

ENZIMAS LIPOLITICAS BACTERIANAS: PROPIEDADES, CLASIFICACIÓN, ESTRUCTURA, APLICACIONES TECNOLOGICAS Y ASPECTOS LEGALES

Bacterial lipolytic enzymes: properties, classification, structure, technology applications and framework law

I. Navarro-González*, M.J. Periago

Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo 30100; Murcia, España.

* **Autor para correspondencia:** Inmaculada Navarro-González, Tel: 34 868 884798, Fax: 34 868 888497, Email: inmaculada.navarro@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 7 septiembre 2012

Aceptado: 2 diciembre 2012

RESUMEN

Las enzimas lipolíticas son biocatalizadores que llevan a cabo reacciones de síntesis, hidrólisis o intercambios de grupos en sustancias oleosas. Las enzimas lipolíticas presentes en la naturaleza han sido utilizadas en la producción de alimentos durante millones de años, pero en las últimas décadas han adquirido una mayor importancia; debido a la multitud de aplicaciones tecnológicas en las que son capaces de actuar y a las ventajas que presentan frente a los catalizadores convencionales no biológicos. Una de las principales fuentes de estos biocatalizadores son las bacterias, ya que son fáciles y rápidas de cultivar, entre otras ventajas, y gracias a las técnicas de biología molecular pueden obtenerse en grandes cantidades. El objetivo de este trabajo es describir algunas de las aplicaciones industriales de las enzimas lipolíticas en las diferentes industrias, además, de hacer una breve reseña sobre sus propiedades generales, clasificación, mecanismo de actuación y el marco legal que las engloba.

Palabras clave: enzimas alimentarias, procesado de alimentos, esterasas/lipasas.

ABSTRACT

The lipolytic enzymes are biocatalysts which carry out synthesis, hydrolysis reaction or transesterification of fat. The lipolytic enzymes that are found in nature have been used for the production of food during million years, but in the last decades they have acquired a high importance; due to multiple technologic applications in which they are able to act and to its advantages owned as opposed to non-biologic conventional catalysts. One of the main sources of these catalysts is bacterial, due to the fact that they are easy and quick to cultivate, among other advantages, and thanks to the molecular biology can be obtained in great amount. The aim of this paper is to describe several industrial applications of the lipolytic enzymes, and to do a slight review about its general properties, classification, acting mechanism and framework law.

Key words: food enzymes, food processing, esterases/lipases.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas lipolíticas son un grupo de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en animales, en plantas como en microorganismos; Independientemente de su naturaleza, todas ellas tienen una actividad común, ya que catalizan la hidrólisis de los enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol (Ro., et al., 2004).

Las enzimas lipolíticas bacterianas han recibido un gran protagonismo debido a las ventajas que presentan: poseen diversas actividades catalíticas, se pueden obtener en gran cantidad, son económicas, se producen de forma regular, son estables y su proceso de producción es más factible y seguro, debido a que los microorganismos son fáciles de cultivar por sus simples exigencias nutritivas y su tiempo de generación más reducido (Olempska-Beer et al., 2006).

Las enzimas lipolíticas bacterianas son activas en un amplio rango de sustrato, pudiendo realizar reacciones de síntesis, hidrólisis o de intercambio de grupos, muchas veces de forma altamente quimio, regio o estereoespecífica (actúan sobre un compuesto químico muy concreto, produciendo un solo tipo de reacción y un solo tipo de producto), y sin llevar a cabo reacciones laterales o generar subproductos. Además, estas enzimas son altamente estables en un amplio rango de temperaturas, pH y solventes orgánicos, aunque la mayoría presentan una mayor actividad a pH neutros o básicos. Son también

estables frente a diferentes detergentes, iones (aunque alguno puede activarlas o inhibirlas) y agentes químicos, y, en general, no requieren cofactores. Por estos motivos, y debido al conocimiento existente sobre estas enzimas, a su disponibilidad, y al hecho de que los procesos en los que intervienen son generalmente menos costosos y menos contaminantes, que sus correspondientes procesos químicos, las lipasas bacterianas son las enzimas más versátiles y más ampliamente utilizadas en biotecnología (Bornscheuer 2002).

Las enzimas microbianas han venido empleándose en proceso de fermentación tales como la fabricación de queso, vino, cerveza, pan, etc desde el Neolítico (Prajapati and Nair, 2003). Pero la producción de preparados enzimáticos data desde el siglo XIX (Olempska-Beer et al., 2006). Fecha a partir de la cual, las enzimas lipolíticas cobraron una gran importancia en la industria química, farmacéutica, alimentaria etc.

A nivel mundial hay diversidad de empresas que se han especializado en la producción y búsqueda de estas enzimas, y con las técnicas de mutagénesis dirigida e ingeniería genética se están desarrollando enzimas recombinantes que incluso pueden ser diseñadas desde su concepción para que catalicen una reacción química muy específica o bien sean más resistentes a determinadas condiciones de temperatura, pH, presencia de solventes, etc. Los productos obtenidos de las nuevas lipasas requerirán un es-

tudio para demostrar su inocuidad antes de su aplicación definitiva a la industria alimentaria. Los productos de este tipo estudiados hasta el día de hoy, no poseen efectos negativos sobre la población.

Estos condicionantes han llevado a la clonación y caracterización de muchas de estas enzimas, así como al estudio de los mecanismos moleculares que controlan su expresión, su plegamiento y su secreción. Por tanto, el objetivo de esta revisión es hacer una breve descripción sobre sus propiedades, clasificación, mecanismos de actuación y sus potenciales aplicaciones industriales.

PROPIEDADES GENERALES DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS BACTERIANAS

Atendiendo a la bibliografía, se puede decir, de forma genérica, que las enzimas lipolíticas se dividen en dos grandes grupos: las lipasas (EC3.1.1.3.) y las esterasas o carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) (Akoh *et al.*, 2004).

Las lipasas son específicas para acilglicérols con ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia; mientras que las esterasas actúan específicamente sobre acilglicérols de cadena corta (<10 átomos de carbono), y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Arpigny y Jaeger, 1999).

Estos dos tipos de enzimas se pueden diferenciar generalmente en base a otras características, las cuales están relacionadas directamente con la especificidad de sustrato. Así, las lipasas muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados, y presentan sitios de unión largos para acomodar al ácido graso a escindir. Sin embargo, las esterasas actúan sobre sustratos más solubles y con un grado de hidrofobicidad más variable. Además, las lipasas muestran un mayor número de aminoácidos no polares localizados en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo en comparación con las esterasas,

así como un rango de sustrato más amplio, una mayor regioselectividad y estereoespecificidad (Forjan *et al.*, 2000). Ambos enzimas muestran estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, siendo algo más pronunciado en lipasas.

Las esterasas también pueden ser distinguidas de las lipasas por el denominado “fenómeno de activación interfacial”, el cual sólo ha sido observado en lipasas. Este fenómeno de activación interfacial es debido a un dominio hidrofóbico, denominado “lid” (tapa), que se encuentra alrededor del centro activo de la enzima. Por lo que requieren una concentración crítica de sustrato para que se produzca el movimiento de “lid”, haciendo accesible el sustrato al centro activo (Verger., 1997). Por ello, las esterasas obedecen a la clásica cinética de Michaelis-Menten, mientras que las lipasas presentan una cinética compleja no Michaeliana. Las diferencias generales entre estas enzimas podemos verlas definidas en la tabla 1

Con respecto a su estructura, todas las enzimas lipolíticas presentan el plegamiento típico de las α/β hidrolasas (“ α/β hydrolase fold”), que consiste en una estructura central formada por 8 láminas β interconectadas por hélices α . El centro activo de estas enzimas, que está cubierto por un “lid” en las lipasas, tiene tres aminoácidos catalíticos cuya posición dentro del plegamiento suele estar conservada. Los tres aminoácidos que forman la triada catalítica son la serina nucleofílica, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina.

La serina catalítica está generalmente incluida en el pentapéptido conservado Gly(Ala)-X-Ser-X-Gly (donde X puede ser cualquier aminoácido), el cual forma un giro entre la lámina β_5 y la siguiente hélice α cuya función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica, y que es conocido como “nucleophilic elbow”. Además, el centro activo contiene otras estructuras que intervienen en la estabilización los intermediarios producidos durante la catálisis (“oxyanion hole”), o que se encargan de acomodar el ácido a escindir (“scissile fatty acid binding pocket”)

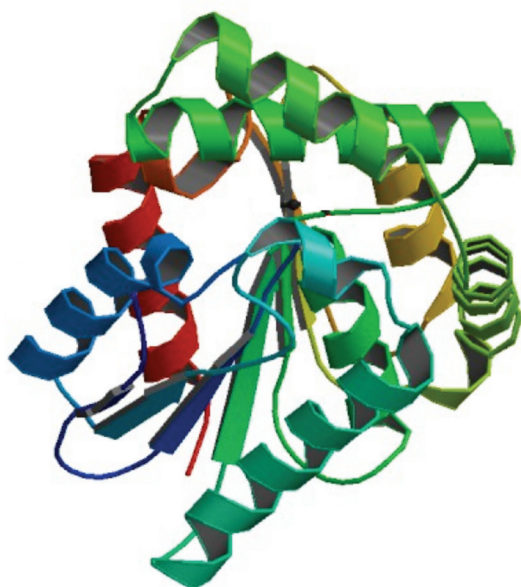


Figura 1. Estructura de la esterasa est30 (1TQH).

Fuente: Liu et al., 2004a

u otras partes del sustrato, y cuyas características condicionan la especificidad de sustrato y la selectividad de estas enzimas (Jaeger and Reetz., 1998).

Una esterasa bacteriana que ha sido cristalizada es la Est30 (PDB: 1TQH), procedente de *Geobacillus stearothermophilus* (Liu et al., 2004a); la cual es un dímero de 247 aminoácidos con un peso molecular de 28.2 KDa. Y la estructura tridimensional puede verse en la figura 1.

CLASIFICACIÓN DE LIPASAS Y ESTERASAS BACTERIANAS

En la bibliografía existente sobre las enzimas lipolíticas, existen diferentes formas de clasificarlas: en función de la especificidad de sustrato, en función de las secuencias de aminoácidos conservados o en función de la especificidad del sustrato y la sensibilidad a varios inhibidores de estas enzimas (Park *et al.*, 2006).

La clasificación más aceptada en la actualidad, fue propuesta por Arpigny y Jaeger en 1999. Estos autores estudiaron todas las enzimas lipolíticas bacterianas que había en el momento, y basándose en su secuencia de aminoácidos y en sus propiedades biológicas, realizaron una clasificación.

Estos autores las clasificaron en 8 familias: las lipasas verdaderas, la familia II o GDSL, la familia III, la familia IV o HSL (lipasa sensible a hormona), la familia V, la familia VI, la familia VII y la familia VIII. En la tabla 2 se muestran algunas de las enzimas lipolíticas que forman cada familia, y en la tabla 3 algunas que forman parte de la subfamilia I y su código de acceso en la base de datos NCBI. En las siguientes líneas se van describir las generalidades de las enzimas lipolíticas bacterianas de las diferentes familias propuestas por Arpigny y Jaeger en 1999.

Familia I o lipasas verdaderas

Las lipasas bacterianas verdaderas que primero se estudiaron y utilizaron industrialmente

Tabla 1. Diferencias generales entre lipasas y esterasa

Propiedad	Lipasa	Esterasa
<i>Sustratos</i>	Triglicéridos	Esteres simples
<i>Activación interfacial</i>	Sí	No
<i>Sustrato hidrofóbico</i>	Alta	Alta o baja
<i>Enantioselectividad</i>	Generalmente alta	Alta o baja
<i>Estabilidad en disolventes</i>	Alta	Alta o baja

Fuente: Bornscheuer et al., 2000

Tabla 2. Familia de las enzimas lipolíticas bacterianas

Familia	Cepa bacteriana	Nº acceso
I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipA)	D50587
	<i>Burkholderia glumae</i>	X70354
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D11455
	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)	M74010
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	U78785
	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715
	<i>Propionebacterium acnes</i>	X99255
II (GDLS)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480
	<i>Streptomyces scabies</i>	M57297
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014
	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	M86351
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053
IV (HSL)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1.	AF034088
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153
	<i>Moraxella</i> sp.	X53868
V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712
	<i>Moraxella</i> sp.	X53869
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096
VI	<i>Synechocystis</i> sp.	D90904
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S79600
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287
VII	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470
	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794
VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AAA99492
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1-	AAC60471

Fuente: Arpigny and Jaeger et al., 1999

Tabla 3. Clasificación de enzimas lipolíticas bacterianos de la familia 1

Subfamilia	Cepa bacteriana	Nº acceso	Similaridad	
			Familia	Subfamilia
1	<i>Pseudomonas aeruginosa (LipA)</i>	D50587	100	
	<i>Pseudomonas fluorescens C9</i>	AF031226	95	
	<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
	<i>Pseudomonas aeruginosa (LipC)</i>	U75975	51	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
	<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
	<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	
2	<i>Burkholderia gumae</i>	X70354	35	100
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Q05489	35	100
	<i>Burkholderia cepacea</i>	M58494	33	78
	<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	D11455	14	100
	<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51
4	<i>Bacillus subtilis (LipA)</i>	M74010	16	100
	<i>Bacillus pumilus</i>	A33992	13	80
	<i>Bacillus licheniformis</i>	U35855	13	80
	<i>Bacillus subtilis (lipB)</i>	C69652	17	74
5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	100
	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	AF134840	14	92
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	100
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AF096928	15	45
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	44
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	36
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	AF208229	14	36
	<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	12	36
7	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100
	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	U80063	14	50

Fuente: Arpigny and Jaeger et al., 1999

fueron las denominadas lipasas de *Pseudomonas*, nombradas así por la bacteria de la que proceden. Estas enzimas fueron subdivididas en *Pseudomonas* del grupo 1, 2 y 3, de acuerdo con la secuencia de sus aminoácidos.

Posteriormente, debido a que algunas especies de *Pseudomonas* fueron renombradas con el nombre de *Burkholderia*, y a la aparición de nuevas lipasas, estos autores decidieron agruparlas y nombrarlas por subfamilias. Quedan-

do dividida, la familia I en 6 subfamilias, que posteriormente fue ampliada a 7 por Jaeger y Eggert en el año 2002.

La subfamilia 1 y 2 presentan la peculiaridad de que requieren la ayuda de unas chaperonas para plegarse, encargadas de establecer los puentes disulfuro, denominadas Lif (*Lipase-specific foldase*).

Las lipasas que pertenecen a la subfamilia 4 y 5 son, también conocidas como lipasas de microorganismos Gram-positivos. Las lipasas de estas dos subfamilias presentan una gran similitud, formando las lipasas verdaderas de menor peso molecular (unos 20 kDa) la subfamilia 4 y de mayor peso molecular (unos 45 kDa) la subfamilia 5.

Las distintas lipasas de las especies de *Bacillus*, tanto de la subfamilia 4 como las de la subfamilia 5, tienen en común que una alanina está sustituyendo a la primera glicina del pentapéptido Ala-X-Ser-X-Gly del centro activo.

La subfamilia 6 queda integrada por lipasas de diferentes especies de *Staphylococcus*, las cuales presentan un peso molecular de unos 75kDa, y la subfamilia 7 por la lipasa de *Streptomyces cinnamoneus* (U80063) y *Propionibacterium acnes* (X99255).

Después de los cambios producidos, en la clasificación de las lipasas bacterianas verdaderas, por Jaeger y Eggert (2002), la clasificación queda resumida en la tabla 3.

Familia II o GDSL

Existe el consenso de que las esterasas/lipasas tienen conservada una secuencia de aminoácidos denominado pentapéptido, que está formado por una glicina, una serina y un ácido aspártico, intercalándose entre cada uno de ellos un aminoácido cualquiera, es decir, glicina- X-serina- X- aspártico. La característica más relevante de esta familia es que su pentapéptido no está formado por estos aminoácidos, sino por una glicina, seguido de un ácido aspártico, una serina, una leucina y una serina

(en algunos casos) de ahí que se le denominara GDSL. Pero como la última serina no es conservada en todas las proteínas de esta familia, se les ha reducido el nombre a GDSL. Debido a esto, las enzimas de esta familia no presentan el *nucleophilic elbow*.

Alineando la secuencia de aminoácidos de las proteínas que forman esta familia, se ha visto que algunas tienen conservados en la misma posición cuatro aminoácidos que están implicados en la actividad catalítica de la enzima, dando lugar a una subfamilia. Estos aminoácidos son una serina, un glutámico, una asparagina y una histidina, donde la serina provoca el ataque nucleofílico, mientras que el glutámico y la asparagina son donadores de protones y la histidina actúa desprotonando a la serina. La asparagina que actúa en actividad catalítica se encuentra situada delante de la histidina (unos 3 aminoácidos). Las enzimas que presentan esta secuencia de aminoácidos forman la subfamilia denominada Hidrolasas-SGNH (Akoh *et al.*, 2004).

Otra característica interesante de la familia GDSL es que presenta un dominio adicional en C-terminal que abarca aproximadamente 1/3 de su secuencia, que es similar al de las proteínas de autotransporte de factores de virulencia bacterianos.

Y los últimos estudios realizados sobre esta familia muestran que estas enzimas presentan un bolsillo catalítico muy flexible que varía con la unión a cada sustrato, por ello en esta familia hay tioesterasas, arilesterasas, fosfolipasas, etc (Akoh *et al.*, 2004).

Familia III

Las lipasas de esta familia fueron identificadas por primera vez en 1994 Cruz *et al.*, (1994) y mencionadas por Wei *et al.*, en 1998. Estos últimos autores resolvieron la estructura tridimensional de la lipasa extracelular de *Streptomyces exfoliatus* (M86351), y observaron que esta enzima presenta tanto la triada catalítica

como la forma tridimensional característica de las α/β -hidrolasas y además, se vio que tiene una identidad del 20% con la PAF-AH del plasma humano.

Familia IV o lipasa sensible a hormona (HSL)

Un número elevado de enzimas de esta familia presentan en la secuencia de aminoácidos una elevada similitud a la HSL de mamíferos, de ahí que se les haya denominado de la misma manera.

Las enzimas de este linaje, además del pentapéptido característico de la superfamilia (G-X-S-X-G) de las lipasas/esterasas bacterianas, también presentan la secuencia His-Gly-Gly-Gly, que aparece localizada entre los aminoácidos 70 y 100 de las enzimas, anteriores a la serina catalítica, donde la serina junto con una histidina y un glutámico son los aminoácidos responsables de su actividad catalítica, formando la triada catalítica.

De los estudios cristalográficos, se ha visto que la estructura de estas enzimas es la misma que las de las α/β hidrolasas, como ocurre con la mayoría de la superfamilia de las lipasas/esterasas bacterianas. Una peculiaridad que muestran, es que en su estructura tridimensional presenta dos regiones helicoidales separadas rodeando al centro activo que impide el acceso de sustratos de cadena larga, y la morfología que presentan, estas regiones, recuerda a la “lid” de las lipasas.

Al presentar la “lid” estas enzimas, se han realizado estudios para ver si presentan también el fenómeno de activación interfacial, cuya conclusión fue, que aunque presentan la “lid”, no requieren una cantidad crítica de sustrato para activarse. En estudios posteriores (Chahinian *et al.*, 2005) realizados con inhibidores específicos de serina como el PMFS (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo) o E600 (dietil-p-nitrofenil fosfato), con la HSL de mamíferos han sugerido que estas poseen la “lid”, característica de las lipasas verdadera, pero que su función es la de

proteger a la serina de estos inhibidores. Por lo que se ha deducido que en las esterases bacterianas de esta familia, la “lid” tiene la misma función.

Familia V

En esta familia encontramos enzimas de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Acetobacter pasteurianus* y *Haemophilus influenzae*), psicrófilas (*Moraxella sp*) y termófilas (*Sulfolobus solfataricus*). Todas ellas muestran una similitud comprendida entre el 20% y el 25% con otras enzimas bacterianas no lipolíticas, como son las dehalogenasas y las haloperoxidasas. Todas ellas poseen la triada catalítica formada por la serina, el glutámico o el aspártico y la histidina y el plegamiento característico de las α/β -hidrolasas.

Familia VI

Las lipasas bacterianas incluidas en esta familia son esterases de pequeño peso molecular, entre 23 y 26 kDa, y que curiosamente muestran un 40% de homología con las lisofosfolipasas de eucariotas. Hasta la resolución de la estructura tridimensional de la carboxilesterasa de *Pseudomonas fluorescens* (1AUO), poco se sabía sobre esta familia. De hecho, lo que se conoce de esta familia es gracias a los estudios realizados en este tipo de enzimas (Kim *et al.*, 1997a).

Esta carboxilesterasa está formada por dos subunidades, es decir, es un dímero que tiene las características de las α/β -hidrolasas y la clásica triada catalítica constituida por serina, aspártico e histidina. Otra característica muy peculiar de esta enzima es que hidroliza sustratos pequeños con una gran especificidad, pero no presenta actividad ninguna sobre triglicéridos.

Prim *et al.*, (2006) alineando las secuencias de aminoácidos de las proteínas, putativas y caracterizadas, de esta familia, encontraron una

región que revelaban la existencia de 6 grupos definidos que mantenían una concordancia con la filogenética bacteriana, motivo por el cual propusieron la subdivisión de la familias VI en seis subfamilias.

Familia VII

En la familia VII encontramos esterasas con un peso molecular, de aproximadamente unos 55 KDa. Todas las enzimas de esta familia presentan una elevada homología con acetilcolinesterasas de eucariotas y carboxilesterasas del intestino e hígado.

La carboxilesterasa de *Arthrobacter oxydans* (Q01470) es particularmente activa sobre el herbicida fenilcarbamato, concretamente hidroliza las cadenas laterales del carbamato.

La esterasa de *Bacillus subtilis* presenta una elevada eficacia para hidrolizar los ésteres de p-nitrobenzil, siendo usada para proteger los grupos funcionales durante la síntesis de antibióticos β -lactámicos.

Familia VIII

Esta familia está formada por enzimas que tienen unos 380 aminoácidos y una elevada homología con algunas β -lactamasas de clase C.

La principal diferencia de esta familia con el resto, es que las tres enzimas que la forman presentan un tramo de unos 150 aminoácidos, desde la posición 50 hasta la 200 aproximadamente, que tiene una homología del 45% con la proteína de *Enterobacter cloacae* (β -lactamasas). Este rasgo sugiere que esta familia de esterasas poseen un sitio activo muy similar al encontrado en β -lactamasas de clase C y que presentan los motivos Se-X-X-Lys en el N-terminal.

Pero son necesarios más estudios estructurales de las proteínas que forman esta familia para dilucidar que aminoácidos son los responsables de la catálisis enzimática.

Familia IX, X, XI, XII, XIII

Debido a que la clasificación propuesta por Arpigny y Jaeger en 1999 ha sido la más aceptada, cada vez que es caracterizada y estudiada una nueva enzima lipolítica bacteriana, se hacen estudios de homología para clasificarla en alguna familia de las propuestas por estos autores. Como, en algunos casos, las homologías entre las nuevas y las existentes ha sido muy pequeña, han sido creadas nuevas familias.

Así, Handrick et al., (2001) descubrió una nueva enzima, la nPHB depolimerasa Phaz7, la cual mostró una mayor homología con la LipB de *Bacillus subtilis* que con otras hidrolasas. Por este motivo y continuando con la clasificación de Arpigny and Jaeger (1999), esta enzima pasó a formar la familia IX.

Levisson et al., (2007), estudiaron una esterasa de *Thermotoga maritime* y consecutivamente esta paso a constituir la familia X.

Con la aplicación de técnicas de metagenómica para realizar screening de enzimas lipolíticas, han sido descubiertas multitud de ellas. Fruto de estas técnicas han surgido dos nuevas familias; la familia XI, compuesta por la lipasa LipG (Lee et al., 2006) y XII, formada por LipEH166 (Kim et al., 2009b).

La familia XIII, la forman dos esterasas, la Est30 de *Geobacillus stearothermophilus* (Iiu et al., 2004) y la CEGK de *Geobacillus kaustophilus* (Montoro et al., 2009).

Recientemente, Rao et al., (2011) postularon que la esterasa EstA3 de *Thermoanaerobacter tengcongensis* pase formar parte de una nueva familia, la número XIV.

MECANISMO DE ACTUACIÓN

La evidencia del mecanismo de actuación ha sido observada por el estudio de los inhibidores de lipasas y por el estudio del análisis estructural por Stock et al., (2004).

El mecanismo de actuación, que es el mismo en lipasas que en esterasas, está basado en

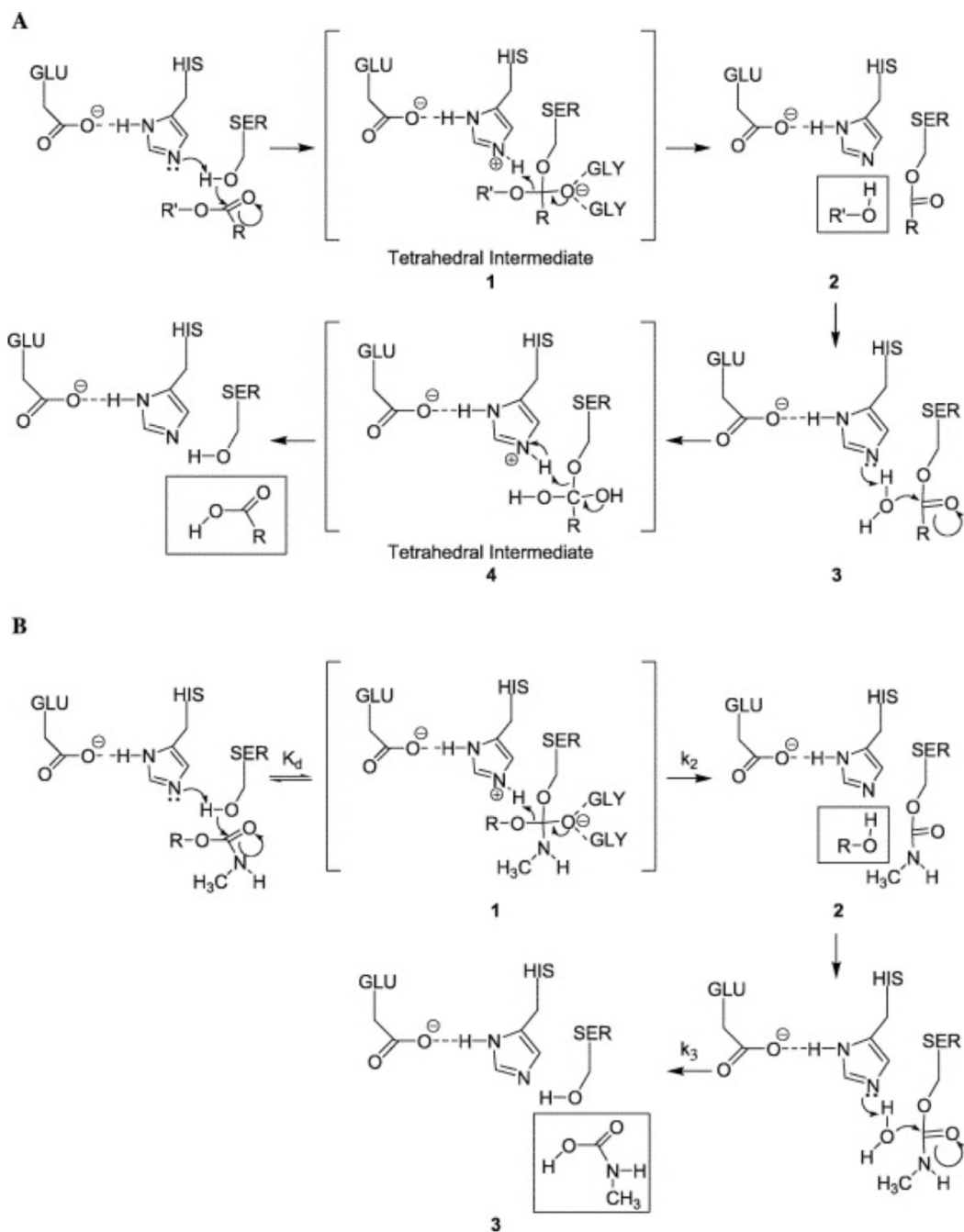


Figura 2. Mecanismo de actuación de las enzimas lipolíticas

Fuente: Stock et al., 2004

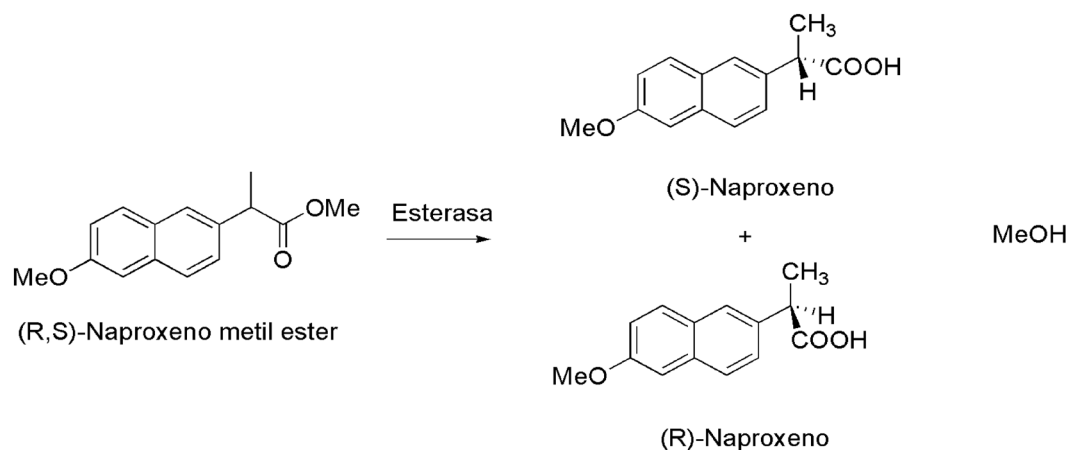


Figura 3. Hidrólisis del (R,S)-naproxen catalizada por una esterasa

Fuente: Hoon et al., 2009

un sistema de intercambio de cargas y consta de 4 pasos, como se muestra en la figura 3.

Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre enlace éster del sustrato. La serina es capaz de atacar al sustrato gracias a protonación de la histidina, y esta a su vez se estabiliza gracias al puente de hidrogeno que forma con el ácido glutámico. La actuación de estos dos aminoácidos, histidina y glutámico, se conoce con el nombre de sistema de relevos de cargas (*charge relay*), porque gracias a las interacciones químicas que se producen entre ambos se lleva a cabo la activación de la serina. Este ataque nucleofílico inicial forma un tetraedro intermedio (figura 2 (1)) que es estabilizado por la presencia de dos glicinas cercanas al centro activo, formando el centro oxaniónico. Este tetraedro es rápidamente descompuesto, con la ayuda de la histidina protonada, lo que provoca la liberación del alcohol del enlace ester y la formación del complejo acyl-enzima (figura 2 (2)).

Ahora, en presencia de agua, el complejo acyl-enzima es atacado por una molécula de agua, con la ayuda de la histidina (figura 2 (3)),

formándose un segundo tetraedro intermedio (figura 2 (4)). Inmediatamente después de la formación del tetraedro intermedio se produce la liberación del ácido graso y como consecuencia de ello la regeneración del centro activo.

APLICACIONES ANCESTRALES DE LAS ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Los alimentos fermentados se consumen de forma generalizada en todo el mundo. A pesar de los avances tecnológicos, la mayor parte de las elaboraciones de dichos alimentos, se basan todavía en técnicas tradicionales. En este tipo de alimentos, el potencial enzimático de los microorganismos es esencial para las características finales del producto, siendo también responsables de las características sensoriales u organolépticas de los mismos.

En el vino, los compuestos que estimulan nuestros sentidos visuales, olfatorios, gustativos y táctiles se proceden por reacciones de síntesis, hidrólisis o de modificaciones que tienen lugar durante el proceso de vinificación. En muchos de estos procesos están implicados las enzimas procedentes de la flora asociada a la uva

(Matthews et al., 2004). Los esteroides son un grupo importante de compuestos volátiles que contribuyen al sabor y aroma del vino (Matthews et al., 2007). Estos esteroides pueden proceder de una esterificación química o bien de la acción enzimática de enzimas lipolíticas procedentes de la microflora del vino como bacterias del ácido láctico (*Oenococcus oeni*, *Lactobacillus sp* and *Pediococcus sp*) o de levaduras del género *Saccharomyces* (Sumbly, Grbin y Jiranek 2010).

Durante la maduración de los productos cárnicos fermentados ocurren, también, diferentes reacciones que dan lugar al producto final. Una de esas reacciones, que le confieren a los crudocurados sus características organolépticas, es la lipólisis; la cual es llevada a cabo por los diferentes grupos microbianos (Casaburi et al., 2008; Flores y Tolddrá, 2011; Hugas y Monfort, 1997).

Otro ejemplo de como el potencial enzimático interviene en el desarrollo de las características sensoriales de los alimentos, son los productos lácteos. Los ácidos grasos libres procedentes de la acción de lipasas y esteroides de la leche o de la flora, le confieren a los productos lácteos sus propiedades sensoriales características (Choi et al., 2004; Liu et al., 2004b).

APLICACIONES TECNOLÓGICAS DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Las enzimas lipolíticas microbianas constituyen un amplio, versátil e importante grupo de enzimas con aplicaciones biotecnológicas, debido a su versatilidad de sustratos y fuentes, a su estabilidad bajo las condiciones a las que son llevadas a cabo las reacciones y a su bajo coste de fabricación (Hasan, 2009).

Aplicaciones en la industria farmacéutica y química

• Síntesis de compuestos puros

Aunque un número considerable de carboxi-

lesterasas microbianas son conocidas y han sido sobreexpresadas en diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes, solamente unas pocas han sido usadas para la síntesis de compuestos puros, debido a su moderada enantioselectividad.

En numerosos ámbitos como por ejemplo la farmacia y la agroquímica, los compuestos químicos activos son cada vez más complejos, y con gran frecuencia, constan de uno o varios centros de asimetría.

La mayoría de los productos comercializados en química fina lo son en forma racémica, es decir, que todas las formas enantiómeras y diastereoisómeras están presentes en la materia activa. Ahora bien, en muchísimos casos; solo una de las formas posee la actividad que se pretende, mientras que los otros isómeros ópticos son inactivos y pueden ir en contra del efecto deseado e incluso presentar riesgos para los mamíferos y el medio ambiente. Por tanto es importante poder disponer de procedimientos de síntesis química o bioquímica (ejemplo, enzimática) que conduzcan al isómero deseado.

En la bibliografía son conocidos los procedimientos de enriquecimiento enantiómero por catálisis enzimática, consistiendo en la esterificación de la mezcla enantiomérica para su posterior catálisis enzimática específica que conduce a un compuesto que tiene un elevado exceso en un enantiómero. Este procedimiento, permite obtener enantiómero sustancialmente puro, bien en configuración S ó R (figura 3) (Bournscheuer y Kazlauskas, 1999; Reetz, 2004)

Tales compuestos quirales incluyen los ácidos 2-arilpropiónicos, conocidos como agentes anti-inflamatorios no esteroideos; que incluyen el ibuprofeno, el naproxen y el cetoprofeno. Una carboxilesterasa de *Bacillus subtilis* es utilizada para resolución del (R,S)-ibuprofeno metilester y (R,S)-naproxen metilester. Otra esterasa de *Bacillus thai*, también hidroliza de forma selectiva los ésteres etílicos y metílicos de los mismos compuestos mencionados (Warneck et al., 1994).

Las cepas *Pseudomonas fluorescens* (Ji-Youn *et al.*, 2003) y *Geobalillus stearothermophilis* (Ji-Youn *et al.*, 2002) tienen una esterasa con actividad sobre (R,S)-ketoprofen methyl ester.

Las lipasas y esterases (*Pseudomonas fluorescens* y *Achromobacter sp.*) también se utilizan para la hidrólisis enzimática de ésteres del ácido (3SR,4RS)-4-(4-fluorofenil)-6-oxopiperidin-3-carboxílico, que es un intermedio de la paroxentina, que a su vez es un potente antidrepepésivo (Guisan, J.M. *et al.*, 2002)

• Síntesis de antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son todos aquellos que tiene en su estructura un anillo β -lactámico y actúan bloqueando el centro activo de un grupo de enzimas involucradas en los primeros estadios de la construcción de la pared bacteriana y que reciben el nombre de Proteínas de Unión de Penicilinas (*Penicillin Binding Proteins*, PBP's). Algunas bacterias se han adaptado produciendo β -lactamasas (cefalosporinasas y penicilasas), enzimas que catalizan la ruptura del anillo cefalosporínico, evitando así su posterior acción sobre las PBP's. Otro mecanismo de defensa ha sido la expresión de PBP's modificadas, con baja afinidad por penicilina y capaces de llevar a cabo su función incluso en presencia de concentraciones elevadas de antibiótico. La proliferación entre las especies bacterianas patógenas de cepas resistentes a las penicilinas naturales ha hecho necesaria la búsqueda

de nuevas moléculas capaces de sortear los mecanismos de defensa mencionados. La modificación de la cadena lateral de penicilinas y cefalosporinas ha sido, por tanto, una herramienta muy eficaz en el desarrollo de nuevos fármacos con espectros de actividad y estabilidades significativamente mejorados.

Con el aislamiento del grupo básico de la cefalosporina C, el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), y con el agregado de diferentes cadenas laterales, fueron obtenidos una gran variedad de derivados semi-sintéticos con una actividad antibacteriana mucho mayor que la sustancia madre de partida (Quintiliani *et al.*, 1982). La desacetilación del núcleo cefalosporínico supuso la generación de otros compuestos de gran importancia comercial, la preparación de antibióticos β -lactámicos. Y estos se obtienen a partir de cefalosporina C o 7-ACA, mediante procesos químicos o enzimáticos (figura 4). El uso de esterases para producir desacetilcefalosporinas fue primeramente demostrado con la acetil esterases de la corteza de cítricos (Jeffrey *et al.*, 1961). Posteriormente, otras esterases y lipasas (Carrea *et al.*, 1996) han sido publicadas y patentadas con la habilidad de desacetilar compuestos β -lactámicos. Entre los microorganismos donde ha sido encontrada esta actividad esterasa están *Aureobasidium* spp. (Imanaka *et al.*, 1982), actinomicetos (Demail *et al.*, 1963), *esquizomicetos* (Walton, 1996), y algunas especies de *Bacillus* (Kim *et al.*, 1999c). Dentro de este último género, se han descrito varias cepas de *B. subtilis* en la



Figura 4. Desacetilación de la posición 3' del núcleo cefalosporínico del 7ACA.

bibliografía, pero en concreto *B. subtilis* SHS 0133 ó tipo 168 (Mitsushima *et al.*, 1991) y *B. subtilis* ATCC6633 (Knauseder *et al.*, 1999) son de especial interés industrial en sus formas clonadas y sobreexpresadas en *Escherichia coli* o la producción de formas quiméricas de cefalosporina C acetilada; que fusiona una región de la secuencia de nucleótidos de una serin esterase de *Bacillus subtilis* ATCC6633 con otra región de la secuencia de nucleótidos de una serin esterasa de *Bacillus subtilis* SHS 0133 o tipo 168, dando lugar a una proteína quimérica (Sánchez-Ferrer *et al.*, 2007).

Aplicaciones en la industria alimentaria

• Aplicación en la industria panadera

El ácido felúrico es un ácido fenólico que se encuentra unido a distintos polisacáridos de la pared celular de las plantas mediante enlaces tipo éster (Fazary and Ju, 2007)

Ha sido demostrado que el ácido felúrico y los diferulatos de este ácido tienen una notable capacidad antioxidante (García-Conesa *et al.*, 1999). Esta capacidad resulta de gran interés para las industrias de alimentación, cosmética y farmacéutica (Baublis, *et al.*, 2006). En definitiva, se trata de una molécula con importantes funciones biológicas y con interesantes aplicaciones industriales.

Por ello, han adquirido un gran interés las ferúlicas esterases, capaces de romper el enlace éster y liberar el ácido felúrico a partir de sustratos lignocelulósicos.

Un ejemplo del uso de estas enzimas en alimentación es la ferúlica esterasa de *Streptomyces thermocarboxydus*, empleada como coadyuvante tecnológico en los procesos de panificación de masas de harina. La aplicación de esta enzima en este proceso da lugar a la obtención de una masa más fluida y menos viscosa, optimizándose la fase de amasado. Durante la cocción, la masa aumenta el volumen de las piezas de pan y el producto final de panificación presenta

una corteza lisa, crujiente y dorada, de miga con alveolado uniforme y mostrando un buen comportamiento durante el proceso de conservación (Copa *et al.*, 2006)

Una reciente aplicación, que está acaparando un gran interés, es la obtención de ácido felúrico a partir de subproductos de la industria alimentaria; para su posterior aplicación en otras industrias farmacéutica o en alimentaria (Topakas *et al.*, 2007). A su vez, el ácido felúrico puede ser convertido a vainilla enzimáticamente, para mejorar el aroma y el sabor de algunos alimentos (Bornscheue, 2002).

• Aplicación en la industria de los aditivos alimentarios

Los ácidos fenólicos y flavonoides son un grupo importante de compuestos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Tanto los ácidos fenólicos como los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina y farmacología, como antimicrobianos, anticancerígenos, antibacterianos, estimulantes del sistema inmunitario, antivirales, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, anticancerígenos, antialérgicos etc (Figuerola-Espinosa y Villeneuve., 2005; Chevil, *et al.*, 2006).

Su uso en la industria de la alimentación, de la cosmética y farmacéutica está muy limitado por su baja solubilidad y estabilidad en soluciones lipofílicas. Para ello se ha desarrollado la acilación enzimática de estos compuestos por esterases (*Streptomyces rochei*) y lipasas (*Burkholderia cepacea*) aumentando no solo su solubilidad, sino su estabilidad y su poder antioxidante (Chevil, *et al.*, 2006).

Por ejemplo, los ésteres del ácido gálico (E310 (galato de propilo), E311 (galato de octilo), E312 (galato de dodecilo) (figura 5) son usados como antioxidantes en alimentación y el E311, además, presentan una importante actividad antimicrobiana y antifúngica (Figuerola-Espinosa y Villeneuve., 2005).

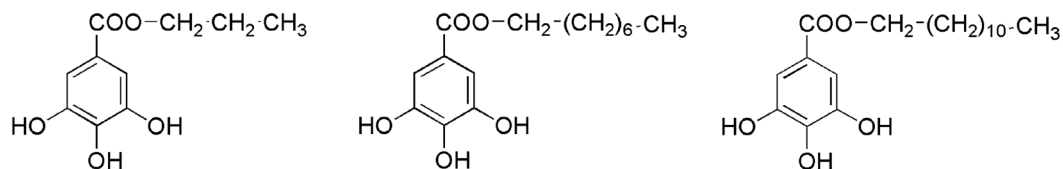


Figura 5. Galato de propilo, galato de actilo y de dodecilo, respectivamente.

Fuente: Ha et al., 2007

Otra molécula con elevado poder antioxidantes es la vitamina C o ácido ascórbico, que es ampliamente utilizada en la industria de alimentos como antioxidante. La vitamina C plantea, también, problemas de solubilidad en soluciones lipofílicas; y para incrementar su solubilidad en estas soluciones se realiza su esterificación enzimática con lipasas o esterasas (Villeneuve, 2007). Un ejemplo de una enzima lipolítica bacteriana utilizada para la esterificación de la vitamina C es la lipasa de *Bacillus stearothermophilus* SB1 (Bradoo et al., 1999).

Los aminoácidos no son sustratos naturales de lipasas pero también pueden ser esterificados, denominándose lipoaminoácidos; los cuales presentan actividad antimicrobiana. Estas reacciones enzimáticas no están muy desarrolladas debido a la baja solubilidad de los aminoácidos en solventes orgánicos (que es donde se lleva a cabo la reacción enzimática) (Villeneuve, 2007).

Los carotenoides son pigmentos naturales sintetizados por bacterias, hongos, plantas y en menor cantidad por animales. Los carotenoides son empleados, industrialmente, como colorantes artificiales en piensos y alimentos. Los carotenoides pueden acumularse libres o esterificados. Para la liberación de los esteres de carotenoides se emplean esterasas y lipasas procedentes de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas alcaligenes*, *Agrobacterium tumefaciens* (Ralf et al., 2007)

• Aplicación en la industria láctea

Las enzimas lipolíticas, concretamente las lipasas, han sido extensamente utilizadas en la industria láctea, por su capacidad de hidrólisis. Las aplicaciones más destacadas de estas enzimas en la industria láctea son en la fabricación del queso, aceleran la velocidad de su maduración, la lipólisis produce un incremento de sabor de este y a la lipólisis de materia grasa y nata.

Dependiendo de la especificidad de las lipasas empleadas pueden liberarse ácidos grasos de cadena corta (C4-C6), que aportan un sabor fuerte y penetrante, o bien pueden liberarse ácidos grasos de cadena larga (>C12), de aspecto más jabonoso, que son metabolizados por los microorganismos presentes en el queso para producir otros productos aromáticos, como β-cetoácidos (Schmid y Verger, 1998).

Algunas cepas bacterianas empleadas como fuentes de lipasas son *Pseudomonas spp.* y diferentes especies de *Staphylococcus* (Saxena et al., 2001).

Las lipasas, también juegan un papel importante en la preparación de saborizantes con sabor a queso, que pueden ser empleados para mejorar el sabor del queso, o conferir este sabor a otros alimentos como salsa, sopas, “dips” etc. (Silvert et al 2007; Lecouteix y Guichard 2003).

• Aplicación en la industria de grasas y aceites

Las grasas y aceites forman parte de los alimentos, y en algunos casos son los componentes mayoritarios. El valor nutricional, las propiedades físicas y características sensoriales de una grasa están influenciados por el número de carbonos de sus ácidos grasos, la posición que ocupa y el grado de insaturaciones. Las lipasas permiten modificar las propiedades de las grasas o aceites alterando la posición de los ácidos grasos en la molécula de glicerol (transesterificación) o reemplazando uno o más ácidos grasos por otros nuevos (interesterificación). Así, las grasas con menos valor comercial pueden ser convertidas a grasas con un mayor valor comercial mediante métodos enzimáticos (Sharma et al., 2001). Al producto de estas reacciones se les denomina “lípidos estructurados”. Esto lípidos presentan importantes propiedades medicinales y funcionales para aplicaciones alimentarias.

Por ejemplo, la manteca de cacao es utilizada para la producción de chocolate y con frecuencia la disponibilidad y el costo fluctúan. Sin embargo, aceites como el de palma son baratos y de fácil abastecimiento. Lo que se realiza es modificar el ácido palmítico del aceite de palma por el ácido esteárico mediante reacciones de interesterificación enzimáticas. La grasa resultante de este proceso presenta propiedades similares a la manteca de cacao (Bloomer et al., 1990); Undurraga et al., 2001).

Otro ejemplo con aplicación en la nutrición clínica es la síntesis de triglicéridos en los que en la posición 1 y 3 se une un ácido graso de cadena media (M) (de 6 a 12 carbonos) y en la posición 2 uno de cadena larga (L). Estos triglicéridos son denominados MLM, presentando la peculiaridad de que tienen un menor contenido calórico (21-29 kJ/g) que los aceites y grasas convencionales (38 kJ/g), al aportar los ácidos grasos de cadena media menos energía que los de cadena larga (Smith,

Finley y Leveille, 1994). Además, durante su digestión, los ácidos grasos de cadena media liberados por la acción de la lipasa pancreática son transportados, preferentemente, por la vena porta hacia el hígado debido a que tienen una mayor solubilidad, donde se metabolizan tan rápidamente como la glucosa. Debido a que no son fáciles de reesterificarse de nuevo, tienen poca tendencia a acumularse en el cuerpo como grasa almacenada, con importantes beneficios para el control del peso (Osborn and Akoh, 2002).

Los lípidos estructurados son también utilizados en pacientes con insuficiencia pancreática y el síndrome de mala absorción de grasa (Iwasaki and Yamane, 2000)

EL MARCO LEGAL DE LAS ENZIMAS CON APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El marco legal actual referente a las enzimas alimentarias esta sujeto al Reglamento (CE) N° 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 16 de diciembre de 2008, sobre enzimas alimentarias.

Este reglamento debe aplicarse a las enzimas utilizadas con fines tecnológicos en la fabricación, la transformación, la preparación, el tratamiento, el envase, el transporte o el almacenamiento de los alimentos, incluidas las utilizadas como auxiliares tecnológicos (denominadas en lo sucesivo “las enzimas alimentarias”). Por lo tanto, no debe ampliarse este reglamento a las enzimas que no se añaden a los alimentos para desempeñar una función tecnológica sino que se destinan al consumo humano, como las enzimas con finalidad nutritiva. No deben considerarse enzimas alimentarias los cultivos microbianos utilizados tradicionalmente en la producción de alimentos, por ejemplo el vino y el queso.

También quedan excluidas las enzimas alimentarias utilizadas exclusivamente para la producción de aditivos alimentarios, que en-

tran en el ámbito de aplicación del Reglamento (CE) N°1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. Sin embargo, cuando estas enzimas alimentarias se utilizan como tal en los alimentos, están reguladas por el Reglamento (CE) N° 1332/2008. Las enzimas y las preparaciones enzimáticas utilizadas en las prácticas enológicas autorizadas, cumplirán los requisitos de este Reglamento.

Las enzimas alimentarias que entre en el ámbito de aplicación del Reglamento (CE) N° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente, también deben autorizarse conforme al Reglamento (CE) N° 1332/2008.

El desarrollo de nuevas enzimas alimentarias requerirá de una autorización para su comercialización. Para ello, el Reglamento (CE) N° 1331/2008 del Parlamento Europeo y del consejo del 16 de diciembre de 2008, establece el procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios. Mediante el Reglamento (CE) N° 234/2011 del Parlamento Europeo y del consejo del 1 de marzo de 201, se establece el procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios.

BIBLIOGRAFÍA

- AKOH, C., LEE, C., LIAW, C., HUANG, H., SHAW, F. 2004. GDSL family of serine esterase/lipase. *Prog. Lipid. Res.* 43: 534-552.
- ARPIGNY, L., JAEGER, E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- BAUBLIS, A., DECKER, A., ALYDESDALE, F.M. 2006. Antioxidant effects of aqueous extracts from wheat based ready to eat breakfast cereals. *Food. Chem.* 68:1-6.
- BLOOMER, S., ADLERCREUTZ, P., MATIASSEN, B. 1990. Triglyceride interesterification by lipase. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *JAOCS.* 67: 519-524.
- BORNSCHEUER, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysts. *FEMS. Microbiol. Rev.* 26:73-81.
- BORNSCHEUER, U.T., KAZLAUSKAS, R.J. 1999. Hydrolase in organic synthesis: Regio- and stereoselective biotransformations. *Wiley-VCH, Weinheim.*
- BRADDOO, S., SAXENA, R.K., GUPTA, R. 1999. High yield of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification. *JAOCS.* 76:1291-1295.
- CARREA, G., CORCELLI, A., PALMISANO, G., RIVA, S. 1996. Preparation of 3-deacetyl cephalosporins by *Aspergillus niger* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 52:648-652.
- CASABURI, A., DI MONACO, R., CAVELLA, S., TOLDRÁ, F., ERCOLINI, D., VILLANI, F. 2008. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food. Microbiol.* 112:223-229.
- CHAHINIAN, H., ALI, Y., ABOUSALHAM, A., PETRY, S., MANDRICH, L., MANCO, G., CANAAN, S., SARDA, L. 2005. Substrate specificity and kinetic properties of enzyme belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1738:29-36.
- CHEVIL, L., HUMEAU, C., FALCIMAIGNE, A., ENGASSER, J.M., GHOUL, M. 2006. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process. Biochem.* 41:2237-2251.
- CHOI, Y.J., MIGUEZ, C.B., LEE, B.H. 2004. Characterization and Heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3213-3221.
- COPA, J.L., SOLIVERY, J., CABALLERO, A. 2006. Utilización de felúrico esterasa en masas de harina de trigo. P200302033.

- CRUZ, H., PEREZ, C., WELLINGTON, E., CASTRO, C., SERVIN-GONZÁLEZ, L. 1994. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene*.144:141-142.
- DEMAIN, A.L., NEWKIRK, J.F., HENDLIN, D. 1963. Effect of methionine, norleucine, and lysine derivatives on cephalosporin C formation in chemically defined media. *J. Bacteriol.* 85:339-344.
- FAZARY, A.E., JU, Y-H. 2007. Feruloyl Esterases as Biotechnological Tools: current and future perspectives. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* 39:811-828.
- FIGUEROA-ESPINOSA, M.C., VILLENEUVE, P. 2005. Phenolic acid enzymatic lipophilization. *J. Agric. Food. Chem.* 53:2779-2787.
- FLORES, M., TOLDRÁ, F. 2011. Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends. Food. Sci. Technol.* 81-90.
- FOJAN, P., JOHNSON, P.H., PETERSEN, T.N., PETERSEN, S.B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie.* 82:1033-1041.
- GARCÍA-CONESA, M.T., WILSON, P.D., PLUMB, G.W., RALPH, J., WILLIAMSON, G. 1999. Antioxidant properties of 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-B-B'-biccinnamic acid (8-8-difeluric acid non cyclic form) antioxidant properties of 8-8-diferuacid. *J. Sci. Food. Agr.* 79:379-384.
- GUISAN, J.M., FERNÁNDEZ, G., FERNÁNDEZ, R., MATEO, C., CEÍÑOS, C., RAMÓN, E. 2002. Procedimiento de hidrólisis enzimática de ésteres del ácido (3SR,4RS)-4-(4-Fluorofenil)-6-Oxopiperidin-3-carboxílico con biocatalizadores de lipasas o esterasas inmovilizadas. WO/09802556.
- HA, T.J., KUBO, I. 2007. Slow-binding inhibition of soybean lipoxygenase-1 by dodecyl gallate. *J. Agric. Food. Chem.* 55:446-451.
- HANDRICK, R., REINHARDT, S., FOCA-RETE, M.L., SCANDOLA, M., ADAMUS, G., KOWALCZUK, M., JENDROSSEK, D. 2001. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acid. *J. Biol. Chem.* 276: 36215-36224.
- HASAN, F., SHAH, A., HAMEED, A. 2006. Industrial application of microbial lipases. *Enzyme. Microbial. Technol.* 39: 235-351.
- HOON, K.C., LEE, J.H., KIM, S.W., KANG, J.W. 2009. Lipase-catalysed esterification of (S)-Naproxen ethyl ester in supercritical carbon dioxide. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1596-1602.
- HUGAS, M., MONFORT, J. 1997. Bacterial starter culture for meat fermentation. *Food. Chem.* 29:547-554.
- IMANAKA, H., MIYOSHI, T., KONOMI, T., KUBOCHI, Y., HATTORI, S., KAWAKITA, T. 1982. Process for the preparation of deacetylcephalosporin C. EP0044736.
- IWASAKI, Y., YAMANE, T. 2000. Enzymatic synthesis of structural lipids. *J. Mol. Catal B: Enzym.* 10:129-140.
- JAEGER, K.E., EGGERT, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:390-397.
- JAEGER, K.E., REETZ, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends. Biotechnol.* 16:396-403.
- JEFFERY, J. D., ABRAHAM, E.P., NEWTON, G.G.F. 1961. Deacetylcephalosporin C. *Biochem. J.* 81:591-596.
- JI-YOUN, K., GI-SUB, C., IN-SU, J., YEON-EOO, R., GEUN-JOONG, K. 2002. A new isolate *Bacillus sterothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to @-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning. *J. Mol. Catal B: Enzym.* 18:133-145.
- JI-YOUN, K., GI-SUB, C., IN-SU, J., YEON-EOO, R., GEUN-JOONG, K. 2003. A systematic approach for yielding a potential pool of enzymes: practical case for chiral

- resolution of (R,S)-Ketoprofen ethyl ester. *Protein. Eng.* 16:357-364.
- KIM, K.K., SONG, H.K., SHIN, D.H., HWANG, K.Y., CHOE, S., YOO, O.J., SUH, S.W. 1997a. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. *Structure.* 5:1571-1584.
- KIM, E.Y., OH, K.H., LEE, M.H., KANG, C.H., OH, T.K., YOON JH. 2009b. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 257-260.
- KIM, Y.D., JEONG, I.S., LEE, S.H., CHOI, D.H., HAN, K.S., LIM, B.S. 1999c. Cephalosporin deacetylase, gene coding for it, and preparation method of deacetylated cephalosporin compounds using it. WO99/55881.
- KNAUSEDER, F., SCHIESTL, M., SCHOERGENDORFER, K. 1999. Nucleic acid molecule encoding a cephalosporin acetylase. WO 99/38982.
- LECOUTEUX, C., GUICHARD, H. 2003. Potenciador del sabor. Número de publicación 2190223.
- LEE, M.H., LEE, C.H., OH, T.K., SONG, J.K., YOON, JH. 2006. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7406-7409.
- LEVISSON, M., OOST, J.V., KENGEN, S.W. 2007. Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima*. *FEBS. J.* 274: 2832-2842.
- LIU, P., WANG, Y.F., EWIS, E., ABDELAL, A., LU, C.D., HARRISON, R., WEBER, I. 2004a. Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30. *J. Mol. Biol.* 342:551-561.
- LIU, S-Q., HOLLAND, R., CROW, V.L. 2004b. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int. Dairy J.* 14:923-945.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, I., MONTORO-GARCÍA, S., LOZADA-RAMÍREZ, J.D., SÁNCHEZ-FERRER, A., GARCÍA-CARMONA, F. 2007. A colorimetric assay for the determination of acetyl xylan esterase or cephalosporin C acetyl esterase activities using 7-amino cephalosporanic acid, cephalosporin C, or acetylated xylan as substrate. *Anal. Biochem.* 369:210-217.
- MATTHEWS, A., GRBIN, P., JIRANEK, V. 2007. Biochemical characterization of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:329-337.
- MATTHEWS, A., GRIMALDI, A., WALKER, M., BARTOWSKY, E., GRBIN, P., JIRANEK, V. 2004. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5715-5731.
- MITUSHIMA, K., TAKIMOTO, A., YAGI, S., SONOYAMA, T. 1991. Cephalosporin acetylhydrolase gene and protein encoded by said gene. EP 0 454 478.
- MONTORO-GARCÍA S., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, I., NAVARRO-FERNÁNDEZ, J., TAKAMI, H., GARCÍA-CARMONA, F., SÁNCHEZ-FERRER, A. 2009. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *J. Bacteriol.* 191: 3076-3085.
- OLEMPKA-BEER Z., MERKER, R., DITTO, M., DINOVI, M. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. 45: 144-158.
- OSBORN, H. T., AKOH, C.C. 2002. Structured lipids-novel fat with medical, nutraceutical and food applications. *C. Rev. Food. Sci. Food. Safety.* 1:110-120.
- PARK, Y., CHOI, S.Y., LEE, H.B. 2006. A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression.

- Biochim. Biophys. Acta. 1760:820-828.
- PRAJAPATI, J.B., NAIR, B.M. 2003. The history of fermented foods. In: Farnworth, E.R. (Ed.). Fermented functional foods, CRC Press, Boca Raton, New York, London, Washington DC, pp 1-25.
- PRIM, N., BOFIL, C., PASTOR, F.I.J., DÍAZ, P. 2006. Esterase EstA6 from *Pseudomonas* sp.CR-611 is a novel member in the utmost conserved cluster of family VI bacterial lipolytic enzymes. Biochimie. 88:857-867.
- QUINTILIANI, R., FREANCH, M., NIGJTIN-GALE, C.H. 1982. First and second generation cephalosporins. Med. Clin. North. Am. 66:183-197.
- RALF, F., CHRISTEL, S., MATT, S., MARTÍN, K. 2007. Procedimiento para la hidrólisis de ésteres de carotenoides. Número de publicación 2 277 129.
- RAO, L., XUE, Y., ZHOU, C., TAO, S., LI, G., LU, J.R., MA, Y. 2011. A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic. Biochim. Biophys. Acta. 1814:1695-1702.
- REETZ, M.T. 2004. Controlling the enantioselectivity of enzyme by directed evolution: Practical and theoretical ramifications. PNAS. 101:5716-5722.
- RO, HS., HONG, HP., KHO, BH., KIM, S., CHUNG, BH. 2004. Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases. FEMS. Microbiol. Lett. 233: 97-105.
- SANCHEZ-FERRER, A., MARTINEZ-MARTINEZ, I., GARCÍA-PIZARRO, E., GARCÍA-CARMONA, F. 2007. Producción de formas químicas de cefalosporina C acetilasa. ES2272115.
- SAXENA, RK., GUPTA, R., SAXENA, S., GULATI, R. 2001. Role of fungal enzymes in food processing. Appl. Mycol. Biotechnol. 1: 353-386.
- SCHMID, RD., VERGER, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive application. Angew. Chem. 37: 1608-1633.
- SHARMA, R., CHISTI, Y, AND BANERJEE, U. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotech. Adv. 19: 627-662.
- SILVER, R.S., BROWN, P.H., BOYD, M., WOOLFSCHOON-POMBO, A.F. 2007. Producto fuertemente aromatizado para el uso en la fabricación de queso y procedimiento para producirlo. Número de solicitud 2276508.
- SMITH, R.E., FINLEY, J.W., LEVEILLE, G.A. 1994. Overview of SALATRIM, a family of low-calorie fats. J. Agric. Food. Chem. 42: 432-434.
- STOCK, J., GOLOSHCHAPOV, A., SONG, C., WHEELOCK, C., DERBEL, M., MORISSEAU, C., HAMMOCK, B. 2004. Investigation of the role of a second conserved serine in carboxylesterases via site-directed mutagenesis. Arch. Biochem. Biophys. 430:247-255.
- SUMBY, K.M., GRBIN, P.R., JIRANEK, V. 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. Food. Chem. 121:1-16.
- TOPAKAS, E., VAFIADI, C., CHRISTAKOPOULOS, P. 2007. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. Process. Biochem. 42:497-509.
- UNDURRAGA, D., MARKOVITS, A., ERAZO, S. 2001. Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of palm oil midfraction. Process. Biochem. 36: 933-939.
- VERGER, R. 1997. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. Reviews. 15:32-38.
- VILLENEUVE, P. 2007. Lipases in lipophilization reactions. Biotech. Adv. 25: 515-536.
- WALTON, R.B. 1996. Process for producing 7-aminocephalosporanic acid. US 3:239-394.
- WARNERCK, J., BELINDA, H., WISDOM, R., ANTHONY. 1994. Arylalkanoic acid resolution. WO/020633.

- WEI, Y., SWENSON, L., DEREWENDA, U., MINOR, W., ARAI, H., AOKI, J., INOUE, K., SERVIN-GONZALEZ, L., DEREWENDA, Z. S. 1998. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure*. 6:511-519.