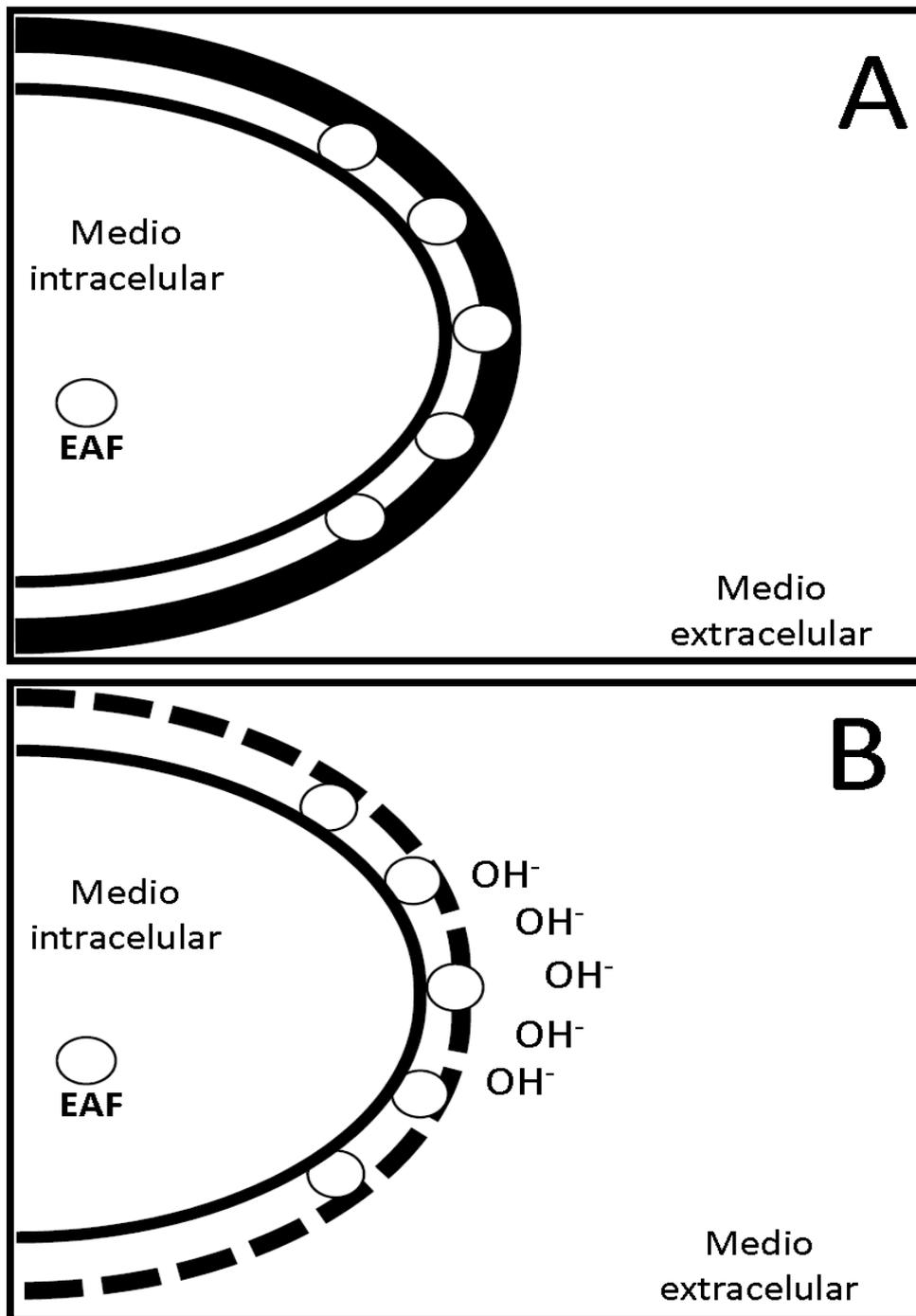


Figura 16 (A y B) Representación de la pared celular de *B. flexus* NJY2 desarrollada en medio neutro. Los círculos representan la EAF. B. Representación del comportamiento de la pared celular de *B. flexus* NJY2 desarrollada en medio neutro y posteriormente expuesta a pH alcalino

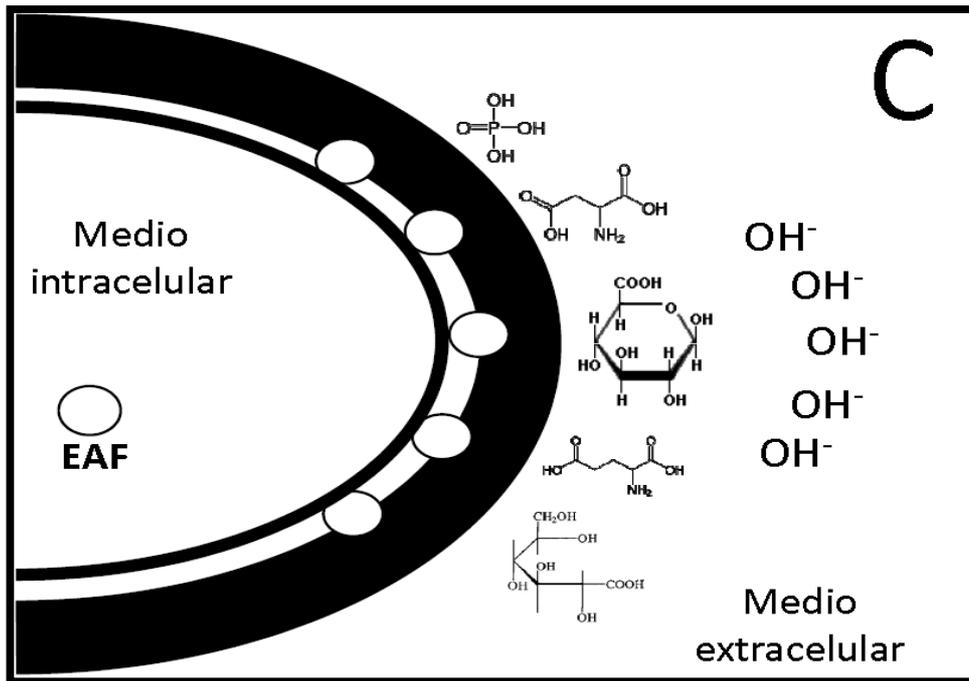


Figura 16(C) Representación de la pared celular de *B. flexus* NJY2 desarrollada en medio alcalino y sus mecanismos de protección y resistencia en medios de reacción alcalinos.

pues el microorganismo produce proteasas. A pesar de que no han sido reportadas EAF con masas moleculares menores a 20 kDa se conoce la existencia de péptidos de hasta 3 kDa con actividad EAF .⁴⁴

Debido al interés comercial en las EAF, es importante estudiar los factores involucrados en su producción. Reportes en la literatura indican que el ácido ferúlico posee actividad antimicrobiana²³; sin embargo, en concentraciones menores a 1 mg/mL presentó efectos estimulatorios sobre la producción de la EAF de *B. flexus* NJY2. De acuerdo a los resultados presentados, no es

necesaria la presencia de ácido ferúlico para inducir la producción de la enzima; sin embargo, su presencia ya sea en forma libre o esterificada duplica la producción de la enzima.⁴⁵ Cabe mencionar que concentraciones de ácido ferúlico mayores a 1 mg/ml disminuyeron la producción de la enzima muy posiblemente por la inhibición en el crecimiento del microorganismo. En muchos microorganismos la síntesis de EAF es acompañada de la síntesis de xilanasas pues son enzimas con actividad sinérgica. Por lo anterior se ha pensado que la sola presencia de xilano o hemicelulosa (libre de ácido ferúlico) es necesaria para la producción de la enzima. En este estudio se concluyó que no es necesaria la presencia de hemicelulosa o algún otro azúcar para inducir la producción de la enzima.

En este mismo sentido se realizó la optimización de la producción de la enzima utilizando como variables la concentración de amortiguador, la naturaleza del catión del amortiguador, así como la concentración y naturaleza de la fuente de nitrógeno. Estos factores influyeron de manera importante en la producción de la enzima y en menor proporción en el crecimiento del microorganismo. La velocidad específica máxima de crecimiento de *B. flexus* NJY2 no fue un parámetro fácilmente variable, ya que los valores fueron muy similares a pesar de las variaciones en la composición y las concentraciones de los medios de cultivo, al contrario del comportamiento de otros *Bacillus* en el cual la velocidad de crecimiento tuvo marcadas diferencias de hasta 88 y 97.5%.^{46,47} Las variables que lograron un mayor efecto en los valores de $\mu_{\text{máx}}$ fueron la concentración del amortiguador y la naturaleza del catión. A este

respecto es necesario recalcar que *B. flexus* NJY2 fue aislado de nejayote, un residuo agroindustrial con altos contenidos de calcio, por lo que el microorganismo pudo haber desarrollado durante el transcurso de su evolución sistemas fisiológicos con afinidad a este catión.⁴⁸

Por lo que respecta a la producción de la enzima, en todos los casos ésta fue producida en la fase exponencial por lo que se considera que está asociada al crecimiento del microorganismo. Al contrario de lo observado para la velocidad específica de crecimiento, las variables del diseño de experimentos ejercieron un efecto apreciable en la producción de la EAF. Los modelos de contorno realizados con Statistica 7.0 permitieron observar la inclinación de la superficie indicando que el calcio en combinación con una pequeña concentración de extracto de levadura fueron las variables que permitieron una mayor producción de enzima. Esta actividad destaca de manera significativa a los valores reportados en la literatura para cualquier especie de *Bacillus* y *Lactobacillus*, y es comparable con algunas especies de *Streptomyces*. Es de destacar la influencia del extracto de levadura y la concentración de calcio para la producción enzimática, ya que en los tratamientos 1 y 5, que contenían este componente a diferentes concentraciones, el microorganismo produjo una mayor cantidad de enzima (302 y 67 mU/mg proteína⁻¹ respectivamente). El extracto de levadura es una fuente de aminoácidos que permite al microorganismo crecer y producir enzimas^{49,50}; sin embargo, un exceso de extracto de levadura puede impedir el uso de sustratos que estimulan o inducen la producción de la enzima.^{51,52}

Por lo que respecta al calcio, éste puede ser esencial tanto para la actividad enzimática^{53,54} como para ayudar a la estabilidad enzimática.⁵⁵ Sin embargo, en este caso, la mejor hipótesis es que la bacteria necesita calcio para producir y/o activar la enzima; sin embargo, altas concentraciones de este catión divalente ocasionan ya sea una baja producción de enzima o inactivación de la misma. El calcio juega un papel importante en el crecimiento celular pues ayuda a regular la presión osmótica de la pared y membrana celular, manteniendo íntegras estas estructuras y brindando una mejor protección a la esterasa del ácido ferúlico. Sin embargo, también puede participar en un rol intracelular, específicamente en la señalización intracelular para la transcripción.⁵⁶

Finalmente, se corroboró que los datos experimentales de la actividad enzimática se ajustan muy bien a los valores previstos por el modelo cuadrático elaborado y que la optimización de la enzima feruloil esterasa (4.28 veces mas actividad que el medio sin optimizar), es comparable a estudios que siguieron la misma estrategia de optimización de MSR acoplada a un Diseño Central Compuesto, donde se obtuvieron 4.4 y 3 veces más de actividad en amilasas y xilanasas respectivamente.^{27,32} Incluso son mayores a estudios con resultados de 1.4 veces y 2 veces más actividad de xilanasas y cutinasas.^{28,33}

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- Se aislaron dos microorganismos del nejayote los cuales fueron identificados filogenéticamente como cepas de *Bacillus flexus* NJY2 y NJY4 y bioquímicamente como microorganismos alcalófilos facultativos y halotolerantes.
- *B. flexus* NJY2 y NJY4 son productores de enzimas hidrolíticas como proteasa, amilasas y esterasa del ácido ferúlico, principalmente la cepa NJY2.
- La masa molecular de la esterasa del ácido ferúlico de *B. flexus* NJY2 desnaturalizada con SDS es de 9.8 kDa
- Si bien la EAF de *B. flexus* NJY2 es no es una enzima alcalina, cuando se encuentra asociada a célula es capaz de trabajar en un pH por arriba de la neutralidad (pH 8) con un alto potencial hidrolítico al ser capaz de hidrolizar ésteres sintéticos y naturales del ácido ferúlico.
- Entre los factores que influyen principalmente en la actividad EAF, se encuentra la concentración de ácido ferúlico, que en concentraciones menores a 1 mg/mL estimula casi al doble la producción de la enzima, la presencia de calcio y principalmente el extracto de levadura como fuente de nitrógeno que en concentraciones de 2 g/L y 5 g/L respectivamente optimizaron la actividad enzimática hasta 302 mU/mg de proteína.

- Dentro de las especies de *Bacillus*, esta es la mayor actividad esterasa del ácido ferúlico lograda hasta ahora.

ANEXO 1

**Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic
Bacillus flexus strains from maize processing waste water
(nejayote)**

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic *Bacillus flexus* strains from maize processing waste water (nejayote)

M. Sanchez-Gonzalez¹, A. Blanco-Gamez¹, A. Escalante², A.G. Valladares¹, C. Olvera² and R. Parra³

¹ Area Academica Quimico Farmaceutico Biologo, Facultad de Ciencias Quimicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon, Mexico

² Departamento de Ingenieria Celular y Biocatalisis, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³ Centro del Agua para América Latina y el Caribe, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico

Keywords

alkaliphile, *Bacillus flexus*, nejayote, phenolic acid esterases, tortilla industry.

Correspondence

Monica Sanchez-Gonzalez, Av. Pedro Alba s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, Mexico.
E-mail: monica.sanchezgn@uanl.edu.mx

2010/1185: received 9 July 2010, revised 13 December 2010 and accepted 31 January 2011

doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03021.x

Abstract

Aims: This work describes the isolation and characterization of two new alkaliphilic micro-organisms present in nejayote.

Methods and Results: Samples of fresh industrial nejayote were plated on nejayote medium and incubated for 4 days at 37°C. Isolates were identified based on morphological and physiological characteristics, as well as 16S rDNA sequence analysis. Two gram-positive strains, NJY2 and NJY4, able to hydrolyse starch, xylan, and gelatin were isolated from nejayote. Comparative sequence analysis of 16S rDNA and phylogenetic studies indicate that the micro-organisms studied were closely related to members of the *Bacillus flexus* species. The strains were identified as facultative alkaliphilic salt tolerant bacteria. Isolate NJY2 produced cell associated phenolic acid esterases, able to release ferulic acid from nixtamalised corn bran and ethyl and methyl esters.

Conclusions: The isolated strains of *B. flexus* NJY2 and NJY4 showed important physiological properties to produce high-value molecules from agroindustrial by-products.

Significance and Impact of the Study: This is the first report about the isolation of alkaliphilic micro-organisms from nejayote and the first report of phenolic acid esterases synthesised by alkaliphiles. The new alkaliphilic micro-organisms have potential application in the treatment and transformation of tortilla industry residues.

Introduction

Alkaliphile is an organism with optimum growth rate at least two pH units above neutrality. These microbial species have the ability to synthesize active enzymes under extreme pH condition (Horikoshi 1999). Alkaliphilic bacteria have been isolated mostly from soil samples and other environments like saline lakes, sea water and the by-products from food processing industries between others (Horikoshi 1999; Ntougias and Rusell 2000). Tortillas, thin, round, unleavened bread, are elaborated in the nixtamalisation process that involves the alkaline cooking and steeping of maize in a solution of lime. While the steeped

liquor, nejayote, is discharged, the cooked-steeped maize (nixtamal) is rinsed and ground to a soft dough, which is later used to prepare tortillas and other food products. The tortilla industry generates on daily bases significant amounts of residues considered as pollutants. Besides the concentration of suspended solids and dissolved organic materials, the pH of nejayote is near the maximum limit of alkalinity (10–14) (Velasco-Martinez *et al.* 1997; Salmeron-Alcocer *et al.* 2003). However, the high pH and organic matter concentration in nejayote make it a good source of alkaliphilic or alkali tolerant bacteria. On the other hand, there are no reports of these micro-organisms in nejayote. Although *Paenibacillus amylolyticus*, *Pseudomonas putida*

and *Acinetobacter* sp., were isolated from nejayote contaminated soil, were unable to grow under alkaline conditions (Salmeron-Alcocer *et al.* 2003). Moreover, significant efforts have been focused on the isolation of micro-organisms present in fermented nixtamalised corn dough. Since nixtamal is washed thoroughly, the final pH obtained is close to 7; therefore, micro-organisms isolated are neutrophilic (Escalante *et al.* 2001; Diaz-Ruiz *et al.* 2003; Sefaddeh *et al.* 2004; Moran *et al.* 2010).

Nejayote solids contain portions of un-hydrolysed pericarp that could be used to obtain added-value products like ferulic acid. Feruloyl esterases (EC 3.1.1.73), are a subclass of the carboxylic acid esterases enzymes, that cleave the ester linkage between hydrocinnamic acids and sugars present in plant cell walls (Topakas *et al.* 2007). Feruloyl esterases (FAEs) have a number of potential biotechnological applications such as isolation of bioactive compounds from agro wastes, use in the pulp and paper industries, the production of fuel ethanol, and as a synthetic tool to synthesise novel esters (Topakas *et al.* 2007). There are no reports about the ferulic acid production from the nixtamalised maize bran contained in nejayote. New methods and technologies need to be implemented for the waste treatment and utilization of tortilla residues. Alkaliphilic micro-organisms present in nejayote could be used for bioremediation purposes and at the same time as source of enzymes. In this paper we describe the isolation and characterization of facultative alkaliphiles present in nejayote and analyse the potential of these micro-organisms for the treatment and transformation of tortilla by-products in added value products.

Materials and Methods

Micro-organisms isolation

Micro-organisms were isolated from industrial nejayote obtained from Agroinsa (GRUMA, Monterrey, NL, Mexico) by the following method. Nejayote medium was prepared with 100 g of commercial white maize (HEB, San Nicolas, NL, Mexico), in 300 ml water containing 0.6% (w/v) calcium hydroxide and boil for 1 h. The resulting liquor was added 2% (w/v) agar and autoclaved at 121°C for 20 min. Fresh industrial nejayote samples at pH 10 were plated on nejayote medium and incubated at 37°C for 4 days.

Morphological and phenotypic characterization of isolates

The morphology of vegetative cells and sporangia, and the shape and position of spores were observed under microscope (KF 2, ICS, Carl Zeiss, Mexico City, Mexico), using submerge 100 × magnification. In addition the following

phenotypic tests were performed according to methods reported in the literature: motility, catalase, Voges-Proskauer test, methyl red test, gas and acid production from glucose, maltose, lactose, mannitol, and sucrose, nitrate reduction, indole formation, H₂S production and utilization of citrate (Claus and Berkeley 1986). Degradation of starch, and cellulose were tested according to methods reported previously (Castro *et al.* 1993; Horikoshi 1999). Xylan degradation was assayed on LB media containing 0.4% (w/v) of xylan from beechwood (Sigma, St Louis, MO, USA). After growth, plates were flooded with 0.1% (w/v) Congo red dye (Theater and Wood 1982). Gelatin hydrolysis activity was determined in culture supernatants by SDS-PAGE including gelatin in the resolving gel (Sanchez-Gonzalez *et al.* 1999). The effect of pH on protease activity was determined at 37°C in SDS-PAGE gelatin gels using the following buffers at 50 mmol l⁻¹: sodium acetate, pH 4 and 5; 4-morpholine-propanesulfonic acid (MOPS), sodium salt pH 6.5; Tris-HCl, pH 8 and 9.

Analyses of whole-cell fatty acids profile were performed in the Plant Pathology Department of the University of Florida.

DNA extraction and sequence determination

Genomic DNA was isolated from pure bacterial colonies using the UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Samples were sent to MIDI Labs (Newark, DE) for amplification and sequencing of the 16S rDNA. The resulting DNA sequences were submitted to the non-redundant nucleotide database at GeneBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (Altschul *et al.* 1990), to determine its identity.

Sequence analysis

Multiple alignments of the isolates sequence and closest relatives were performed using the Bioedit sequence alignment editor (Hall 1999). The percentage of sequence similarity between isolates and *B. flexus* type strain was calculated using the CLUSTALW program (Thompson *et al.* 1994).

Phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method using the PHYLIP ver. 3.67 suite of programs (Felsenstein 2005).

Growth studies

Growth assays were performed using alkaline corn medium (ACM), composed of 20 g dextrose, 5 g corn flour, 5 g yeast extract, and 8 g Ca(OH)₂ in 1 l of distilled water at pH 12.5. Media were sterilized in an autoclave at

121°C for 20 min. The buffers or alkalis used were sterilized separately. Cultures were grown in Erlenmeyer flasks at 37°C and 200 rev min⁻¹. Controls consisted of flasks with ACM media without inoculation. Growth was monitored by measuring the cell protein concentration using DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Measurements were conducted by triplicate, and results were the averages of three determinations for each case.

To analyse the pH tolerance, 100 mmol l⁻¹ sodium acetate, sodium phosphate and calcium carbonate were used to adjust pH to 5, 7, and 10 respectively.

Tolerance to salt was determined adding different amounts of NaCl (2–10%, w/v) to ACM media containing 2% (w/v) agar at pH 12. The effect of temperature on microbial growth was studied at 30, 40, 50 and 60°C in ACM agar plates.

Ferulic acid ester hydrolytic activity

For the ferulic acid ester hydrolysis, micro-organisms were cultivated in corn bran medium (CBB), composed of 20 g corn bran (provided by GRUMA), 5 g yeast extract and 15 g of CaCO₃ in 1 l of distilled water adjusting pH to 9 for corn bran esters hydrolysis and to 7 or 10 for resting cell preparation. CaCO₃ solutions were sterilized separately. Micro-organisms were grown at 28°C and 200 rev min⁻¹. For the resting cell preparation, after 72 h of incubation, cultures were harvested and centrifuged at 3000 g for 30 min at 4°C. While culture broth was concentrated using 3 kDa cutoff Microcon centrifugal filtration devices (Millipore, Billerica, MA, USA), cells were washed with any of the following buffers at a concentration of 0.1 mol l⁻¹: sodium acetate, pH 4 and 5; MOPS, sodium salt pH 6 and 7; Tris-HCl, pH 8 and 9 and carbonate sodium salt for pH 10.

Culture broth and resting cells were assayed separately, for phenolic acid esterase activity by a spectrophotometric assay using *p*-nitrophenyl ferulate (PNPF) as substrate (Mastihuba *et al.* 2002). The substrate solution was prepared by mixing nine volumes of 0.1 mol l⁻¹ selected buffer solution (pH 4–10), containing 2.5% (v/v) triton X-100 with one volume of 10.5 mmol l⁻¹ PNPF in DMSO. This buffer-PNPF solution was prepared freshly before analysis. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of *p*-nitrophenol from PNPF in 1 min at 37°C.

The hydrolysis of methyl ferulate (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA), was determined incubating the cells suspension with 1 mmol l⁻¹ substrate at pH 7 and 37°C. The reaction mixtures were qualitatively analysed by HPLC. Signals and UV spectra were compared to the obtained with methyl ferulate and ferulic acid (Sigma, St Louis, MO, USA) standards.

Micro-organisms were also plated on agar with ethyl ferulate to determine the presence of clear zones as result of the action of phenolic acid esterases (Donaghy *et al.* 1998).

Ferulic acid released from corn bran during the fermentation and the methyl ferulates hydrolysis reactions were analysed by HPLC. Separations were carried out over a Hyperclone 5 U ODS C18 column. The mobile phase consisted of H₂O/CH₃CN (95 : 5) containing 1% (v/v) of HCOOH (A), and CH₃CN/H₂O (90 : 10) containing 1% (v/v) of HCOOH (B). A non-linear gradient was used: 0 min, 100% A; 15 min, 90% A; 20 min, 80% A; 30 min, 70% A, at 0.8 ml min⁻¹ flow rate.

All determinations were conducted by triplicate.

Results

Microbial isolation

Fresh samples of industrial nejayote were plated on nejayote media. After incubation, the presence of two different micro-organisms designed as NJY2 and NJY4 were observed. The physiological properties of the two nejayote isolates are summarized in Table 1. According to the morphological and physiological characteristics, strains belonged to the *Bacillus* genus. Microscopic observations

Table 1 Physiological and biochemical properties of *B. flexus* NJY2 and NJY4 and the type strain DSM 1320

Property	NJY2	NJY4	<i>B. flexus</i> DSM 1320*
Motility	+	+	-
Catalase	+	+	NR
Oxidase			
Phenylalanine deamination			
Voges-Proskauer			
Methyl red test			
Nitrate reduction	+	+	
Indol formation			
Utilization of			
Citrate	-	+	+
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Hydrolysis of			
Starch	+	+	+
Xylan	+	+	
Cellulose			NR
Gelatin	+	+	+

NR, non-reported.

*Priest *et al.* (1988).

show that micro-organisms were spore forming gram-positive rods.

The total fatty acid pattern of nejayote strains is shown in Table 2. The strains were characterized by the predominance of branched fatty acids mainly C15:0 and isoC15:0 ranging from 64 to 69% of the total fatty acid composition. The isoC15:0/anteisoC15:0 ratio was <2, indicating that strains belong to clusters I, II or VII of the fatty acid classification for *Bacillus* species (Kämpfer 1994).

16S rDNA sequence analysis

Gene sequences from 45 to 536, which includes hyper-variable regions V1–3 (Blackwood *et al.* 2004), were aligned and compared between them and with the sequences of 14 species of related bacteria from public databases to determine its phylogenetic position. Taxonomically, nejayote strains were clustered in the rRNA group 1 of the phylogenetic group defined as *Bacillus* genus and occupy a phylogenetic position closely related to *Bacillus flexus* (Ash *et al.* 1991). The 16S rDNA sequences similarity values of both nejayote strains to *B. flexus* type culture were 99.8 and 100 for NJY2 (HM595742) and NJY4 (HM595743) respectively.

Table 2 Fatty acid compositions of *B. flexus* NJY2, NJY4 and strain DSM 1316

Fatty acid	Micro-organism		
	NJY2	NJY4	<i>B. flexus</i> DSM 1316*
isoC14:0	6.3	4.8	4.26
C14:0	1.9	1.8	2.14
isoC15:0	21.1	25.5	29.4
anteisoC15:0	44.2	39	46.7
isoC16:0	1.5	1.8	–
isoC16:1	–	–	1.7
C16:1w7c OH	3.8	2.2	–
C16:1w11c	9.8	10.3	–
anteisoC16:1	–	–	4.1
C16:0	1.7	3.5	2.73
C17:1B	–	–	1.65
isoC17:1	1	2.3	–
anteisoC17:0	3.2	4.7	4.21
anteisoC17:1	–	–	1.46
isoC17:1w10c	2	2	–
isoC17:0	–	–	1.66
Total unsaturated	16.6	16.8	8.91
iso-branched	31.9	36.4	37.02
anteiso-branched	47.4	43.7	56.47
Ratio anteiso : iso	1.49	1.20	1.52
Total branched	79.30	80.10	93.49
iC15 : aiC15	0.47	0.65	0.62

*Kämpfer (1994).

Growth studies

Isolates were cultured at pH 12.5 in a similar composition broth to the nejayote. Figure 1 shows the growth kinetics of isolates NJY2 and NJY4. Both isolates share an exponential growth phase of above 40 h. From this point to the end of the fermentation isolates NJY2 and NJY4 showed a differential pattern: for NJY2 a decrement in their biomass was observed whereas isolate NJY4 presented a stationary phase to the end of the fermentation. The pH of the broth decreased from initial pH 12.5 to neutrality during the exponential growth of both *B. flexus* isolates, and maintained closely to 6.0 to the end of the fermentation. Interestingly, the decrement in biomass concentration for the NJY2 isolate was not associated to the final pH.

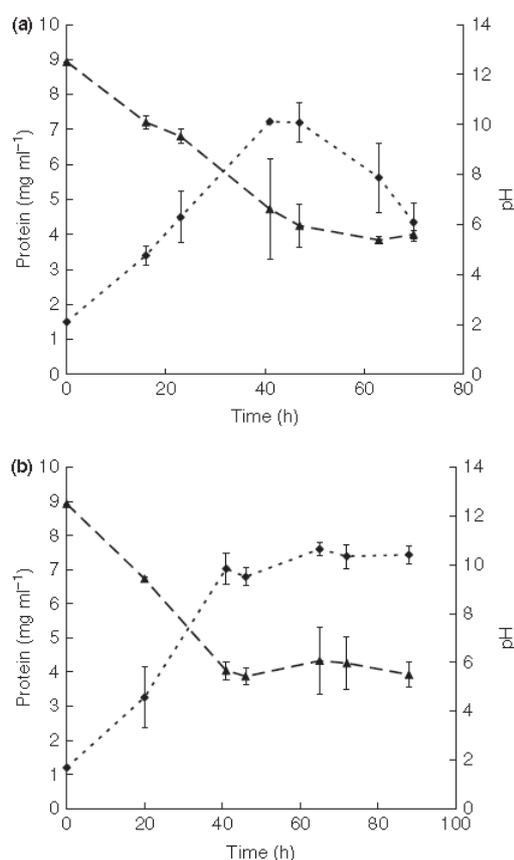
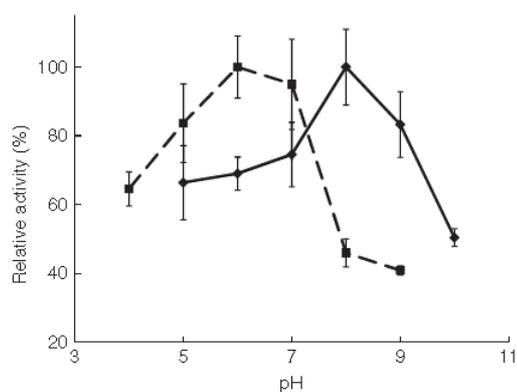


Figure 1 *B. flexus* NJY2 and NJY4 growth kinetics at pH 12.5 in ACM medium. (a) NJY2; (b) NJY4. Symbols: (—●—) growth (protein mg ml⁻¹); (---▲---) pH.

Table 3 Growth properties of *B. flexus* NJY2 and NJY4

Property	Isolate	
	NJY2	NJY4
Growth at pH		
5		
7	++	++
10	+++	+++
12	+++	+++
Growth in the presence of NaCl		
2%	+++	+++
5%	+++	+++
7%	++	++
10%	+	+
Growth at (°C)		
30	++	++
40	+++	++
50	++	++
60		

**Figure 2** Effect of pH on the PNPf hydrolysis. Symbols (—●—) *B. flexus* NJY2 resting cells grown at pH 10; (---■---) *B. flexus* NJY2 resting cells grown at pH 7.

In order to determine the effect of pH on microbial growth, isolates were incubated at pH 5, 7, 10 and 12. Although the two strains grew at pH 7, optimal growth was observed between pH 10 and 12 at 37°C. No growth was observed at pH 5. The final pH reached in all cultures was close to 6, independently of the initial pH. Isolated nejayote strains were able to grow from 30 to 50°C being the optimum 40°C. Micro-organisms grew in the presence of NaCl concentrations up to 10% (w/v). Table 3 summarized the growth properties of both strains under the experiment conditions.

Ferulic acid ester hydrolysis

Nejayote isolates were able to hydrolyse ethyl and methyl ferulic acid esters. For this reason the phenolic acid ester-

ase activity of both micro-organisms was measured at pH 7, using PNPf as substrate. Results indicate that activity was mainly associated to cells, showing *B. flexus* NJY2 higher levels (56 mU mg⁻¹ protein) than strain NJY4 (29 mU mg⁻¹ protein). *B. flexus* NJY2 and NJY4 showed low levels of extracellular activity: 2.2 mU mg⁻¹ protein and 3.1 mU mg⁻¹ protein respectively.

Since strain NJY2 presented higher hydrolytic levels than NJY4, further studies on the phenolic acid ester hydrolysis were performed using only strain NJY2. The effect of pH on the esterase activity was determined using resting cells obtained from cultures at pH 7 and 10. As can be observed in Fig. 2, the esterase activity of resting cells obtained at neutrality exhibited a maximal at pH 6, whilst the resting cells obtained under alkaline conditions showed it at pH 8. Interestingly, resting cells from alkaline cultures showed a constant activity at pH 5, 6 and 7. The effect of pH on the hydrolytic activity was also determined using culture broth concentrates. The maximal esterase activity observed in culture broths was obtained at pH 6, presenting the same behaviour as resting cells obtained under neutral conditions (data not shown).

On the other hand, when *B. flexus* NJY2 was grown in CBB media at pH 9, the culture was able to hydrolyse ferulic acid esters present in nixtamalised maize bran releasing 1.5 g of ferulic acid per kg of substrate.

Discussion

Bacillus species are the major workhorse industrial micro-organism with important roles which date back in time more than a thousand years. The ability of different species of *Bacillus* to ferment at different pH and temperatures, has led scientist to the development of a variety of commercial enzymes products with the desired temperature, pH activity, and stability properties to address a vast variety of specific applications. In this study two micro-organisms named as NJY2 and NJY4, were isolated from industrial nejayote. These micro-organisms were identified as being part of the *Bacillus* genus, with the typical phenotypic characteristics such as its rod shape and ability to sporulate (Ash *et al.* 1991). 16S rDNA sequence analysis of the hypervariable regions V1-3, indicate that isolates are closely related to *Bacillus flexus* DSM 1320 (=IFO 15715). Although *B. flexus* NJY4 16S rDNA similarity values indicate that is identical to the type strain, physiological characteristics like citrate utilization and motility showed biochemical differences (Priest *et al.* 1988).

High proportions of unsaturated fatty acids were observed for *B. flexus* NJY2 and NJY4, compared to *B. flexus* DSM 1316 (Kämpfer 1994). The presence of high proportion of branched and unsaturated fatty acids may

increase the membrane fluidity of isolates becoming more resistant to extreme environments like alkalinity and salinity (Yumoto *et al.* 2000). *B. flexus* NJY2 and NJY4, like other *B. flexus* strains, were identified as facultative alkaliphiles and salt tolerant bacteria (Priest *et al.* 1988; Zhao *et al.* 2008; Kannan *et al.* 2009).

Nejayote *B. flexus* produced acid from the fermentation of several carbohydrates. The property to modify the pH is an important characteristic because the disposal of nejayote is a difficult task. It was reported that for the aerobic treatment of nejayote it is necessary to neutralize the samples with HCl in order to get the optimal pH for bacterial growth (Salmeron-Alcocer *et al.* 2003). *B. flexus* strains grew in nejayote under alkaline conditions and modified pH to values close to neutrality. These microorganisms could have a potential application for the nejayote waste water treatment both to decrease organic matter content and neutralize the pH of the solution.

B. flexus NJY2 and NJY4 synthesise commercially important enzymatic activities like amylases, xylanases, proteases, and phenolic acid esterase. This is the first report of phenolic acid esterases synthesised by facultative alkaliphiles. Like many other members of the genus *Bacillus*, the phenolic acid esterases of nejayote strains were mainly cell associated (Donaghy *et al.* 1998). This study made no attempt to determine the location of the esterase activity. However, as intact resting cells were able to hydrolyse ferulic acid esters and low levels of esterase activity were detected in supernatants, we propose that enzyme is not intracellular but periplasmic, maybe loosely attached to the cell surface membrane.

The ability of enzymes to be active in alkaline pH may be advantageous in biotechnological applications. Fungal FAEs with optimum activity at pH 9 or stable under alkaline conditions have been characterized (Topakas and Christakopoulos 2004; Shin and Chen 2006, 2007; Hegde and Muralikrishna 2009). Our results suggest that the *B. flexus* NJY2 phenolic acid esterase activity do not optimally work at alkaline pH. Resting cells obtained from neutral cultures and the extracellular enzyme from neutral and alkaline cultures showed the maximal esterase activity at pH 6. It has been reported that when cells of facultative alkaliphiles 'grown at neutral pH' are exposed to alkaline pH an amidase is activated and the cell wall is hydrolysed (Horikoshi 1999). The loss of cell wall could leave the esterase exposed to the pH of the reaction media, showing the same behaviour as the extracellular enzyme. However, when facultative alkaliphiles grow at alkaline pH, the cell wall gets thicker and shows an increase in the negative charge density, protecting the cell from the alkaline environment (Kannan *et al.* 2009). The cell wall of resting cells from alkaline cultures acts as a protection barrier for the esterase and for this reason

showed a maximal activity at pH 8. This cell wall structure could also be involved in maintaining constant the activity at pH 5–7. *B. flexus* NJY2 cultures released esterified ferulic acid from corn bran at pH 9. Although the esterase activity was mainly cell associated, it is possible that is not primarily involved in fibre degradation but acts on the depolymerised hemicellulose that is assimilated by the organism. Cell associated phenolic acid esterase of *B. flexus* NJY2 could be industrially important from the perspective of its activity at pH 8. The phenolic esterases of nejayote isolates hydrolysed different ferulic acid esters; however, more studies are necessary to classify them as ferulic acid or any other phenolic acid esterase.

Our results indicate that *B. flexus* have a potential for application in the treatment of alkaline agroindustrial wastes and to produce high value products from the hydrolysis of corn bran generated by the tortilla industry.

Acknowledgements

The author wants to thank Dr Roberto Contreras and Dr Fernando Ramirez from GRUMA for the nixtamalised bran donation. This work was supported by CONACyT project 83263 and PAICYT project CN1547-07.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D. (1991) Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of a small-subunit-ribosomal RNA sequence. *Lett Appl Microbiol* **13**, 202–206.
- Blackwood, K.S., Turenne, C.Y., Harmsen, D. and Kabani, A.M. (2004) Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. *J Clin Microbiol* **42**, 1626–1630.
- Castro, G.R., Ferrero, M.A., Mendez, B.S. and Sineriz, F. (1993) Screening and selection of bacteria with high amylolytic activity. *Acta Biotechnol* **13**, 197–201.
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (1986) Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Sneath, P.H., Mair, N.S. and Sharp, M.E., Vol. 2, pp. 1105–1140. Baltimore, MA: William & Wilkins.
- Diaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J. and Wachter, C. (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4367–4374.
- Donaghy, J., Kelly, P.F. and McKay, A.M. (1998) Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 257–260.

- Escalante, A., Wachter, C. and Farrés, A. (2001) Lactic acid bacteria diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* **64**, 21–31.
- Felsenstein, J. (2005) *PHYMLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6*. Distributed by the Author. Seattle: Department of Genome Sciences, University of Washington.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Hegde, S. and Muralikrishna, G. (2009) Isolation and partial characterization of alkaline feruloyl esterases from *Aspergillus niger* CFR 1105 grown on wheat bran. *World J Microbiol Biotechnol* **25**, 1963–1969.
- Horikoshi, K. (1999) Isolation, distribution and taxonomy of alkaliphilic microorganisms. In *Alkaliphiles*, pp. 3–39. Japan/The Netherlands: Kodansha, Ltd–Harwood Academic Publishers.
- Kämpfer, P. (1994) Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus* species. *Syst Appl Microbiol* **17**, 86–98.
- Kannan, P., Ignacimuthu, S. and Paulraj, G. (2009) Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of protease producing facultative alkaliphilic bacterium *Bacillus flexus* from mangrove soil. *Indian J Biochem Biophys* **46**, 261–265.
- Mastihuba, V., Kemnicky, L., Mastihubová, M., Willett, J.L. and Cote, L. (2002) A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Anal Biochem* **309**, 96–101.
- Moran, S., Robertson, K., Paradisi, F., Rai, D.K. and Murphy, C.D. (2010) Production of lipopeptides in *Bacillus* sp CS93 from pozol. *FEMS Microbiol Lett* **304**, 69–73.
- Ntougias, S. and Russell, N.J. (2000) *Bacillus* sp. WW3-SN6, a novel facultative alkaliphilic bacterium isolated from the washwaters of edible olives. *Extremophiles* **4**, 201–208.
- Priest, F.G., Goodfellow, M. and Todd, C. (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J Gen Microbiol* **134**, 1847–1882.
- Salmeron-Alcocer, A., Rodríguez-Mendoza, N., Pineda-Santiago, V., Cristiani-Urbina, E., Juárez-Ramírez, C., Ruíz-Ordaz, N. and Galindez-Mayer, J. (2003) Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor. *J Environ Eng Sci* **2**, 401–406.
- Sanchez-Gonzalez, M., Alagón, A., Rodríguez-Sotres, R. and Lopez-Munguia, A. (1999) Proteolytic processing of dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microbiol Lett* **181**, 25–30.
- Sefa-Dedeh, S., Cornelius, B., Amo-Awua, W., Sakyi-Dawson, E. and Afoakwa, E.O. (2004) The microflora of fermented nixtamalized corn. *Int J Food Microbiol* **96**, 97–102.
- Shin, H.D. and Chen, R.R. (2006) Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme Microbiol Technol* **38**, 478–485.
- Shin, H.D. and Chen, R.R. (2007) A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 1323–1330.
- Theater, R.M. and Wood, P.J. (1982) Use of Congo red-poly-saccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* **43**, 777–780.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Sci USA* **76**, 4350–4354.
- Topakas, E. and Christakopoulos, P. (2004) Production and partial characterization of alkaline feruloyl esterase by *Fusarium oxysporum* during submerged batch cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* **20**, 245–250.
- Topakas, E., Vafiadi, C. and Christakopoulos, P. (2007) Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem* **42**, 497–509.
- Velasco-Martinez, M., Angulo, O., Vazquez-Couturier, D.L., Arroyo-Lara, A. and Monroy-Rivera, J.A. (1997) Effect of dried solids of nejayote on broiler growth. *Poultry Sci* **76**, 1531–1534.
- Yumoto, I., Yamazaki, K., Hishinuma, M., Nodasaka, Y., Inoue, N. and Kawasaki, K. (2000) Identification of facultative alkaliphilic *Bacillus* sp. strain YN-2000 and its fatty acid composition and cell surface aspects depending on culture pH. *Extremophiles* **4**, 285–290.
- Zhao, J., Lan, X., Su, J. and Rahman, E. (2008) Isolation and identification of an alkaliphilic *Bacillus flexus* XJU-3 and analysis of its alkaline amylase. *Acta Microbiol Sinica* **48**, 750–756.

ANEXO 2

Statistical optimization of culture media for the production of a cell associated ferulic acid esterase from *Bacillus flexus* NJY2.

Statistical optimization of culture media for the production of a cell associated ferulic acid esterase from *Bacillus flexus* NJY2.

Allan Blanco-Gamez¹, Parra Roberto, Clarita Olvera², Sandoval-González Rosalía, Cantú Cárdenas María Elena, Mónica Sanchez-Gonzalez.

Introduction

Feruloyl esterases (EC 3.1.1.73) are a subclass of the carboxylic acid esterases enzymes, that cleave the ester linkage between hydrocinnamic acids and sugars present in plant cell walls (Topakas *et al.* 2007). Feruloyl esterases (FAEs) have a number of potential biotechnological applications such as isolation of bioactive compounds from agro wastes (Jeong 2000), use in the pulp and paper industries (Benoit 2008), the production of fuel ethanol (Benoit 2008), and as a synthetic tool to synthesise novel esters, between others (Topakas *et al.* 2007). These applications are of great importance in the actual context of sustainability. However, thermostable and pH resistant biocatalysts are required for the development of industrial applications (10, 12). *Bacillus flexus* NJY2 is a facultative alkaliphilic bacteria isolated from maize processing waste water (nejayote) (13). This microorganism synthesizes phenolic acid esterases, mainly cell associated, able to hydrolyze ferulic acid from an alkaline processed (nixtamalized) maize bran, and ferulic acid ethyl and methyl esters (13). The maximum phenolic

esterase activity of *B. flexus* NJY2 resting cells obtained under alkaline conditions was found at pH 8. Cells provide a natural environment preventing from conformational changes in protein structure that would inactivate enzymes in extremely acid and alkaline media (15). For this reason whole cell biocatalysts have been used for centuries as a traditional way of application. *Bacillus* species generally synthesize low levels of feruloyl esterases (1.3-50 mU/mg protein) (16,17), in the vast majority as intracellular enzymes, so higher levels of enzymatic activity are necessary to potential use of this biocatalyst in the all these industries. Despite the need of increase the level of activity feruloil esterases, there are only a few reports related to the optimization of feruloil esterases production (Dong 2006, Yue 2009). In general, the feruloil esterases production depends on several variables: pH, Type and Concentration of the Nitrogen sources and the effect and concentration of cation in the media, in our previous work, we determined four main factor affecting the enzymatic production of *B. flexus* NJY2, the utilization of yeast extract and casein peptone as nitrogen source and salts buffer with calcium and sodium (unpublished data).

The classical method to optimization involves the change of one factor at time, while the others keep at constant level. Nevertheless, this method carried out a considerable amount of experiments and time, also is less effective analysis of interactions between the factors (Sivakumar, Fontes-Pio). In most published studies of feruloil esterases produced by bacteria (Yue, Dong shin), the effect of each variable was studied independently, with the others variables held constant, in order to enhance the data information maximizing the feruloil esterases. However, until now, no study has used the central composite design to analyze the optimal conditions for growth and production of *B. flexus* to obtain high feruloil esterases activities. The use of experimental design can provide valuable and statistically significant

models of a phenomenon with a minimum number of experiments. With this smaller number of experiments, the importance of each variable and of their interaction effects can be determined.

Another alternative is the use of Response Surface Methodology (RSM), a combination of statistical techniques generally used to study the combined effect of certain variable, to optimize conditions in a multivariable system and estimate the coefficients to generate a mathematical model of response (Ren 2006, Coman 2011, Khurana 2007). This technique generates response surface and contour plots from linear interaction and quadratic effects of two or more factors and fits the experimental data to calculate the optimal response of the process. The present study is the first successful optimization of the esterase from *B. flexus* NJY2 using a RSM supported on a Central Composite Design (CCD).

Materials and methods

Microorganism

Bacillus flexus NJY2 is maintained in the Autonomous University of Nuevo Leon, Faculty of Chemistry culture collection and was grown and stored on alkaline corn agar containing 20 g/L dextrose, 5 g/L corn flour (milled commercial white maize), 5 g/L yeast extract (Difco), 8 g/L Ca(OH)₂, and 20 g/L agar at 4°C.

Culture media for the optimization of feruloyl esterase production

Basal media for optimization of feruloyl esterase production was composed of 20 g/L nixtamalized bran maize, and 0.5 g/L CaCl₂, pH was adjusted to 10 after sterilization. The level

of basal media was maintained constant but the rest of the components varied according to the experimental design presented in Table 1. Inocula were grown in corn bran medium (CBM), composed of 20 g/L nixtamalized corn bran, 5 g/L yeast extract, and 15g/L CaCO₃, at 28 °C and 150 rpm for 24 h. After the incubation time, 2.5 mL of the inocula cultures were transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of media. Each culture conditions were performed in triplicate.

Analytical methods

Dry cell weight was determined harvesting 200 µl of cell sample by centrifugation at 2600xg and 4°C. Cells were washed and dried in a vacuum oven at 75 °C.

For the feruloyl esterase activity determination cells were washed three times with MOPS, sodium salt at pH 7. The resting cells obtained were assayed for ferulic acid esterase activity by a spectrophotometric assay using *p*-nitrophenyl ferulate (PNPF) as substrate (Mastihuba *et al.*, 2002). One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of *p*-nitrophenol from PNPF in 1 min at 37 °C.

RSM-CCD: experimental design

A factorial design CCD was adapted to optimize the enzyme production. A central point was not used, the four factors with replicates were utilized at the two levels, low (-1) and high (+1), with a total of 8 experiments were conducted and for each was performed by triplicate. The codification used in the experimental design is given in Table 1The effect of factors was

observed in two main parameters, the microbial growth (carrying capacity of the system and maximum specific growth rate) and enzymatic activity (feruloyl esterase production) of *B. flexus* NJY2.

The experimental results of RSM were fitted by the response surface regression procedure, using the following second-order polynomial equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 \quad \text{Eq. 1}$$

Where Y is the response predicted; β_0 , intercept; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$, linear coefficients; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}$, interactions coefficients; the X values represent coded factors. The quality of fit to the polynomial model was expressed by the coefficient of determination R^2 .

Statistical analysis and modelling

Dry weight data were fitted to non linear regression analyses using Polymath version 6.0 (Control Data Corporation) and the polynomial equation 1.

$$DW = \frac{P_0 K}{P_0 + (K - P_0)e^{-rt}} \quad \text{Eq 2}$$

Where DW is the population at specific time; P_0 , is initial population and K, is the carrying capacity of system.

The maximum specific growth rate (μ_{max}) was calculated using equation 2:

$$\mu_{\max} = \frac{\log DW_2 - \log DW_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Eq 3}$$

Where DW is the population at time 1 (t1) or 2 (t2).

An analysis of variance (ANOVA) of each parameter was performed using Statistica version 6.0. Soft Stat, Tulsa, OK, US, to evaluate the principal factors affecting the parameters observed (Table 2).

Results

Effect of experimental design variables on *B. flexus* NJY2 growth

The bacterial growth kinetics is shown in Figure 2. Microorganism presented a similar growth behavior in all media variants, characterized by a lag phase of 10 h approximately, followed by an exponential growth of around 15 h. The parameters calculated based in growth are presented in the codification showed in material and methods.

The higher *K* value obtained (9.33 mg/mL, run 6) was obtained with CPe combined with lower sodium buffer concentration (2 g/L), however the increase of sodium buffer concentration to higher level (15 g/L) results in a loss of carrying capacity to minimum value obtained (8.92 mg/mL). The change in sodium buffer concentration in combination with YEx did not showed a remarkable effect on *K* value. The calcium buffer in combination with YEx showed a r(significant) effect to previous combination of sodium and CPe, giving a loss of carrying

capacity of the system with increase of the concentration of this salt buffer. While the use of sodium buffer with YEx have similar results in K value. The ANOVA showed the most significant factors affecting this parameter are nature and concentration of nitrogen source and the interactions between the cation buffer and the nitrogen source ($p \leq 0.001$).

μ_{max} values were affected directly by the source of organic nitrogen, obtaining the highest values (0.051, 0.047, 0.046 h^{-1}) with the yeast extract and independently the cation used in the buffer, however, according with ANOVA, the main factors affecting the velocity of bacterial growth were cation and concentration buffer, kind of nitrogen source and the interactions between the same factors ($p \leq 0.001$).

Effect of experimental design variables on *B. flexus* NJY2 feruloyl esterase

In order to search for the optimum combination of medium components to enhance the feruloyl esterase production, experiments were performed according to the central composite design experimental described in Materials and methods. As can be observed, in all treatments the enzyme was produced during the exponential growth phase (20-27 h) (Figure 1). Higher enzymatic activities (302, 67.7 and 45.7 mU/mg), were obtained with yeast extract than with casein peptone. Mean while the lowest enzymatic activities (22.8 y 26.3 mU/mg) were obtained using sodium buffer (15g/L) with casein peptone (10g/L) and yeast extract at high concentration (10g/L) respectively. All the factors and the interaction between them were statistically significant, since the p -value was minor to 0.006 in all the factors. The two lower significant factors to enzyme activity were cation buffer and concentration of nitrogen source (0.006 and 0.007 respectively).

To better observe the effect of each factor used in the experimental design, contour plots were used to understand the interaction effects of the involved factors (Figure 5 and 6). The contour plots of RSM were built as a function of two factors at time keeping other factors at fixed levels. In these figures, is remarkable the low efficacy of sodium buffer in the level of enzymatic activity, and the importance of the utilization of the yeast extract in the media to production of the enzyme at low concentration. It can be observed by the increase of the enzymatic activity with the decrease of yeast extract and calcium concentration.

Each contour curve shown represents an infinite number of combinations of two tested factors with the other two maintained at their respective medium level. The higher level of activity is close to smaller elliptic. This allow to estimate the enzymatic activity at certain given values of factors, helping with the second order polynomial equation (1) fit with the coefficient obtained with ANOVA to estimate the optimum response of the system, given as follows:

$$\begin{aligned}
 FAE(mU / mg) = & 70.78 + 33.18X_{BCat} + 38.89X_{BCon} + 39.67X_{NS} + 28.03X_{NCon} \\
 & + 25.03X_{BCat}X_{BCon} + 30.34X_{BCat}X_{NS} + 35.65X_{BCat}X_{NCon}
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 4}$$

A graphic plot of observed versus predicted values of response obtained with the equation before (Eq 4), were done to estimated the quality of the model propose (Figure 4). A good correlation was observed and expressed as the coefficient or regression ($R^2= 0.0978$).

Discussion

Respect to velocity growth, the main factor affecting the μ_{max} values were the use of yeast extract. The higher values of μ_{max} were obtained with this nitrogen source, it has been reported the effect of yeast extract in bacterial growth (Suarez 1998, Kademi 1999, Yue 2009, Atta 2011). However this was not a parameter easily changeable, with a 17% less growth between of lower respect the higher value. By contrast, Periago reports a difference of 88% in growth of *B. megaterium* in a treatment with antimicrobials and Kiung Heo showed a variation of 97.8% in the growth rate of the *B. cereus* using different values of pH, temperature and NaCl values.

On the other hand, the role of the monovalent ions in the survival mechanisms in a alkaline media by facultative and alkaliphile bacteria (Aono and Kulwrich). Nevertheless, the *B. flexus* NJY2 was isolated from a high-alkaline waste contained $Ca(OH)_2$, a factor that can cause a change in the metabolism and development of the microorganism and become a necessary component on the media to survive and grow (Shemarova). Generally, the rol of ion calcium is stabilization of proteins in cell wall, but, also is an important factor in the signaling of intracellular response (Jurado and Norris). In other way, the calcium could be having a direct effect in the production, stabilization and activity of enzyme as reported Frikha, Dodia and Krukeja, or by stimulatory effect such as reported by Yue (2009).

After the optimization the optimization produce 4.28 higher activity than the medium unoptimized, a comparable level to studies related to optimization of amylase (4.4 folds), xylanase (3 folds) (sivakumar, Coman, Kurhana) and higher than studies related to lipase (1.4 folds) and cutinases (2 folds)(Kumari)(CCD - RSM). In the contour plots, the efficacy of Yex and calcium buffer at low values is highly remarkable, since the level of enzymatic activity was twice than the utilization of yeast extract and sodium buffer at any concentration.

The parity plot showed a satisfactory correlation between observed and predicted values, which the points cluster around the diagonal, indicates the good fit of the model, because the deviation between the both values was small.

As it can be observed, there is a good correlation with the model done with polynomial equation.

Conclusions

Unlike other studies of esterases producing microorganisms (Kademi, Yue), the *B. flexus* NJY2 growth is uninfluenced by the nitrogen source or the cation buffer. All the treatments have a similar growth and maximum specific growth rate levels.

In contrast of growth, the enzymatic activity was a highly parameter influenced by the variables of the design. However, the enzymatic activity is no associated to amount growth, since the bacterial growth keeps constant in all the treatments, unlike the esterase activity. The ferulic acid esterase production was and parameter affected by the presence of yeast extract and ion calcium in the media at low concentration. All the factors uses in the experimental design were significant to the enzyme production ($p \leq 0.001$), so we are sure we use the main factors that can optimize the production of the enzyme by bacteria. The run 1 was the most suitable treatment to obtain the optimum ferulic acid esterase (302 mU/mg) at lower concentration of yeast extract and calcium buffer (5 g/L and 2 g/L respectively. This level of enzymatic activity is the higher within the reported by to (bacillus) enzymes (16, 17).

Table 1. Codification and results of Central Composite Design

YEx- Yeast extract CPe- Casein Peptone

Run	Codification				Results		
	Cation	Concentration	Nitrogen	Concentration	K	μ_{max} (h ⁻¹)	FAE
	Buffer	Buffer (g/L)	Source	Nit Sour (g/L)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(mg/mL)	(mU/mg)	
1	(-1) Ca ⁺⁺	(-1) 2	(-1) YEx	(-1) 5	9.06 ± 0.02 ^c	0.044 ± 0.0004 ^b	302.4 ± 8.9 ^a
2	(-1) Ca ⁺⁺	(-1) 2	(1) CPe	(1) 10	9.11 ± 0.08 ^b	0.043 ± 0.0006 ^b	35.0 ± 1.6 ^c
3	(-1) Ca ⁺⁺	(1) 15	(1) YEx	(1) 10	9.27 ± 0.04 ^a	0.051 ± 0.0006 ^a	45.7 ± 8.0 ^b
4	(-1) Ca ⁺⁺	(1) 15	(-1) CPe	(-1) 5	9.13 ± 0.06 ^b	0.044 ± 0.0004 ^b	33.0 ± 4.1 ^c
5	(1) Na ⁺	(-1) 2	(-1) YEx	(1) 10	8.97 ± 0.03 ^c	0.046 ± 0.0010 ^a	67.7 ± 4.6 ^b
6	(1) Na ⁺	(-1) 2	(1) CPe	(-1) 5	9.33 ± 0.05 ^a	0.044 ± 0.0008 ^b	33.8 ± 3.5 ^c
7	(1) Na ⁺	(1) 15	(-1) YEx	(-1) 5	9.01 ± .01 ^c	0.047 ± 0.0002 ^a	26.3 ± 4.6 ^c
8	(1) Na ⁺	(1) 15	(1) CPe	(1) 10	8.92 ± 0.02 ^c	0.042 ± 0.0002 ^b	22.8 ± 3.5 ^c

*(The coded factors)

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of results from CCD

Factor	K (mg)			μ_{max} (h ⁻¹)			Enzymatic activity (mU/mg)		
	MS	F	p	MS	F	p	MS	F	P
	X ₁	0.0122	5.47	0.032	0.000075	192.2	0.000	26433.84	900.4
X ₂	0.0067	3.00	0.102	0.000016	40.7	0.000	36309.26	1236.8	0.000
X ₃	0.0417	18.65	0.000	0.000004	10.6	0.004	37786.47	1287.1	0.000
X ₄	0.0241	10.81	0.004	0.000001	1.9	0.184	18866.43	642.6	0.007
X ₁ X ₂	0.1551	69.34	0.000	0.000075	192.2	0.000	26433.84	544.0	0.000
X ₁ X ₃	0.0498	22.30	0.000	0.000016	40.7	0.000	36309.26	752.8	0.000
X ₁ X ₄	0.1356	60.64	0.000	0.000004	10.6	0.004	37786.47	1039.2	0.000

Figure 1. Kinetics growth and enzymatic activity of *B. flexus* NJY2 using yeast extract as nitrogen source in the media. (A) Run 1 (B) Run 2 (C) Run 3 (D) Run 4. (●) Dry weight experimental data (–) No-linear regression model (▲) Ferulic acid esterase activity.

Figure 2. Kinetics growth and enzymatic activity of *B. flexus* NJY2 using casein peptone as nitrogen source in the media. (A) Run 1 (B) Run 2 (C) Run 3 (D) Run 4. (●) Dry weight experimental data (–) No-linear regression model (▲) Ferulic acid esterase activity.

Figure 3. Plot of values observed vs. predicted of ferulic acid esterase activity (FAE).

Figure 4. Contour plot from RSM of treatments using yeast extract versus buffer cation (calcium and sodium). (A) Yeast extract (-1, 5 g/L; 1, 10g/L) calcium (-1, 2 g/L; 1, 15 g/L) (B) Yeast extract (-1, 5 g/L; 1, 10g/L) sodium (-1, 2 g/L; 1, 15 g/L)

Figure 5. Contour plot from RSM of treatments using yeast extract versus buffer cation (calcium and sodium). (A) Casein peptone (-1, 5 g/L; 1, 10g/L) calcium (-1, 2 g/L; 1, 15 g/L) (B) Casein peptone (-1, 5 g/L; 1, 10g/L) sodium (-1, 2 g/L; 1, 15 g/L)

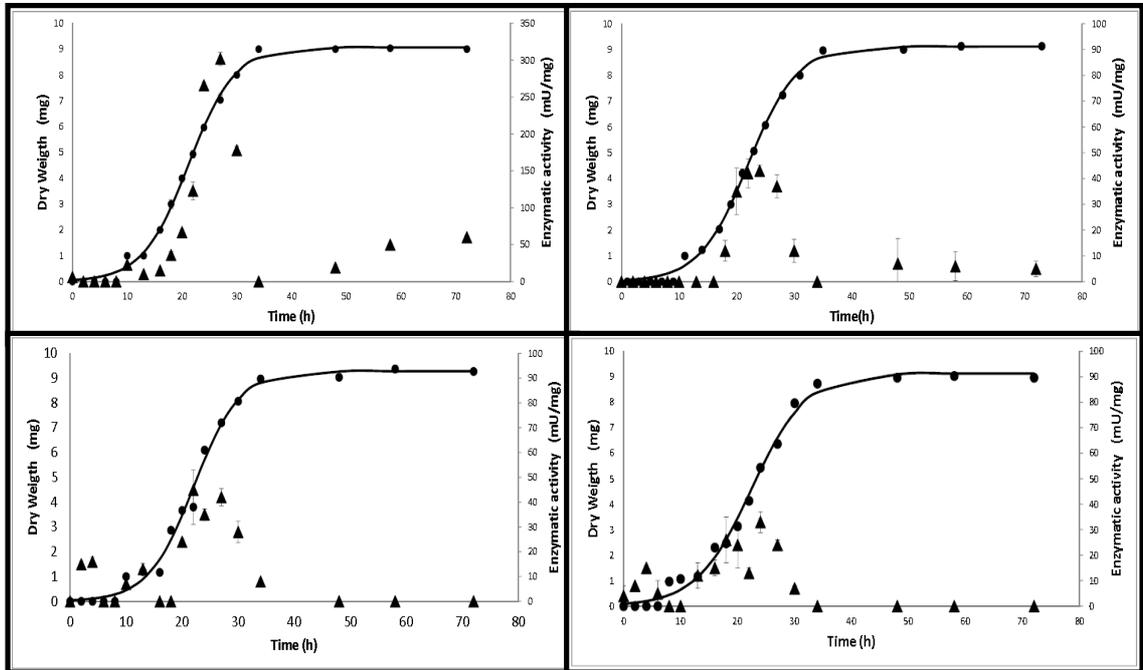


Figure 1

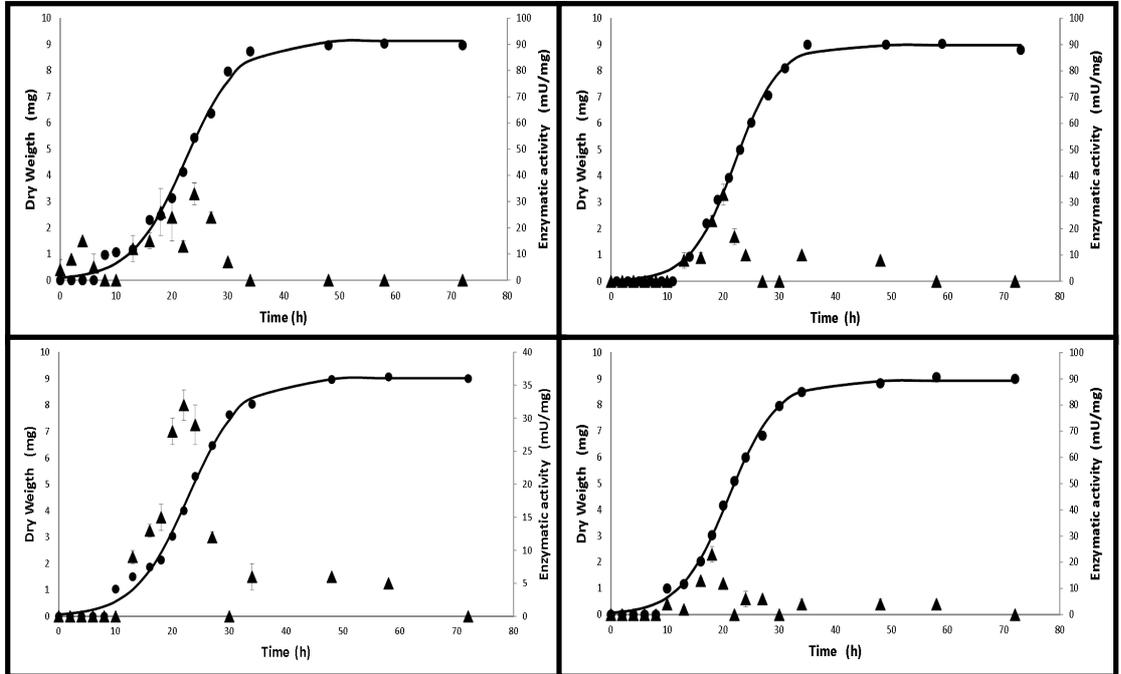


Figure 2

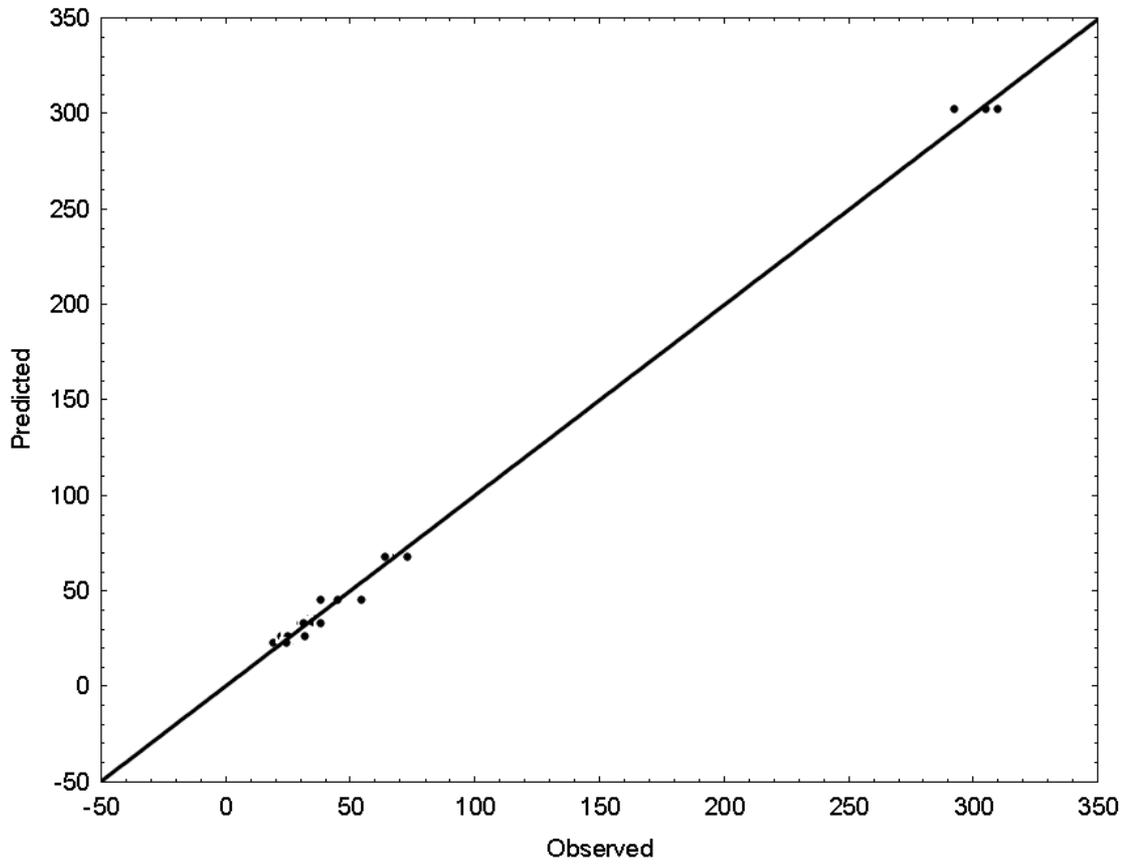


Figure 3

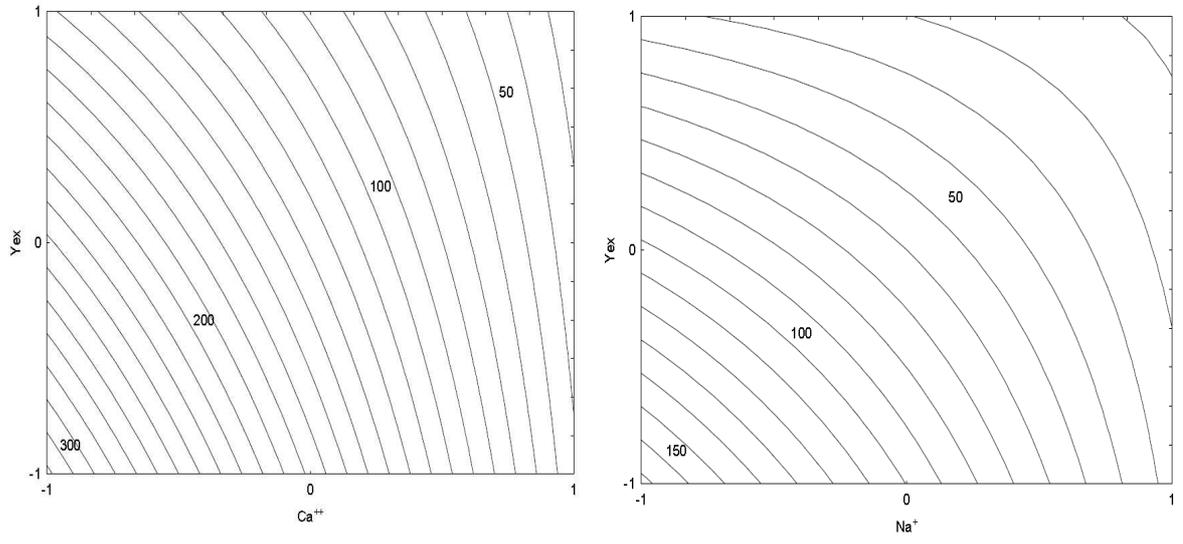


Figure 4

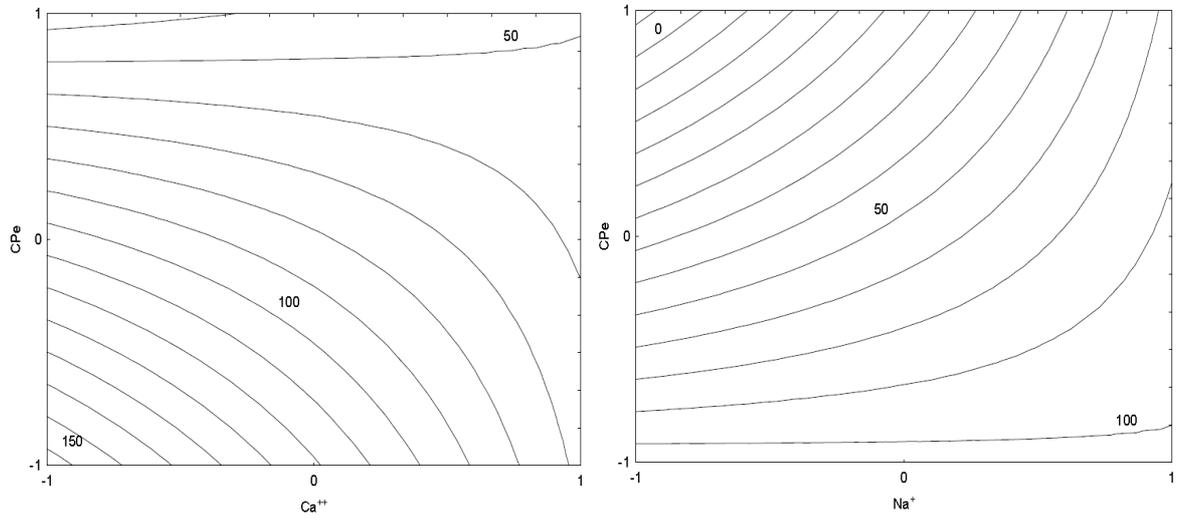


Figure 5

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Horikoshi K. **Alkaliphiles**. Harwood Academic Press (1999).
2. Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich AT. **Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights**. *Biochimica et Biophysica Acta* (2005) 1717: 67-88.
3. Kannan P, Ignacitumthu S, Paulraj MG. **Buffering capacity and membrane H conductance of protease producing facultative alkaliphilic bacterium *Bacillus flexus* from mangrove soil**. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* (2009) 46: 261-265.
4. Aono R, Ito M, Joblin KN, Horikoshi K. **A high cell wall negative charge is necessary for the growth of the alkaliphile *Bacillus lentus* C-125 at elevated pH**. *Microbiology* (1995) 141: 2955-2964.
5. Badui DS. **Química de los Alimentos**. 3ª edición, Pearson (1993)198-200.
6. Velasco-Martinez M, Angulo O, Vazquez-Couturier, DL, Arroyo-Lara A, Monroy-Rivera JA. **Effect of dried solids of nejayote on broiler growth**. *Poultry Sci* (1997) 76:1531–1534.
7. Salmeron-Alcocer A, Rodríguez-Mendoza N, Pineda-Santiago V, Cristiani-Urbina E, Juárez-Ramírez C, Ruíz-Ordaz N, Galindez-Mayer J. **Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor**. *J Environ Eng Sci* (2003) 2:401–406.

8. Kim TU, Gu BG, Jeong JY, Buyn SM, Shin YC. **Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain GM8901.** Applied and Environmental Microbiology (1995) 61: 3105-3112.
9. Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, Aono R, Horikoshi K. **Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1.** Applied and Environmental Microbiology (1993) 59:2311-2316.
10. Gessesse A. **Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp.** Applied and Environmental Microbiology (1998) 64: 3533-3535.
11. Schüle M. **Protein engineering of cellulases.** Biochimica et Biophysica Acta (2000) 1543: 239-252.
12. Shirai T, Ishida H, Noda J, Yamane T, Ozaki K, Hakamada Y, Ito S. **Crystal Structure of Alkaline Adaptation of an Industrial Enzyme.** *J. Mol. Biol.* (2001) 310:1079-1087.
13. Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubes JP, Comeau LC, Sarda L. **Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG.** Lipids (2002) 37: 563-573.
14. Levasseur A, Gouret P, Lesage-Meessen L. **Tracking the connection between evolutionary and functional shifts using the fungal lipase/feruloyl esterase A family.** BMC Evol Biol 6 (2006) 6:92.

15. Pastor J, Gallardo O, Sanz-Aparicio J, Diaz P. **Xylanases: molecular properties and applications**. J Polaina and AP MacCae Ed. Industrial Enzymes, 65-82
16. Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. **Functional classification of the microbial feruloyl esterases**. Appl Microbiol Biotechnol (2004) 63:647–652
17. Kayahara H, Miao Z, Fujiwara G, **Synthesis and biological activities of ferulic acid derivatives**. *Anticancer Res* (1999) **19**:3763–3768.
18. Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H, **Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats**. *Cancer Lett* (2000) **157**:15–21
19. Lo HH, Chung JG. **The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora**. *Anticancer Res* (1999) **19**:133–139.
20. Jeong YC, Jae HM, Keun HP. **Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity**. *Korean J Food Sci Technol* (2000) **32**:1403–1408.
21. Barghini P, Di Gioria D, Fava F, Ruzzi M. **Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions**. *Microbial Cell Factories* (2007) 6:13

22. Vafiadi C, Topakas E, Alderwick LJ, Besra GS, Christakopoulos P. **Chemoenzymatic synthesis of feruloyl D-arabinose as a potential antimycobacterial agent.** *Biotechnol Lett.* (2007) 29:1771-1774.
23. Topakas E, Stamatis H, Biely P, Kekos D, Macris B J, Christakopoulos P. **Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures.** *J. Biotechnol.* (2003), 102, 33-44.
24. Benoit I, Danchin EGJ, Bleichrodt RJ, de Vries R. **Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity.** *Biotechnol Lett* (2008) 30:387-396.
25. Yu P, Maenz DD, McKinnon JJ, Racz VJ, Christensen DA. **Release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus* ferulic acid esterase and *Trichoderma xylanase*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (2002) 50: 1625-1630.
26. Sandoval-González RS. **Diseño de un sistema para la hidrólisis del ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz.** Tesis Maestría en Farmacia. UANL (2009).
27. Sivakumar K, Karuppiyah V, Sethubathi GV, Thangaradjou T, Kanna L. **Response surface methodology for the optimization of α -amylase production by *Streptomyces* sp. ML12 using agricultural byproducts.** *Biologia* (2012) 67/1: 32-40.
28. Fontes-Pio T, Alves-Macedo G. **Cutinase production by *Fusarium Oxysporum* in liquid medium using central composite desing.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* (2008) 35: 59-67.

29. Yue Q, Yang HJ, Chao YCh, Zhang DF, Jiang YH, Wang JQ. **Feruloyl and acetyl esterase production of an anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. YQ2 effected by glucose and soluble nitrogen supplementations and its potential in the hydrolysis of fibrous feedstuffs.** Animal Feed Science and Technology. (2009) 153: 263-277.
30. Shin HD, Chen RR. **Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fursarium proliferatum* NRRL 26517.** Enzyme and Microbial Technology. (2006) 38: 478-485.
31. Ren X, Yu D, Han S, Yan F. **Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology.** Biosource Technology (2006) 97: 2345-2349.
32. Coman G, Bahrim G. **Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. P12-137 using response surface methodology and central composite design.** Ann. Microbiology (2011) 61:773-779.
33. Khurana S, Kappor M, Gupta S, Kuhad RC. **Statistical optimization of alkaline xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* under submerged fermentation using response surface design.** Indian J. Microbiology (2007) 47: 144-152.
34. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** Second Edition, Williams & Wilkins Eds., April 2001
35. Donaghy J, Kelly PF, McKay AM. **Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli*.** Appl Microbiol Biotechnol (1998) 50:257-260

36. Mastihuba V, Kremnický L, Mastihubová M. **A spectrophotometric assay for feruloyl esterases.** Anal Biochem (2002) 309:96-101
37. Blackwood KS, Turenne CY, Harmsen D, Kabani AM. **Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species.** J Clin Microbiol (2004) 42, 1626–1630.
38. Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. **Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of a small-subunit-ribosomal RNA sequence.** Lett Appl Microbiol (1991)13, 202–206.
39. Panda T, Gowrishankar BS. **Production and applications of esterases.** Appl Microbial Biotechnol (2005) 67: 160-169.
40. Boominadhan U, Rajakumar R, Vinayaga-Sivakumaar PK, Melvin-Joe M. **Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. Isolated from different wastes.** Botanya Research International 2 (2009) 2:83-87.
41. Sevinc N, Demirkan E. **Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil its enzymatic properties.** J. Biol. Environ. Sci. (2011) 5(14): 95-103
42. Hatti-Kaul R. **Enzyme production.** Biotechnology. In Encyclopedia of Life Support Systems. Vol. V.
43. Fan, PD. **Cell Wall Binding Properties of the *Bacillus subtilis* autolysin.** Journal of Bacteriology (1970) 103: 488-493

44. Donaghy J A, Bronnenmeier K, Soto-Kelly P F, McKay AM. **Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*** *J. Appl. Microbiol.* (2000), **88**: 458–466.
45. Faulds CB, deVries RP, Kroon PA, Visser J, Williamson G. **Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger***. (1997) 157: 239-244.
46. Heo SK, Lee HS, Ha SD. **A predictive model for the growth rate of *Bacillus cereus* in broth by response surface methodology**. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* (2009) 14: 202- 205.
47. Periago PM, Conesa R, Delago B, Fernández PS, Palop A. ***Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials**. *Food Technol, Biotechnol.* (2006) 44(I): 17-23.
48. Shemarova IV, Nesterov VP. **Evolution of mechanism of Ca²⁺-signaling: role of calcium ions in signal transduction in prokaryotes**. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* (2005) 41(I):12-19.
49. Naidu 2005 KS, Devi KL. **Optimization of thermostable alkaline protease production from the species of *Bacillus* using rice bran**. *African Journal of Biotechnology* (2005) 4:724-726.
50. Alam S, Hong J, Weigand WA. **Effect of yeast extract on α -amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens***. *Biotechnology and Bioengineering.* (1989) 33: 780-785.

51. Li M, Liao X, Zhang D, Du G, Chen J. **Yeast extract promotes cell growth and induces production of polyvinyl alcohol-degrading enzymes.** Enzyme Research (2011).
52. Suárez DC, Liria CW, Kilikian BV. **Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic acid production.** World Journal of Microbiology and Biotechnology. (1998) 14: 331- 335.
53. Frikha BG, Sellami-Kamoun A, Fakhfakh N, Haddar A, Nasri M. **Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1.** J Ind Microbiol Biotechnol (2005) 32:186-194.
54. Dodia MS, Rawal CM, Bhimani HG, Joshi RH, Khare SK, Sing SP. **Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6.** J Ind Microbiol Biotechnol (2008) 35:121-131.
55. Kukreja V, Bera MB. **Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2488: Partial purification, characterization and calcium dependent thermostability.** Indian Journal of Biotechnology (2005) 4:222-226.
56. Norris V, Grant S, Freestone P, Canvin J, Sheikh FN, Toth I, Trinei M, Modha K, Norman RI. **Calcium signaling in bacteria.** Journal of Bacteriology. (1996) 178(13): 3677-3682.