

03072
15
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSTGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA LIPASA PRODUCIDA
POR *Pseudomonas aeruginosa*. DETERMINANDO LA
POSIBILIDAD TECNICA DE EMPLEARLA EN DETERGENTES**

T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
ELSA MARIA TAMAYO LEGORRETA

TESIS CON
FOLIA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION.	
Generalidades	3
Enzimas industriales	6
Enzimas usadas en detergentes	8
Características estructurales de las lipasas	9
Factores que influyen en la actividad de las lipasas	11
Especificidad hacia el sustrato	12
Producción de lipasas microbianas	14
Aplicaciones de las lipasas	14
Antecedentes de la actividad lipolítica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
II. OBJETIVOS	18
Contribución y perspectivas del trabajo	19
III. MATERIAL Y METODOS.	
Esquema de trabajo	20
Microorganismos	20
Condiciones de cultivo	20
Obtención de la enzima	20
Ultrafiltración	20
Purificación de la lipasa	23
Ensayo de proteína	23
Ensayo de actividad lipolítica	23
Ensayo de actividad de lipasa <i>in situ</i>	23
Actividad de la lipasa en presencia de detergentes	24
Efecto de la temperatura en la actividad enzimática	24
Efecto del pH en la actividad enzimática	24
Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima	25
Efecto del pH en la estabilidad de la enzima	25

Electroforesis en PAGE-SDS	25
Método de tinción de geles	25
Determinación del peso molecular	25
Determinación del punto isoelectrico (pI) de la lipasa	26
Cinética enzimática	26
Esquema de inmunización	26
Inmunodifusiones (Ouchterlony)	26
Adsorción del anticuerpo antilipasa	29
Inmunoelectrotransferencia	29
Inmunoprecipitación	31
IV. RESULTADOS.	
Purificación y caracterización de la lipasa	33
Caracterización fisicoquímica de la lipasa	38
a) Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica	38
b) Efecto del pH en la actividad enzimática	43
c) Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima	43
d) Efecto del pH en la estabilidad de la enzima	47
Efecto de surfactantes en la actividad lipolítica	47
Determinación de la constante de Michaelis Menten	50
Caracterización de los anticuerpos policlonales	50
V. DISCUSION	60
VI. CONCLUSIONES	67
VII. APENDICE	68
VIII. REFERENCIAS	71

RESUMEN.

Las lipasas son enzimas que pertenecen al género no específico de las carboxil-éster-hidrolasas y catalizan la hidrólisis de grasas para producir ácidos grasos libres y glicerol.

La lipasa que reportamos aquí, es excretada al medio por *Pseudomonas aeruginosa* (IGB-83) (microorganismo patógeno oportunista para el hombre), cuando se cultiva en medio mínimo FAM con aceite de oliva como fuente de carbono.

En este trabajo nos propusimos determinar el efecto en la actividad lipolítica de los componentes presentes en detergentes, así como el efecto del pH y temperatura con el fin de determinar si reúne las características necesarias para ser utilizada en la elaboración de detergentes.

Cuando analizamos el sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-RO) por electroforesis PAGE-SDS encontramos cantidades significativas del lipopolisacárido (LPS), el cual parece estar firmemente unido a la lipasa formando un complejo enzima-LPS, lo que explica el elevado peso molecular aparente de la enzima.

Más tarde, con la intención de fraccionar y caracterizar la lipasa, decidimos pasar el sobrenadante del cultivo por una columna de filtración en gel con Sepharosa 4B-CL, donde la actividad lipolítica se separó en dos picos, uno de ellos tuvo una actividad específica elevada y, por lo tanto, decidimos trabajar con el conjunto de fracciones que conforman este pico que al analizarlo a través de un gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras se observaron dos bandas de proteína con un peso molecular estimado de 65 kDa y 39 kDa respectivamente. Asimismo, este mismo pico bajo las mismas condiciones de electroforesis pero con

β -mercaptoetanol se observaron nuevamente dos bandas de proteína cuyo peso molecular estimado fue de 54 kDa para una y de 30 kDa para la otra con un punto isoeléctrico (pI) de 6.1 y 5.7 respectivamente. El pH óptimo para tributirina (sustrato insoluble) fue de 8.5 y un óptimo de 6.5 con para-nitrofenilpalmitato (p-NPP, sustrato soluble), la temperatura óptima registrada fue de 55°C. Con respecto a las características cinéticas (K_m y $V_{m\acute{a}x}$) determinadas con p-NPP para la enzima purificada, se obtuvo una K_m de 10.3 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de 0.33 U/min⁻¹. Finalmente, se estudio el efecto de los componentes de los detergentes en la actividad lipolítica.

Por otra parte, se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-lipasa, para su posterior uso en el laboratorio en cuanto al reconocimiento y purificación de la lipasa expresada en otro microorganismo que no tuviera la característica de patógeno oportunista como la cepa original, pensando en *Xanthomonas campestris* como el microorganismo a transformar. Tales anticuerpos anti-lipasa se caracterizaron mediante técnicas de inmunodifusión, inmunoelectrotransferencia o "western blot" e inmunoprecipitación de la enzima.

Por último, se determinó que la enzima lipasa reúne las características necesarias que ofrecen una opción atractiva para que dicha enzima pueda ser considerada en la elaboración de detergentes. Siendo estas características:

- a) Activa a pH's alcalinos.
- b) Termorresistente.
- c) Estable a la presencia de proteasas.
- d) Estable a la vida de anaquel del detergente.

INTRODUCCION.

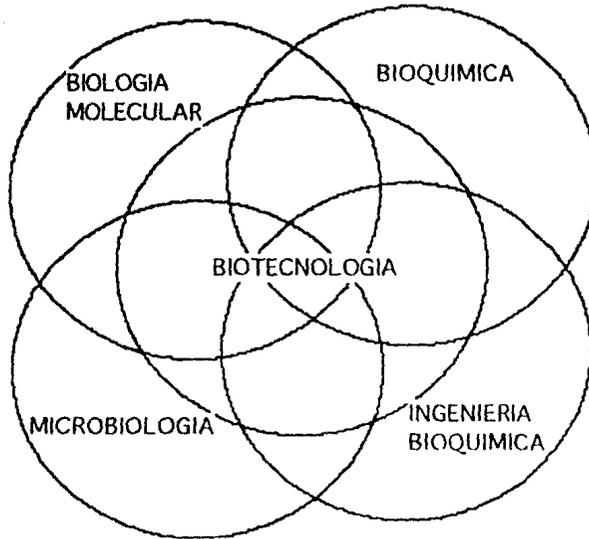
"Plantear cualquier pregunta sobre el desarrollo futuro de una tecnología de punta, a nivel internacional, representa un reto intelectual y metodológico. Cuando este cuestionamiento se da en un país con las características de México, las preguntas aumentan debido a que existen pocos estudios de carácter prospectivo, y en el caso de la biotecnología son sólo unos cuantos (47)".

"Desde hace algunos años se ha venido evaluando en diferentes esferas y con diversas ópticas el potencial de la tecnología biológica, pero sólo recientemente se ha intentado establecer un programa de actividades que de manera integral apoye el desarrollo de productos y procesos biotecnológicos en el país (47)".

El área de la biotecnología ha sido considerada, en años recientes, como una de las opciones más atractivas y de mayor potencial en la solución de los problemas de alimentación, salud, energía y contaminación cuya complejidad y magnitud crecen día con día.

Así, el término biotecnología es ambivalente y se confunde con sinónimos tales como ingeniería bioquímica, tecnología microbiana o tecnología de fermentación; pero el significado más aceptado es que consiste en el procesamiento industrial de materiales por microorganismos y otros agentes biológicos para proveer productos y servicios deseables. Por tratarse de una área multidisciplinaria se relacionan conocimientos propios de la biología, específicamente los de microbiología, bioquímica, biología molecular e ingeniería bioquímica, con procedimientos industriales.

Para algunos autores la biotecnología se inicia con la modificación



genética y, por ende, metabólica de células procariontes y eucariontes, para la obtención de nuevos compuestos. En este caso, la historia de la biotecnología se remonta al inicio de la biología molecular. Para otros, la biotecnología aparece con las diversas metodologías de transformación que han usado las civilizaciones desde el inicio de la historia hasta nuestros días, alcanzándose la transformación genética de algunos microorganismos. De tal manera que, sin importar el enfoque del que se parta para hacer una historia de la biotecnología, no debemos ignorar los interesantes acontecimientos que surgieron a partir de la comprensión de

las fermentaciones, la bioquímica y la biología molecular.

Desde una perspectiva histórica, los químicos orgánicos dedicaban sus esfuerzos al estudio de los catalizadores biológicos o "fermentos" como se les llamaba entonces. J. Berzalius introdujo la idea de catálisis en la fisiología hacia 1930. (9). En 1877, Kuhne acuñó el término enzima cuyo aislamiento durante todo el siglo XIX fue básico para el desarrollo de la bioquímica. En 1897 E. Buchner aisló la zimasa: un grupo de enzimas que llevaban a cabo la fermentación alcohólica; sólo 4 años antes, Ostwald había demostrado que las enzimas son catalizadores y E. Fischer en 1894 demostró su especificidad por el sustrato. En 1913 Michaelis y Menten desarrollaron la teoría cinética enzimática. (9).

Como hemos visto, la biotecnología ha evolucionado y se ha diversificado de tal manera que ahora se utiliza en varias áreas de la producción y la transformación. También ha cambiado el enfoque sobre los alcances de la biología y hay quienes piensan que la biotecnología marcará el auge tecnológico de finales del siglo XX, mientras otros la ven como una herramienta más para transformar y aumentar el rendimiento de los microorganismos y los cultivos celulares eucariontes.

Estos enfoques son algunos de los más sobresalientes que se pueden mencionar; pero, ¿a dónde ha llegado realmente la biotecnología?, ¿cuánto se ha extendido?, ¿qué bioindustrias existen?, ¿qué se tiene proyectado?.

El desarrollo de la biotecnología moderna que se dio en los 60's, impulsó el nacimiento de nuevas bioindustrias y la expansión de otras existentes, para los años 70's (12). Además para mediados de los 80's se habían establecido alrededor de 200 bioindustrias y en el inicio de los 90's hay más de 1100 empresas de biotecnología en Estados Unidos.

La vía principal de comercialización de los procesos y productos biotecnológicos han sido los grandes emporios industriales capaces de financiar los proyectos y la infraestructura necesaria para cada caso (12).

Es indudable que el desarrollo de la biotecnología moderna se da principalmente en el extranjero y por ello, un factor que afectará definitivamente los avances nacionales será la velocidad con que se vayan generando los nuevos productos y procesos biotecnológicos. Por esta razón, actualmente el interés industrial se encuentra en aquellos microorganismos y enzimas que puedan funcionar a temperaturas relativamente elevadas, microorganismos termófilos que producen enzimas termoestables. Sin embargo, estos microorganismos no siempre producen enzimas de este tipo y, a su vez, la fuente de las enzimas termoestables no siempre se encuentra en microorganismos termófilos ya que muchos mesófilos son capaces también de producir enzimas estables a temperaturas hasta de 80°C por ejemplo, las enzimas NOVO-amilasas. (1).

ENZIMAS INDUSTRIALES

Las enzimas tienen un amplio mercado y uso diversificado en diferentes áreas industriales. Destacan por su importancia las aplicaciones en las industrias de alimentos, químico-farmacéutica y química.

Analizando las enzimas por uso industrial (Tabla 1), se encuentra que las enzimas que más se consumen a nivel mundial son las proteasas (59%), y de ellas el 25% corresponden a las proteasas alcalinas usadas en detergentes (19). Por lo tanto, su aplicación a escala industrial es resultado de la posibilidad de producir enzimas en gran volumen, las cuales han sido en gran medida de tipo hidrolasas extracelulares,

TABLA 1

DISTRIBUCION DE ENZIMAS DE INTERES INDUSTRIAL

Grupo	Enzima o área de aplicación	% del Mercado	Total %
Proteasas	Alcalinas (detergentes)	25	
	Alcalinas	6	
	Neutras	12	59
	Acidas	3	
	Renina	10	
	Tripsina	3	
Carbohidrasas	β -amilasa	13	
	α -amilasa	5	
	Celulasa y lactasa	1	28
	Isomerasas	6	
	Pectinasas	3	
Lipasas	Lipasa	3	3
	Area analítica		
Otras	Area farmacéutica	10	10
	Otras		

Tomado de Godfrey, T., 1983 (19).

utilizadas por las células para degradar el sustrato a compuestos asimilables de menor complejidad (4).

ENZIMAS USADAS EN DETERGENTES

El uso de enzimas en detergentes para remover restos de proteínas depositados en ropa se inició en 1913 en Alemania, cuando O. Rihm adicionó por primera vez pancreatina a formulaciones de detergentes (2), pero fue hasta los años 60's cuando con el aislamiento de una proteasa alcalina termoestable de *Bacillus* se inició una rápida y permanente penetración al mercado de los detergentes biológicos. (62).

Las proteasas alcalinas utilizadas en detergentes están bien caracterizadas (Tabla 2) y las propiedades principales son:

- Deben operar a pH's altos (7.0-10.5),
- Estables a temperaturas elevadas (30-70°C),
- Estables en presencia de secuestradores y agentes oxidantes,
- Estables durante la vida de anaquel del detergente.

Los rangos de estas propiedades varían según el uso y la formulación del detergente, pero determinan en gran medida los límites y características de cualquier otra enzima que se desee usar en detergentes.

Por consiguiente, se ha descrito el aislamiento de algunas bacterias que presentan lipasas que pudieran utilizarse en la producción de detergentes, pero aún no han sido producidas a nivel industrial. Algunas de las especies bacterianas productoras de lipasas que pueden ser usadas en la elaboración de detergentes pertenecen al género de las *Pseudomonas*, que incluyen a las bacterias Gram negativas de forma bacilar, aerobios estrictos y móviles, habitantes normales del suelo y agua. (26), (29).

CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS LIPASAS.

Aunque la producción de lipasas (Glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) representa un pequeño porcentaje, ésta ha ido incrementándose gracias al

TABLA 2

CARACTERISTICAS DE LAS PROTEASAS ALCALINAS EN DETERGENTES.

USO	pH	CONC. PROTEASA
Prelavado	8.0-9.55	0.5-1.0%
Detergente líquido	7.0-9.5	0.4-0.8%
Detergente uso pesado	9.5-10.5	0.4-0.8%

Intervalo de temperatura: 30-70 °C.

interés creciente que se ha mostrado en el desarrollo de nuevas aplicaciones, dando como resultado la existencia de lipasas purificadas en forma de polvo (50), así como su inmovilización en soportes hidrofóbicos o hidrofílicos (43) o su microencapsulamiento en polímeros sintéticos (50).

Las lipasas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de grasas para producir ácidos grasos libres y glicerol (Figura 1). La hidrólisis de acil gliceroles se realiza en la interfase establecida entre el sustrato insoluble y una fase acuosa en la que se encuentra disuelta la enzima, siendo éstos sus mejores sustratos, aunque también catalizan la hidrólisis de ésteres solubles en agua, pero a una velocidad muy baja. Por su parte, las esterasas catalizan la hidrólisis de ésteres hidrosolubles preferentemente a ésteres insolubles en agua (3, 38).

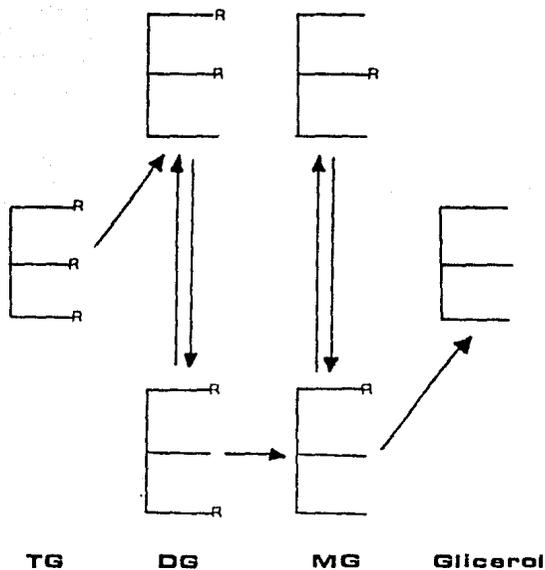


Figura 1. Reacción catalizada por la enzima lipasa. TG (triglicerido); DG (diglicerido); MG (monoglicerido).

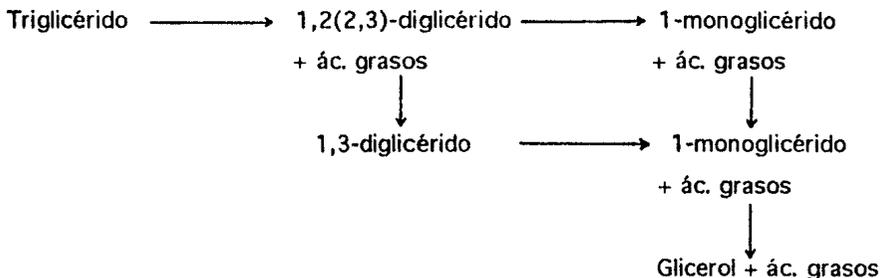
Se ha sugerido que la interacción de las lipasas con su sustrato en la interfase aceite-agua es originada por la elevada proporción de aminoácidos hidrofóbicos presentes en regiones determinadas de la superficie de su molécula, además de que estas secuencias de aminoácidos pueden ser responsables del comportamiento de asociación que muestran algunas lipasas en soluciones acuosas (38).

Generalmente las lipasas fúngicas son moléculas glicoproteicas cuya masa molecular varía entre 20,000 y 60,000 daltones, identificándose la presencia de carbohidratos en una proporción del 2 al 15%. Probablemente estas cadenas laterales de carbohidratos no están asociadas con la actividad enzimática. Semeriva y col. (51) observaron que la lipasa de *Rhizopus arrhizus* puede ser hidrolizada en un glicopéptido de bajo peso molecular sin actividad lipolítica y una fracción proteica libre de azúcares con elevada actividad. Por otro lado, se piensa que la molécula de azúcar facilita el paso de la enzima a través de la pared celular (28).

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE LAS LIPASAS.

Los principales factores que tienen efecto sobre la actividad de las lipasas son el pH y la temperatura de reacción. Generalmente, presentan actividad en un intervalo muy amplio de pH, aunque la actividad que presentan a valores bajos de pH es considerablemente menor en relación a la que presentan en su valor óptimo, variando entre 6 y 9 unidades para la mayoría de las lipasas microbianas. Por otro lado, la mayor actividad de estas enzimas se presenta a una temperatura que varía entre 30 y 50°C. Otro factor que puede influir en la actividad de las lipasas es la presencia de cofactores como pueden ser los iones Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺ o Mn⁺⁺. Nishio y

Lipasas 1,3-específicas:



- **Acción:** La lipasa hidroliza las uniones ésteres en la interfase entre la fase acuosa (enzima soluble) y la fase del sustrato insoluble. Tienen poca actividad sobre ésteres de ácidos grasos solubles en agua.

- **Fuente de la enzima:** Las lipasas están ampliamente distribuidas en todos los organismos; por consiguiente, se han aislado diversos microorganismos que producen la lipasa como *Rhizopus delemar* (25), *Aspergillus niger* (16), *Candida cylindracea* (58), *Pseudomonas fragi* (38), *Alcaligenes sp.* (29) y *Chromobacterium viscosum* (55), cuyas lipasas han sido producidas a nivel industrial.

- **Método de producción:** La lipasa microbiana se obtiene en cultivo sumergido preferentemente.

- **Propiedades comerciales:** Las lipasas microbianas industriales (Tabla 3), se utilizan principalmente en procesos de alimentos y son importantes porque mejoran el sabor y aroma de quesos. Asimismo, se usan para la elaboración de productos farmacéuticos o en productos de cosmetología a nivel comercial, en procesos de curtido y de producción de ácidos alifáticos (50). Estas enzimas no presentan las características requeridas para utilizarse en detergentes.

PRODUCCION DE LIPASAS MICROBIANAS.

En las últimas dos décadas, los estudios que se han realizado en relación a la producción de este tipo de lipasas microbianas, se han enfocado básicamente a la formulación de un medio de cultivo en el cual se logre obtener la mejor producción analizando el efecto de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, así como diferentes tipos de sales o modificando, también las condiciones de pH y temperatura en que se realiza la fermentación. Se ha observado que el intervalo de pH óptimo es de 6.0 a 7.0; la temperatura varía entre 27 y 40 °C, así como el tiempo óptimo de cultivo entre 2 a 6 días para el caso de hongos y un tiempo en horas para los cultivos bacterianos. Sin embargo, estas condiciones pueden cambiar dependiendo tanto del microorganismo empleado como de la formulación del medio de cultivo.

APLICACIONES DE LAS LIPASAS.

Las lipasas tradicionalmente se han obtenido a partir de pancreas animal y son usadas como una ayuda digestiva para el consumo humano en la mezcla cruda con otras hidrolasas (pancreatina) o como un grado purificado. Las lipasas también han sido usadas en alimentos modificando su sabor; siendo el primer efecto de la adición de la lipasa a los alimentos que contienen grasa, la disminución de un sabor rancio y la limitación de la actividad de la lipasa endógena. Sin embargo, ciertos alimentos por ejemplo, tipos de quesos especiales que tienen un sabor característico, es mejorado por lipólisis. Las lipasas también son usadas en la determinación enzimática de triglicéridos de suero, generando glicerol, siendo subsecuentemente determinada por reacciones coloridas.

TABLA 3

LIPASAS MICROBIANAS COMERCIALES

Enzima	Fuente microbiana	pH óptimo	Temp. óptima (°C)
Lipasa	<u>Aspergillus sp.</u>	6.5	37
Lipasa	<u>Mucor sp.</u>	7.0	37
Lipasa	<u>Candida cylindracea</u>	6.5	37
Lipasa	<u>Rhizopus sp.</u>	7.0	40
Lipasa	<u>Aspergillus niger</u>	6.0	47.5
Lipasa	<u>Aspergillus oryzae</u>	6.25	30
Lipasa	<u>Rhizopus delemar</u>	5.6	45

Tomada de Seitz, W.E. 1974 (50).

La producción de alcoholes ópticamente activos y ésteres directamente por esterificación o transesterificación se identificó como una aplicación posible de lipasas en la industria farmacéutica (29).

En la industria alimenticia, las lipasas son ahora usadas en una variedad de procesos, incluyendo la producción de saborizantes e hidrólisis de grasas. Llamada comercialmente LIPOMOD, la lipasa puede usarse para la modificación y procesamiento de un espectro completo de grasa animal, incluyendo cadenas cortas y largas de ácidos grasos.

Por otra parte, las razones y criterios que se usan para el empleo de lipasas en detergentes responde a:

- 1.- El decaimiento del grado de detergencia, a causa de la tendencia a bajar los niveles de fosfatos en la composición de detergentes,

por ser dicho compuesto un fuerte contaminante del medio ambiente;

- 2.- La eliminación de grasas en ropa es un problema que los detergentes comunes no tienen resuelto adecuadamente;
- 3.- La eliminación de grasas en ropa (ej. tintorerías) se hace utilizando solventes tóxicos y de uso restringido, con el consecuente efecto de la contaminación ambiental.

De tal manera, se puede concluir que hay necesidad y mercado para una enzima en detergentes sólidos que pueda eliminar grasas de una manera eficiente y barata, además de que evite o disminuya el uso de productos contaminantes. Actualmente, existe en el mercado comercial la LIPOLASA de NOVO, que es la primera enzima microbiana con aplicación industrial dentro del contexto de detergentes. Se considera además, que es posible aislar una lipasa de cualquier microorganismo para la elaboración de detergentes que reúna las siguientes características:

- a).- Termoestable, con actividad relativamente alta entre 30 y 70°C
- b).- Alcalina, que opere a velocidades altas de reacción en un pH de 7.0 a 10.0
- c).- Actividad que no se disminuya por la presencia de agentes oxidantes y sequestradores.
- d).- Resistente a la proteólisis por subtilisina.

Por lo tanto, la importancia de muchas enzimas extracelulares principalmente las lipasas en el contexto de lavandería ha sido reportada y demostrada por Fujii, T. (1986) (15). Aunque cabe mencionar que las técnicas desarrolladas en ese estudio podrán ser aplicables no sólo a los

procesos de producción de las enzimas extracelulares, sino también a varios otros procesos microbianos obteniéndose una alta producción selectiva de los metabolitos deseados.

ANTECEDENTES DE LA ACTIVIDAD LIPOLITICA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Durante un trabajo previo (57), la enzima lipasa proveniente del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (IGB-83), tiene una actividad específica de 8082.35 U/mg de proteína. Mientras que, para la lipasa comercial (LIPOLASA) altamente purificada y caracterizada reportan de 4-5000 U/mg de proteína (20). Sin embargo, no podemos hacer una comparación entre ambas enzimas dado que las condiciones de caracterización de la enzima comercial no se reportan y por lo tanto, no sabemos si hay diferencias o no en cuanto a los patrones de caracterización empleados para nuestra enzima de trabajo. Además cabe mencionar que la actividad específica que reportamos no es con la enzima pura. Asimismo, se pudo establecer la metodología para determinar la actividad enzimática en un intervalo de temperatura de 50°C a 55°C y a un pH de 8 a 9, demostrándose que dicha enzima es activa a pH's alcalinos y termorresistente.

Así, el haber obtenido una lipasa con las características antes señaladas nos llevó a realizar un estudio más completo de esta enzima para poder determinar su posible uso en detergentes y considerarla como un candidato a ser una de las enzimas de uso industrial a nivel mundial.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Caracterizar bioquímicamente una lipasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* (IGB-83), determinando su posible participación en la elaboración de detergentes.

Objetivos particulares:

- I. Caracterización fisicoquímica de la lipasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* (IGB-83).
 - 1) Separación y purificación de la enzima;
 - 2) Determinación del peso molecular y número de subunidades;
 - 3) Determinación de pH y temperatura óptima así como su pl;
 - 4) Estabilidad de la lipasa en sustratos insoluble y soluble;
 - 5) Evaluación de la cinética de reacción en presencia de surfactantes;
 - 6) Determinación de características cinéticas (K_m y $V_{m\acute{a}x}$).
- II. Obtención de anticuerpos policlonales anti-lipasa.

CONTRIBUCION Y PERSPECTIVAS DEL PRESENTE TRABAJO.

Consideramos que las principales contribuciones de este trabajo a los campos de la tecnología enzimática y a la de bioquímica de proteínas son las siguientes: **I)** la factibilidad técnica de la utilización de la lipasa estudiada en detergentes; **II)** la formación técnica del estudiante en el área de bioquímica de proteínas, purificando y caracterizando la enzima que es obtenida del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las perspectivas de este trabajo consisten en evaluar técnicamente la calidad de la lipasa producida en los detergentes y hacer un análisis de evaluación técnico-económica para determinar la factibilidad económica, los niveles de inversión y la rentabilidad del proceso desarrollado.

MATERIAL Y METODOS.

Esquema de trabajo.- El planteamiento de las estrategias para la realización de este trabajo se agrupan en un diagrama de flujo que se muestra en la Figura 2.

Microorganismo.- Para la elaboración de este trabajo se usó la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO 2003) que lleva el plásmido R'O, el cual codifica para la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* (IGB-83) (Figura 3) mantenida en medio sólido LB (Apéndice) a 4°C.

Condiciones de cultivo.- La bacteria fue cultivada en matraces de 200 ml, con un volumen de trabajo de 150 ml de medio FAM (Apéndice) conteniendo aceite de oliva al 1% como fuente de carbono y arginina al 0.02%. La temperatura de crecimiento fue de 29°C, con una agitación de 200 rpm durante 24 hrs. Para solidificar el medio se utilizó agar Difco al 1.5%.

Obtención de la enzima.- Dado que la lipasa es una enzima extracelular, el medio de cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos recuperando el sobrenadante, el cual se filtró a través de una membrana millipore de 0.22m.

Ultrafiltración.- El sobrenadante del cultivo libre de células (150 ml) fue concentrado (3X) hasta un volumen de 50 ml. a través de una unidad de filtración millipore CX10 con un corte molecular de 10,000 NMWL.

¿CUANTA PROTEINA?
¿PUREZA DE LA ENZIMA?
¿CUAL ES EL P.M. DE LA ENZIMA?
¿EL ANTICUERPO ES ESPECIFICO PARA LA ENZIMA?
¿COMPORTAMIENTO CINETICO EN DETERGENTES?

Pseudomona aeruginosa (PAO-RO)

SOBRENADANTE

DETERMINACION DE PROTEINA

METODO DE BRADIORD

ABSORBANCIA
780 nm

ELECTROFORESIS

DETECCION

TINCION
COOMASSIE/
PLATA

ELECTROTRANSFERENCIA

INMUNODETECCION

COMPARACION CON
PATRONES DE P.M.

ESTIMACION DEL
P.M. DE LA ENZIMA

CROMATROGRAFIA

FILTRACION EN GEL

CINETICA ENZIMATICA

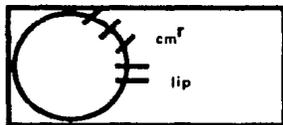
Km y Vmax

ACTIVIDAD EN
PRESENCIA DE
SURFACTANTES

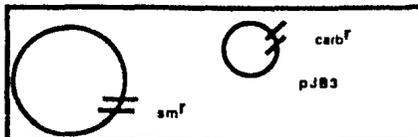
Figura 2.- Diagrama de flujo que muestra el esquema de trabajo realizado.

Pseudomonas aeruginosa

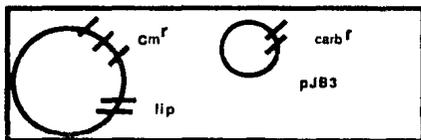
IGB 83 $cm^r sm^r carb^S$
Crece en aceite de oliva



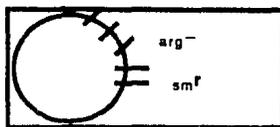
E. coli
HB 101/pJ83 $cm^R sm^r carb^r$



Pseudomonas aeruginosa
IGB83/pJ83 $carb^r cm^r sm^S$

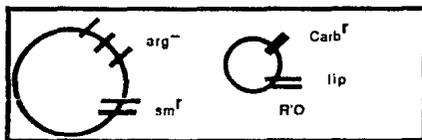


Pseudomonas aeruginosa
PAO 2003 $rec^- sm^r arg^- cm^S$
no crece en aceite de oliva



LB (luria)
cm. carb

FAM + aceite de oliva



Pseudomonas aeruginosa
PAO/R'O

$sm^r cm^S carb^r arg^-$
crece en aceite de oliva + arginina

Figura 3.- Transferencia génica de *P. aeruginosa* (IGB-83) a *P. aeruginosa* (PAO-2003) usando como vector el plásmido pJ83 de *E. coli*. Donde: cm^r —
ramfenicol (cm), estreptomicina (sm), carbencilina ($carb$), recombinante
(rec), arginina (arg).

Purificación de la lipasa.- La muestra se aplicó a una columna (2.5 x 75 cm) de Sepharosa 4B-CL equilibrada con amortiguador de Tris-HCl (pH 8.5) 0.05M y Tritón 0.5%, y se eluyó con el mismo amortiguador. El flujo se ajustó a 20ml/hr con un volumen fraccional de 2ml. La actividad de la lipasa se recuperó en las fracciones 132-146 (Pico I).

Ensayo de proteína.- En el volumen colectado de la columna, la proteína fue determinada midiendo la absorbancia a 280 nm. Por otra parte, la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford y col. (7) utilizando albúmina sérica bovina como patrón leyendo su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Ensayo de actividad lipolítica.- Se emplearon dos sistemas, un ensayo fotométrico con p-NPP como sustrato de acuerdo al método de Winkler y col. (63). Para este caso, una delta de absorbancia (Abs.) por minuto a 405nm de 1 es equivalente a 9.7 nmol de p-nitrofenol liberado del p-nitrofenil palmitato por minuto. El ensayo titulométrico con tributirina como sustrato descrito por Nahas y col. (41), con algunas modificaciones también fue utilizado. Se usó la tributirina al 5% (p/v) como sustrato, preparado en amortiguador Tris-HCl (pH 8.5) 0.05M, haciendo la titulación de los ácidos grasos liberados con una solución 0.05M de NaOH. Definiendo una unidad de enzima como la cantidad en la cual se libera 1 μ mol de ácidos grasos libres por minuto bajo las condiciones de ensayo usadas. Todos los ensayos de reacción para ambos métodos fueron a 50 C y 55 C durante 15 minutos respectivamente.

Ensayo de actividad de lipasa *in situ*.- Se preparó una placa que

contenía una emulsión de sustrato (en este caso treoleina) al 5% (p/v) con rodamina 6G al 0.1% agregándole tritón X-100 para estabilizar la emulsión la cual, se mezcló con agarosa al 1% fundida en amortiguador Tris-HCl (pH 8.5) 0.2 M. Una vez corridas las muestras de interés en un gel de poliacrilamida al 7.5% se hizo lo siguiente: el gel se lavó dos veces de 10 minutos cada uno con una solución de tritón X-100 al 2.5% (p/v) y una vez de 10 minutos con tritón X-100 al 0.5% (p/v) para finalmente enjuagarlo con agua desionizada para retirar el exceso de detergente. Posteriormente, el gel se colocó sobre la placa de agarosa y se incubó a 55°C por 12 horas. La visualización del resultado se hizo mediante la observación de la placa con luz ultravioleta verificando la presencia de un complejo fluorescente si hay actividad lipolítica.

Actividad de la lipasa en presencia de detergentes.- Se determinó la estabilidad de la lipasa, así como la concentración de detergente inhibitoria de la actividad lipolítica usando tributirina como sustrato. Los detergentes usados fueron: tritón x-100, SDS (dodecil sulfato de sodio), SDB (dodecil bencen sulfonato), CHAPS (3[3-cloroamidopropil]-dimetilamonio-1-propanosulfonato), cetil piridinium, tripolifosfatos de sodio y detergente comercial (Ariel). Todos a concentraciones de: 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200mg/ml y 250 mg/ml.

Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.- Para determinar la temperatura óptima de la lipasa en tributirina y p-NPP se midió actividad a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65 °C, a valores de pH 8.5.

Efecto del pH en la actividad enzimática.- Para determinar el pH

óptimo de la lipasa se midió actividad a diferentes valores de pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 en amortiguador 0.05 M, a temperaturas de 50 y 55 C.

Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima.- Se colocaron varias muestras de enzima (100 μ l) en amortiguador de Tris-HCl 0.05 M a un pH determinado, en un baño agitado a la temperatura de estudio, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó actividad.

Efecto del pH en la estabilidad de la enzima.- Se siguió la metodología del inciso anterior, solo que variando el pH del amortiguador. Se ensayaron valores de pH entre 6 y 9.

Electroforesis en SDS-PAGE.- Los geles de poliacrilamida al 7.5% para electroforesis se realizaron de acuerdo al método de Laemmli (34). Algunas muestras fueron tratadas con β -mercaptoetanol en presencia de SDS. Los patrones de proteína de peso conocido fueron: conalbúmina 80 kDa., albúmina sérica bovina (BSA) 67 kDa., ovoalbúmina 43 kDa., anhidrasa carbónica 30 kDa., lisozima 15 kDa.

Método de Tinción de geles.- El gel de isoelectroenfoco fue tinto con plata (40), mientras que los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (a una concentración de 0.125%) que se solubilizó en una solución de metanol 50% - ácido acético 10% con la cual también se destiñeron los geles (24).

Determinación del peso molecular.- El peso molecular fue

determinado por electroforesis PAGE-SDS y por filtración en gel en una columna de Sepharosa 4B-CL.

Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la lipasa.- Se tomó 1 μ l de la enzima purificada y se colocó en un gel de poliacrilamida al 7.5% para isoelectroenfoque con un gradiente de pH de 3 a 9. La proteína se sometió a electroforesis en un Phast-System (Pharmacia Lab. Separation. Division S-75182 Uppsala, Suecia) con un voltaje de 500 V durante 30 minutos. Visualizamos la proteína por tinción con plata.

Cinética enzimática.- Se determinaron los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_m mediante la modificación algebraica (Lineweaver Burk) (49) de la ecuación de Michaelis-Menten usando para ello diferentes concentraciones de sustrato (en este caso p-NPP) y una concentración constante de enzima lipasa. La aparición de producto se midió por absorbancia a 405 nm, a 50 C durante 20 minutos.

Esquema de inmunización.- 6 ratones hembra de la cepa singénica Balb/c menores de 8 semanas de edad se inmunizaron con la enzima pura bajo el esquema mostrado en la Tabla 4. Asimismo, se inmunizó un conejo hembra de la línea Nueva Zelanda con el mismo antígeno (Ag) siguiendo el esquema mostrado en la Tabla 5.

Inmunodifusiones.- Los sueros de conejo (1:1000) y ratón (1:100) fueron probados usando como antígeno el sobrenadante de cultivo purificado de la cepa PAO-RO para descartar reactividades inespecíficas y cruzadas. Se utilizaron placas de agarosa al 1% con amortiguador de fosfatos de sodio

Tabla 4. Esquema de inmunización para ratones Balb/c.

INMUNIZACION	DIA	RATON	CONDICIONES
1	0	1,2,3	2 μ g de Ag ¹ + 500 μ l de ACF ² , vía IP ³ a cada ratón.
		4,5,6	2 μ g de Ag+ 500 μ l de ACF, vía SC ⁴ a cada ratón.
2	8	1,2,3	2 μ g de Ag+ 500 μ l de AIF ⁵ , vía IP a cada ratón
		4,5,6	2 μ g de Ag+ 500 μ l de AIF vía SC a cada ratón.
3	16	1,2,3	2 μ g de Ag+ 500 μ l de AIF vía SD ⁶ , en el dorso de cada ratón.
		4,5,6	2 μ g de Ag+ 500 μ l de AIF vía IP a cada ratón.
4	24	1,2,3	2 μ g de Ag + 500 μ l de AIF vía IP y SD (en el dorso) a cada ratón.
		4,5,6	2 μ g de Ag + 500 μ l de AIF vía SC a cada ratón.
	40	1,2,3 4,5,6	SANGRADO.
5	56	1,2,3	Implantación de células de mieloma células (X63Ag8,5.3) vía IP.
	80	1,2,3 4,5,6	SANGRADO

Modificado de Harlow, Ed. (24) y Tung, et.al. (59).

1.- Antígeno.

2.- Adyuvante Completo de Freud.

3.- Intraperitoneal.

4.- Subcutáneo.

5.- Adyuvante Incompleto de Freud.

6.- Subdérmica.

Tabla 5.- Esquema de inmunización para Conejo Nueva Zelanda.

INMUNIZACION	DIA	CONEJO	CONDICIONES
1	0	1	Presensibilización: 1ml de ACF ¹ + 300 µl agua desionizada en los ganglios poplíteos y axilares.
2	8	1	Presensibilización: 1ml de ACF + 300 µl agua desionizada en los ganglios poplíteos y axilares.
3	16	1	Presensibilización: 1ml de ACF + 300 µl agua desionizada en los ganglios poplíteos y axilares.
4	24	1	10 µg de Ag ² + 410 µl ACF en los ganglios poplíteos y axilares.
5	32	1	10 µg de Ag + 410 µl AIF ³ en los ganglios poplíteos y axilares.
6	40	1	10 µg de Ag + 410 µl AIF en los ganglios poplíteos y axilares.
7	48	1	10 µg de Ag + 410 µl AIF en los ganglios poplíteos y axilares.
			SANGRADO.
8	64	1	10 µg de Ag + 410 µl AIF en los ganglios poplíteos y axilares.
	72	1	SANGRADO.

Com. pers. Dr. Estofan Miranda M. y M. en C. René Hernández V.

1.- Adyuvante Completo de Freud.

2.- Antígeno.

3.- Adyuvante Incompleto de Freud.

(PBS) (Apéndice) pH 7.2 con la formación de una roseta para las diferentes diluciones de trabajo. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en una cama húmeda.

Adsorción del anticuerpo anti-lipasa.- Este punto se llevó a cabo con el propósito de adsorber el anticuerpo anti-lipasa contra el lipopolisacarido que presenta *Pseudomonas aeruginosa* para disminuir la reacción cruzada que presenta este carbohidrato con el anticuerpo durante la inmunoelectrotransferencia. Para tal propósito el paquete celular obtenido de 20 ml de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-2003) cuya cepa es lipasa (-), se lava con amortiguador PBS pH 7.2 para finalmente resuspenderlo en glutaraldehído al 0.2% (v/v) en el mismo amortiguador e incubando 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se lava nuevamente el paquete celular con PBS y se resuspende en 1 ml de anticuerpo conejo anti-lipasa diluido 1:200 en PBS e incubando 8 horas a 4°C ó 2 horas a 37°C en agitación. Finalmente se recupera el sobrenadante y se guarda en congelación hasta su uso.

Inmunoelectrotransferencia.- La Figura 4, esquematiza de forma global el procedimiento empleado. Una vez hecha la transferencia de proteína sobre una membrana de nitrocelulosa por duplicado, una de las membranas se tiñe con amido black al 1% preparado en una solución de metanol 50% - ácido acético 12% por 10 minutos y se destiñe en metanol 90% - ácido acético 3% (59). La otra membrana se bloquea por 1 hora con leche descremada Sveltes al 5% en PBS (27); en seguida, se lavó con PBS por unos segundos y se incubó con el anticuerpo (Ac) conejo anti-lipasa preabsorbido diluido 1:100 en PBS por 4 horas en agitación a temperatura

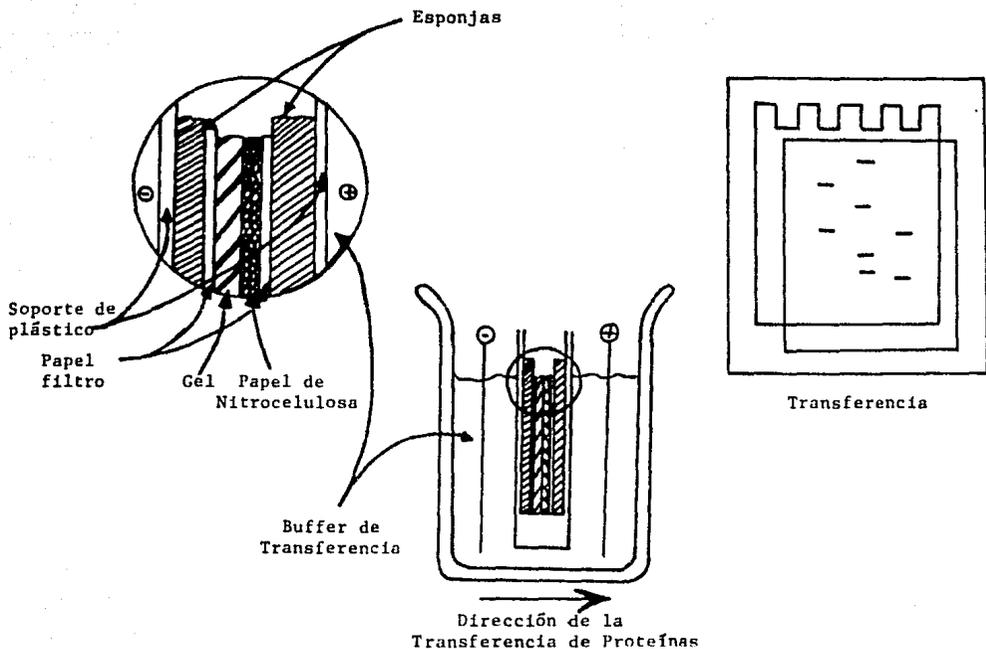


Figura 4. Western blotting. El gel de poliacrilamida que contiene la proteína es puesto en una hoja de papel filtro. El lado descubierto del gel es tapado con una hoja de nitrocelulosa precortada al tamaño del gel. La nitrocelulosa a su vez, es cubierta con otra hoja de papel filtro. El papel filtro que contiene el gel y la nitrocelulosa forma un sandwich con las esponjas. Este sandwich es colocado en un soporte de plástico y posteriormente colocado en una cámara con buffer de transferencia. El voltaje aplicado fue de 14 V. toda la noche a 4°C.

ambiente. Después del tiempo de incubación, se lavó el filtro 3 veces de 10 minutos cada uno con Tween 0.05% en PBS y se incubó con un segundo anticuerpo chivo anti-conejo diluido 1:10,000 en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con Tween 0.05% en PBS y se reveló de la siguiente manera:

1.- Incubar las membranas (por separado en caso de ser tiras de un gel preparativo) en agitación por 15 minutos con:

a) Solución de preincubación durante 15 minutos:

i) Solución 2 /DAB (Apéndice).

ii) Co-Ni 1% (Apéndice).

b) Solución reveladora:

i) H₂O₂ 1% (Apéndice).

c) Una vez alcanzada la intensidad deseada en el filtro, lavar con amortiguador de fosfato de sodio a una concentración de 0.05M 4 veces de 5 minutos cada lavado.

d) Lavado de filtro con agua destilada 2 veces de 5 minutos cada lavado.

e) Secado de filtro sobre toallas Kleenex.

Inmunoprecipitación.- 500 μ l del sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-RO), se incubó con 500 μ l de suero de conejo anti-lipasa (preabsorbido) por 2 horas a 37°C en agitación suave. El complejo Ag-Ac, se pasó a través de una columna de proteína A-sefarosa 4B con 1 ml de resina. El cargado de la columna se realizó aproximadamente a un flujo de 10 ml/h y se colectaron fracciones de 1 ml. a una velocidad aproximada de 35-40 ml/h. Se lavó la columna con 10 volúmenes de amortiguador Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM. Un segundo lavado

se realizó con 10 volúmenes de amortiguador Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM.

Los anticuerpos se eluyeron con 6 volúmenes de Glicina-HCl (pH 3.0) 100 mM colectando fracciones de 1 ml en tubos anchos, los cuales, contenían 200 μ l de amortiguador Tris-HCl (pH 8.0) 1 M.

Las fracciones obtenidas se leyeron a una longitud de onda de 280 nm y se les midió actividad de lipasa con p-NPP como sustrato. El análisis de las fracciones se realizó por electroforesis PAGE-SDS.

RESULTADOS.

1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA LIPASA.

El análisis de electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5%, revela que el sobrenadante del cultivo está compuesto de una mezcla compleja de macromoléculas en un intervalo de peso molecular entre 250 kDa. y 40 kDa. (Figura 5, carril a). Una vez corrido el gel de poliacrilamida, se sometió a un análisis de actividad *in situ* (carril b), donde se observan 3 bandas de actividad lipolítica cuyos pesos moleculares aproximados son: una banda de 250 kDa, otra de 65 kDa y una más de 39 kDa.

El sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* se paso por una columna de sepharosa 4B-CL (2.5 x 75cm) preequilibrada con amortiguador Tris-HCl (pH 8.5) 0.05 M, eluyendo a una velocidad de flujo de 20 ml/h y fraccionando cada 2 ml. De lo anterior, se obtuvo un cromatograma como el que se muestra en la Figura 6, y el procedimiento de purificación se resume en la Tabla 6, donde se puede apreciar que la enzima fue purificada alrededor de 7 veces, basado en la actividad específica del pico I, con una recuperación de actividad lipolítica del 17% aproximadamente y una constante catalítica (Kcat) de $6.98 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ y una de $3.604 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ para tributirina y p-NPP respectivamente. Cabe mencionar, que la actividad específica que se recuperó en el pico I es 3 veces más que la que se recuperó en el pico II por lo cual se decidió seguir trabajando sólo con el pico I.

Las fracciones que contienen la lipasa (132-146, que conforman el Pico I) se colectaron y su homogeneidad se checó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras como se muestra en la Figura 7, observando 2 bandas de proteína con un peso molecular de 65

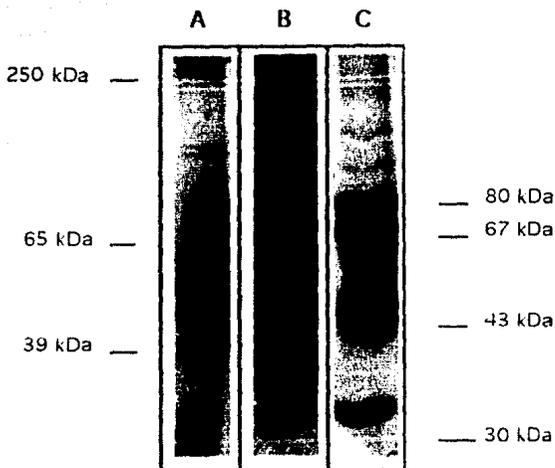


Figura 5.- Patrón electroforético en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras. Carriles: A) Sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-RO); B) Actividad *in situ* del patrón electroforético del carril A sobre un gel de agarosa-treolej na-rodamina 6G; C) Marcadores de peso molecular: conalbúmina (80 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa) y lisozima (15 kDa). Los carriles A y C se tiñeron con plata.

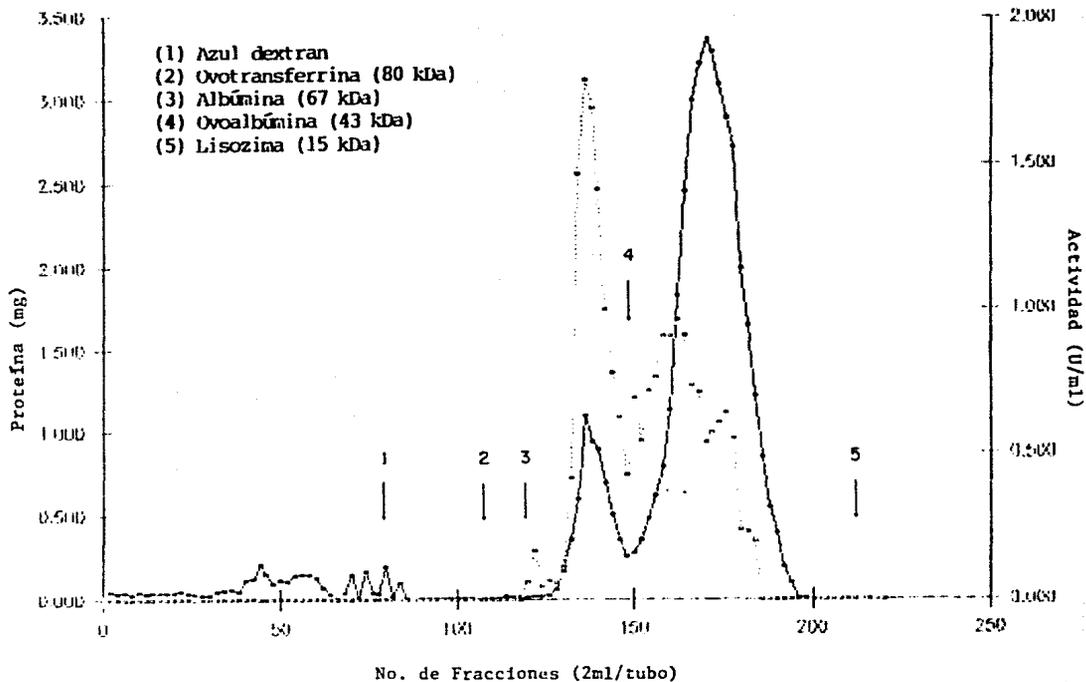


Figura 6. Cromatografía de filtración en gel del sobrenadante del cultivo de *Ps. aeruginosa*. Una columna (2.5 x 75 cm) con sepharosa 4B-CL fue previamente-equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.5. La elución se llevó a cabo con el mismo buffer a una velocidad de flujo constante de 20 ml/hr fraccionando -- cada 2 ml. Proteína (o—o); Actividad enzimática (o---o).

Tabla 6.- Purificación de la lipasa de *P. aeruginosa* PAO-R0.

	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Volumétrica (U/ml)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad Total (U)	Recuperación (%)	Veces de Purificación
Sn*	150	0.180	27.0	1.75	9.72	262.50	100.00	1.000
Ultrafiltración**	50	0.520	25.5	4.98	9.57	249.00	94.85	0.984
Pico I ***	27	0.024	0.65	1.60	66.67	44.80	17.06	6.860
Pico II ****	64	0.048	3.07	1.24	25.83	79.36	30.23	2.660

* Sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* PAO-R0.

** Se aplicó a la columna 25 ml (13.0 mg de proteína total, 124.5 U de actividad total).

*** Comprende las fracciones 132-146.

**** Comprende las fracciones 154-186.

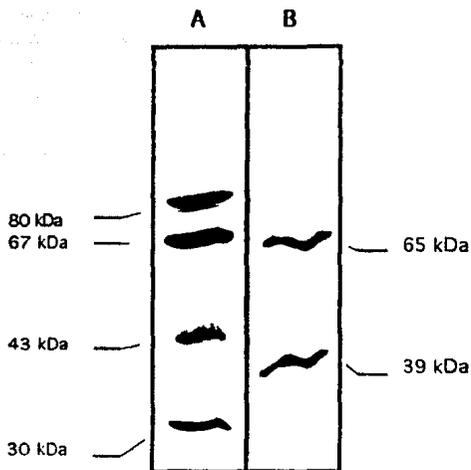


Figura 7.- Patrón electroforético en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras. Carriles: A) Marcadores de peso molecular: conalbúmina (80 kDa); albúmina (67 kDa); ovoalbúmina (43 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa) y Lisozima (15 kDa). B) Pico I obtenido de la cromatografía de filtración en gel. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

kDa y 39 kDa. esto nos sugiere que puede tratarse de dos lipasas distintas o bien que la enzima tenga una conformación de dímero. Sin embargo, al hacer un análisis de actividad lipolítica de cada una de las bandas de proteína en presencia de tributirina al 5% (p/v) y a una temperatura de 55°C las dos proteínas muestran actividad (Figura 8), mostrando un 35% más de actividad lipolítica la proteína de 65 kDa con respecto a la proteína de 39 kDa. Así mismo, se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones reductoras del pico I, esto es, tratándolo a ebullición con β -mercaptoetanol (Figura 9), en donde se observan también dos banda de proteína, una cuyo peso corresponde a 54 kDa y la otra con un peso aproximado de 30 kDa. En esta condición, no se determino actividad lipolítica por las condiciones de desnaturalización usadas.

La determinación del punto isoelectrico (pI) de la lipasa se hizo a través de un gel de isoelectroenfoque con poliacrilamida al 7.5% y un gradiente de pH de 3 a 9. Los resultados del mismo se muestran en la Figura 10; donde se determinó un pI de 6.1 para la proteína de 54 kDa y un pI de 5.7 para la proteína de 30 kDa, siendo este último valor similar al que reporta Stuer y col (1986) (54) para una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA LIPASA.

Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica.

En la Figura 11 se presentan los resultados correspondientes al comportamiento de la enzima con respecto a la temperatura . Se observa que la actividad catalítica con tributirina se incrementa conforme se aumenta la temperatura de reacción, hasta llegar a un óptimo que en este

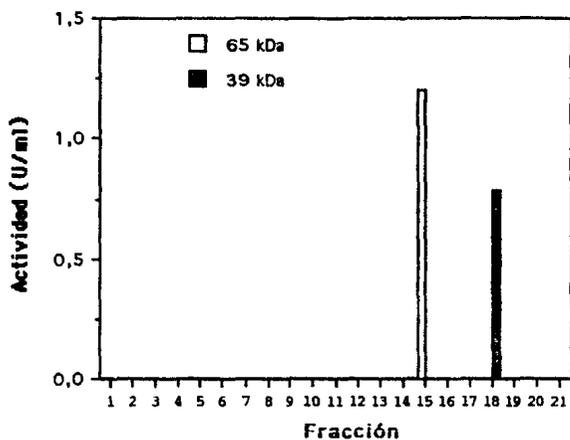


Figura 8.- Actividad de lipasa recuperada al separar el pico I por electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% en SDS y eluir las proteínas que lo conforman después de fraccionar el gel.

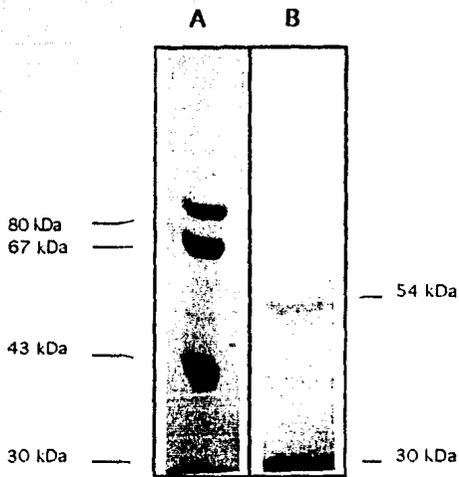


Figura 9.- Patrón electroforético en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones reductoras. Carriles: A) Marcadores de peso molecular: conalbúmina (80 kDa); albúmina (67 kDa); ovoalbúmina (43 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa) y Lisozima (15 kDa). B) Pico I obtenido de la cromatografía de filtración en gel. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

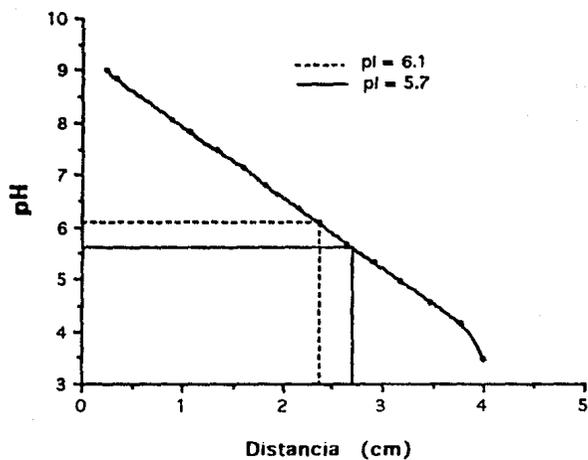


Figura 10.- Estimación del punto isoeléctrico (pI) de la lipasa de *P. aeruginosa* por electroenfoque en un gel de poliacrilamida al 7.5% con un gradiente de pH de 3 a 9.

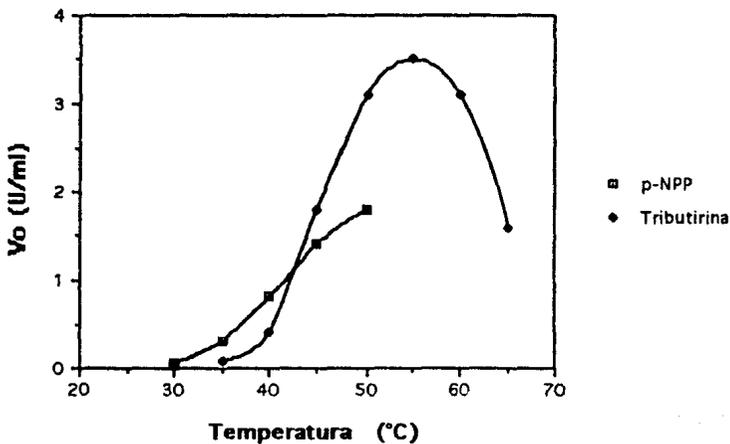


Figura 11.- Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica. Se determinó actividad a los diferentes valores de temperatura en amortiguador de Tris-HCl pH 8.5.

caso se encuentra entre 50 y 60°C a pH de 8.5. Al sobrepasar esta temperatura se muestra una acelerada pérdida de actividad enzimática. Un comportamiento similar se aprecia con p-NPP hasta una temperatura de 50°C.

A partir de los datos anteriores se obtuvo una energía de activación de 40,000 cal/mol para la enzima con tributirina, valor muy semejante al obtenido con p-NPP (30,138 cal/mol), lo cual es comparable con los datos que se reportan para sistemas de emulsión con aceite de oliva de 5300 a 24,000 cal/mol para hongos y de 40,000 a 160,000 cal/mol para enzimas con intervalos de temperatura semejantes. (22,48). Los resultados se muestran en la Figura 12.

Efecto del pH en la actividad enzimática.

El perfil de pH se presenta en la Figura 13 a 50 y 55°C en presencia de p-NPP y tributirina respectivamente, observándose que la lipasa muestra 2 pH's óptimos. Con p-NPP tiene su máxima actividad en un intervalo de pH de 6 a 7 con el óptimo a pH 6.5 y con tributirina muestra su máxima actividad entre un pH de 8 a 9, siendo el óptimo a pH de 8.5.

Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima.

En la Figura 14 se muestran los resultados de estabilidad de la enzima a una temperatura de 50 y 55°C, pH 8.5. Donde se aprecia que con tributirina a 55°C se presenta una estabilidad mayor, mientras que a 50°C con p-NPP la enzima sufre una desactivación acelerada sobre todo después de 60 minutos de incubar la enzima a la temperatura indicada. Lo anterior nos sugiere que la lipasa es bastante activa y estable a altas temperaturas de reacción en presencia de sustratos insolubles.

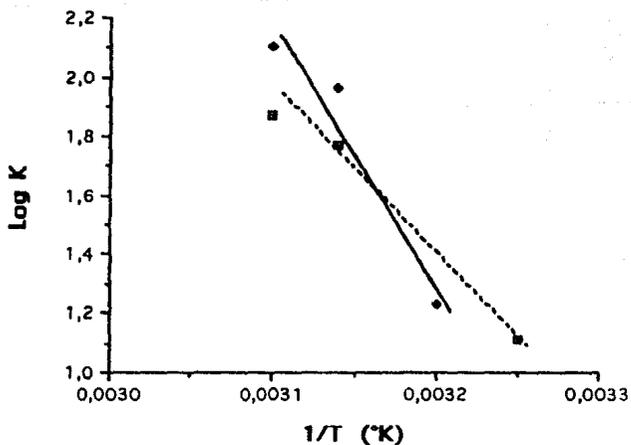


Figura 12.- Energía de activación (E_a) para la hidrólisis de p-NPP (□) y tributirina (◆). La determinación de E_a entre 35 y 45°C con p-NPP es de 30,138 cal/mol y para tributirina entre 40 y 50 °C es igual a 39,989 cal/mol.

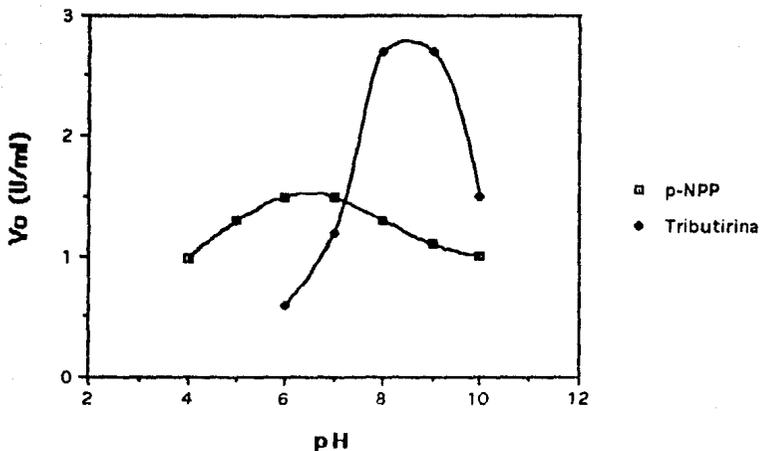


Figura 13.- Efecto del pH en la actividad lipolítica a 50°C (□) y 55°C (♦). Se determinó actividad a los diferentes valores de pH en amortiguador de fosfatos (pH 4, 5, 6, 7) y Tris-HCl (pH 8, 9, 10).

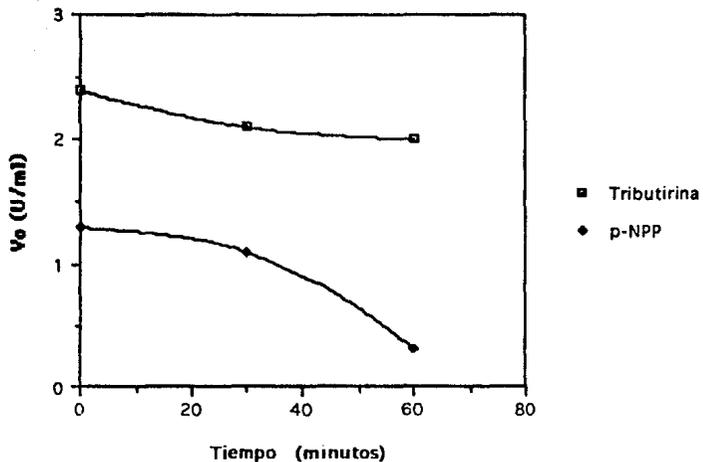


Figura 14. - Efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima. La enzima se incubó en amortiguador de Tris-HCl (pH 8.5) 0.05 M, en baño agitado y se determino actividad a, 50 C (♦) y 55°C (◻).

Efecto del pH en la estabilidad de la enzima.

De los resultados discutidos en el punto anterior se observa que la estabilidad de la enzima depende en gran medida del pH y sustrato usado. Esta dependencia es de fundamental importancia por la forma en que se desarrolla la reacción, ya que es necesario que la enzima mantenga una estabilidad a las condiciones que se requieren para su posible uso en detergentes.

3. EFECTO DE SURFACTANTES EN LA ACTIVIDAD LIPOLITICA.

En presencia del SDS, no se encontró un efecto significativo en la reducción de actividad, ya que la actividad enzimática registrada a las diferentes concentraciones y tiempos de incubación disminuye muy poco con respecto al control. Se puede apreciar que hasta una concentración de 150 mg/ml se logra recuperar un 70% de la actividad después de 30 minutos de incubación. Sin embargo después de 60 minutos la actividad lipolítica se inhibe hasta un 50% . (Figura 15 a).

Con tritón X100, sucede un efecto parecido al obtenido con SDS, sólo que aquí se aprecia una disminución más gradual de la actividad (comparada con el control) conforme se incrementa la concentración del surfactante (Figura 15 b).

Con lo que respecta al cetil piridinium, encontramos que la capacidad de hidrólisis de la lipasa sobre el sustrato aumentó considerablemente a una concentración de 50 mg/ml y fue disminuyendo a mayor concentración de surfactante (Figura 15 c), aunque la actividad lipolítica siguió siendo mayor que la obtenida para el control hasta la concentración de 200 mg/ml y ligeramente menor a la concentración de 250 mg/ml; 30 minutos después de incubar la enzima, la actividad con

respecto al control se mantiene prácticamente constante hasta una concentración de 150 mg/ml para después ir decreciendo conforme aumenta la concentración del surfactante. A los 60 minutos , la enzima en gran parte se desnaturaliza viendose reflejado en la poca actividad recuperada.

Tal como sucede con el surfactante anterior se puede apreciar con el 3-(3cloroamidopropil) dimetilamónio-1-propanosulfonato (CHAPS) (Figura 15 d), sólo que en este caso el incremento en la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre el sustrato es un poco menor, aunque aquí, la actividad se mantiene estable hasta la máxima concentración empleada aún después de los 30 minutos ; no así a los 60 minutos donde la enzima también refleja una desnaturalización.

En presencia de los tripolifosfatos de sodio podemos decir que quizás este compuesto actúa sobre la enzima desnaturalizandola por lo que la actividad se ve disminuida en un 50% con respecto a la inicial y al parecer esta inhibición parcial de la actividad no aumenta con el tiempo de incubación (Figura 15 e).

Finalmente, a una concentración de 50 mg/ml del detergente comercial (Ariel) (Figura 15 f), podemos observar que la actividad lipolítica aumenta considerablemente para, posteriormente, ir disminuyendo conforme se incrementa la concentración recuperando una actividad similar a la del control a la máxima concentración de detergente usada. También se observa que después de 30 y 60 minutos de incubar la enzima en presencia del detergente, la actividad de ésta es bastante estable.

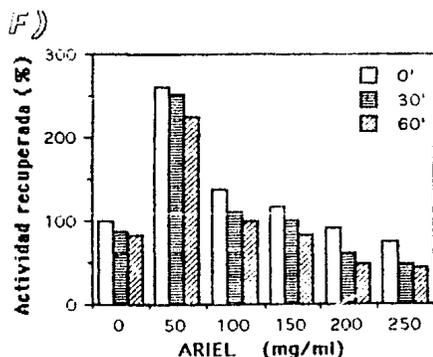
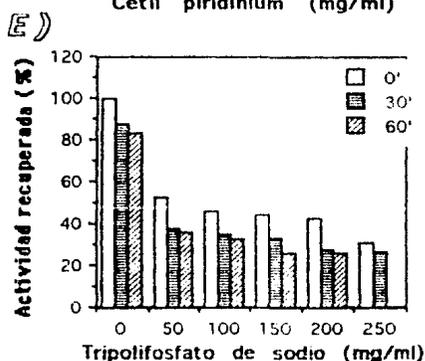
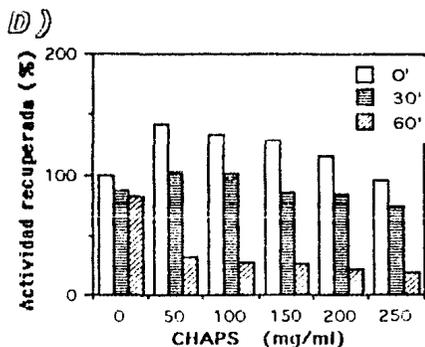
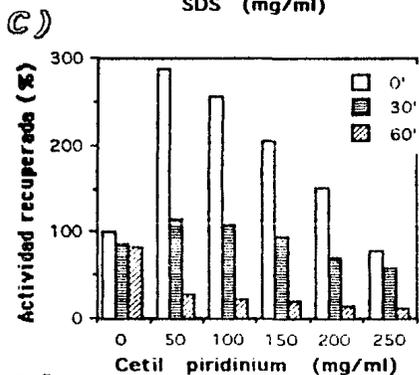
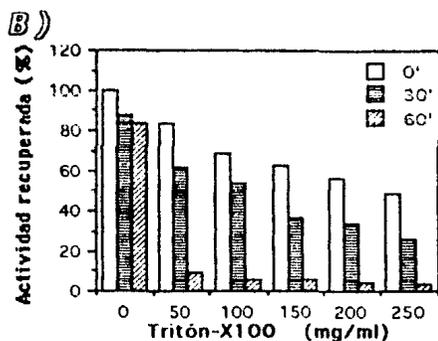
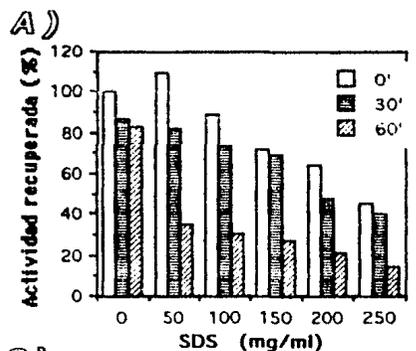


Figura 15.- Gráficos que muestran el efecto de los diferentes componentes de los detergentes en la actividad lipolítica.

4. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS.

Durante la caracterización cinética uno de los criterios más importantes fue el de evitar problemas con el tamaño de partícula que se obtuviera como resultado de la emulsión de tributirina. Por esta razón la caracterización se realizó con p-NPP.

Los resultados del estudio cinético de la lipasa con p-NPP se presentan en la Figura 16, en la que se observa que a bajas concentraciones de sustrato hay una variación lineal con la velocidad inicial de reacción, lo que implica una reacción de primer orden. Sin embargo, a medida que la concentración aumenta, la velocidad inicial también crece hasta alcanzar un valor constante para cualquier valor de concentración de sustrato. En estas condiciones la reacción es de orden cero.

En la Figura 17, se muestra la representación de Lineweaver-Burk, obteniéndose una K_m de 10.3 mM y una $V_{m\acute{a}x.}$ de 0.33 U/min⁻¹. Los valores reportados para la literatura son muy variados; sin embargo, los valores aquí obtenidos se encuentran dentro de los ordenes de magnitud reportados en la literatura. Por ejemplo, se reporta una K_m de 7.8 mM y una $V_{m\acute{a}x.}$ de 0.22 U/min⁻¹ para la hidrólisis de trilaurina para una lipasa de *Candida cylindracea* (11).

5. CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES.

Como una herramienta más para caracterizar la lipasa hasta ahora descrita se produjeron anticuerpos policlonales, uno ratón antilipasa y otro conejo antilipasa. A los cuales se les determinó su título de actividad por inmunodifusión (Ouchterlony) registrándose un título de 1:10 para el anticuerpo de ratón antilipasa y uno de 1:160 para el anticuerpo de conejo

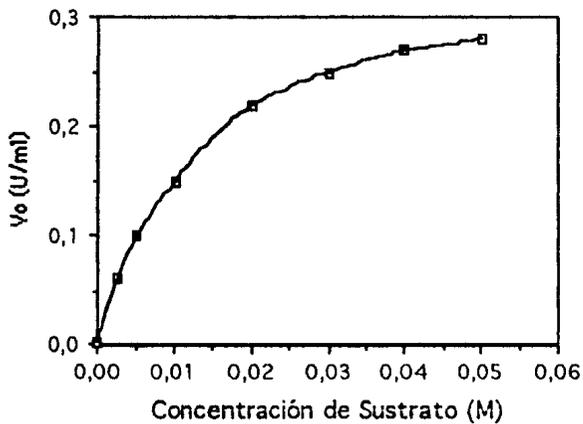


Figura 16. Representación gráfica de la cinética de la lipasa cuyo comportamiento es de Michaelis-Menten.

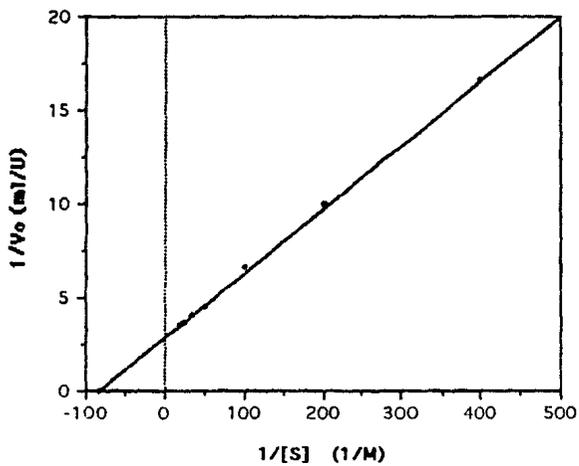


Figura 17.- Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

antilipasa (Figura 18, a y b). Para las demás pruebas inmunológicas se trabajó con el anticuerpo conejo antilipasa.

En la Figura 19, se muestra la inmunoelectrotransferencia que se hizo para el reconocimiento de la lipasa a través del anticuerpo. En la parte teñida con amido black (carriles c y d), se observan 3 bandas de proteína presentes en el sobrenadante de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO RO) con un peso molecular de 54, 39 y 30 kDa respectivamente y 2 bandas de proteína de un peso de 54 y 39 kDa que conforman el pico I eluido de la columna de filtración en gel. De lo anterior, el anticuerpo conejo antilipasa muestra una reacción cruzada con el LPS presente en el sobrenadante de cultivo aunque se observa el reconocimiento parcial de la banda de proteína de 54 kDa (carril b). Tal reconocimiento de la banda se observa mejor cuando se preadsorbe el anticuerpo contra el LPS a partir de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO 2003 que es una cepa lipasa (-) (carril a), aunque en el perfil de reconocimiento observamos el prendimiento de una banda más de alto peso molecular que quizás podría ser del mismo LPS. Cabe mencionar, que la banda de 39 kDa que se observa en el pico I eluido de la cromatografía de filtración en gel no parece ser reconocida por el anticuerpo.

Los resultados de la inmunoprecipitación se muestran en la Figura 20, donde el perfil de elución de la columna por afinidad de sefarosa 4B-proteína A nos indica la salida de un primer pico que corresponde a la proteína sérica que no se pegó a la columna y la aparición de un segundo pico al lavar con Tris-glicina pH 3.0 para eluir el complejo Ag-Ac neutralizando la reacción con amortiguador Tris-HCl (pH 8.0) 1 M. Siendo este último pico el que muestra una recuperación de la actividad lipolítica del 50% aproximadamente, un 20% más se recupera en el primer pico que

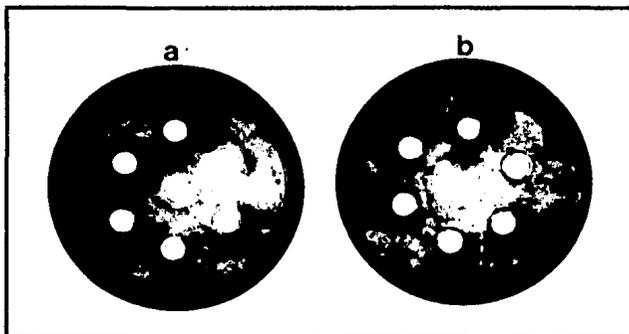


Figura 18.- Titulo de antisueros antilipasa por inmunodifusion (Ouchterlony). Ensayos: a) Antisero de ratón antilipasa con un titulo de 1:10; b) Antisero de conejo antilipasa con un titulo de 1:160.

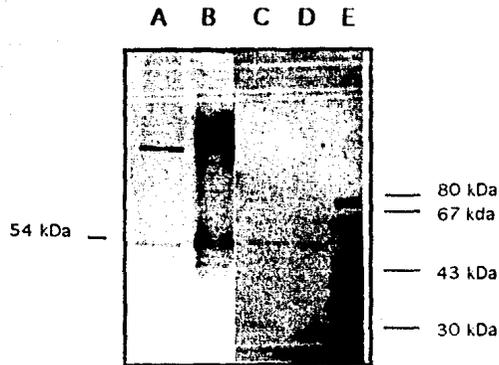


Figura 19.- Inmunoelctrotransferencia (Western blot) en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones reductoras. Carriles: A y D) Pico I eluido de la columna de filtración en gel; B y C) Sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-RO); E) Marcadores de peso molecular: conalbúmina (80 kDa), albúmina -- (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), lisozima (15 kDa). Los carriles A y B fueron incubados con el anticuerpo de conejo antilipasa previamente preadsorbido y revelados con un anticuerpo chivo anticonejo acoplado a peroxidasa; los carriles C, D y E se tiñeron con amido black.

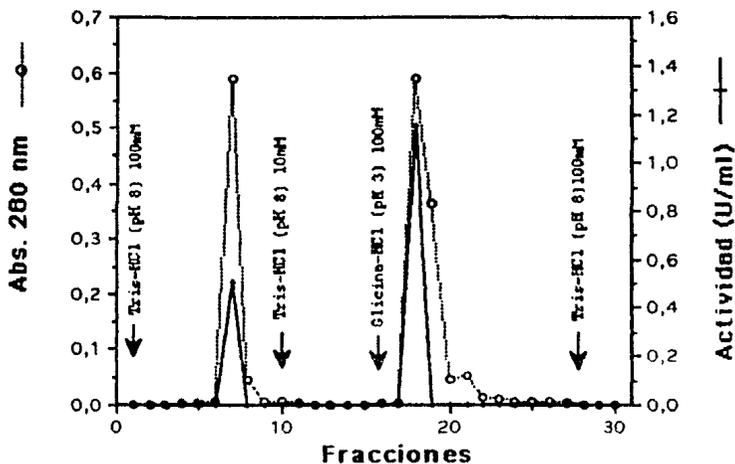


Figura 20.- Gráfica que muestra el perfil de elución obtenido de la cromatografía de afinidad para la inmunoprecipitación del complejo antígeno-anticuerpo y su respectiva actividad lipolítica.

corresponde a una pequeña porción del complejo Ag-Ac que no fue retenido posiblemente por saturación de la proteína A y el 30% restante suponemos que se pierde en la columna. La Tabla 7 muestra los datos de recuperación.

Al hacer el análisis electrofóretico en un gel de poliacrilamida al 7.5% de los picos obtenidos de la cromatografía por afinidad se observa una banda de proteína de 67 kDa en el primer pico que evidentemente es una proteína sérica del suero de conejo (Figura 21, carril d). Asimismo dentro de la misma figura anterior pero en los carriles e y f, se observa la presencia de dos bandas de proteína, una de 65 kDa y otra de 39 kDa respectivamente que se recuperarán del pico eluído con Tris-glicina pH 3.0.

Tabla 7.- Inmunoprecipitación de la lipasa de *P. aeruginosa* PAO-RO.

	Volúmen (ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Recuperación (%)
Sn*	0.5	0.260	2.500	100.00
Pico I**	5.0	0.652	0.508	20.32
Pico II***	5.0	1.063	1.152	46.08

* Sobrenadante de cultivo de *P. aeruginosa* PAO-RO concentrado (3X).

** Pico eluido con amortiguador Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM.

*** Pico eluido con glicina-HCl (pH 3.0) 100 mM.

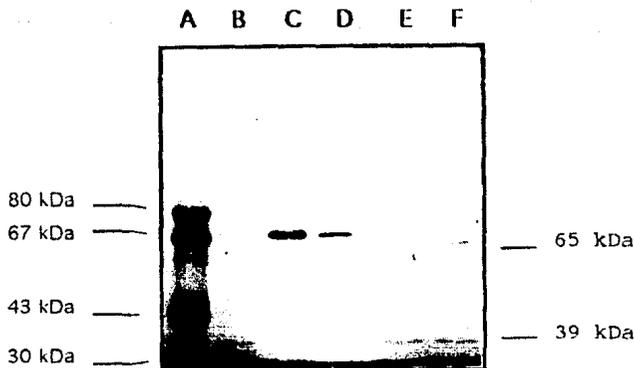


Figura 21.- Patrón electroforético en gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras de la inmunoprecipitación de la lipasa producida por *Pseudomonas aeruginosa*. Carriles: A) Marcadores de peso molecular: conalbúmina (80 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), Lisozima (15 kDa). B) Sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-RO). C) Suero de conejo antilipasa. D) Complejo Ag-Ac. E y F) Pico de elución obtenido con glicina pH 3.0.

DISCUSION

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que excreta varias enzimas, 3 de las cuales poseen actividad lipolítica: una fosfolipasa C extracelular, una esterasa unida a membrana y una lipasa extracelular (54). De ahí que en nuestro grupo estamos interesados en estudiar el posible uso en detergentes de una de las lipasas de éste microorganismo.

La enzima lipasa, es excretada dentro del medio de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-RO) acompañada de un carbohidrato de tipo LPS. Esto mismo, sucede para otras lipasas producidas por *Staphylococcus aureus* (59) y *Pseudomonas fluorescens* (13); así como en otras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (6).

Esta enzima, obtenida del sobrenadante del cultivo bacteriano del cual, se midió actividad lipolítica en presencia de tributirina para el cual se reporta una actividad de 3.5 U/ml a 55°C pH 8.5 y con p-NPP se obtuvo una actividad de 1.8 U/ml a 50°C pH 8.5. Asimismo, se observaron tres bandas de actividad lipolítica con el ensayo de actividad *in situ*, las cuales corresponden de acuerdo al análisis electroforético del sobrenadante a una proteína de 250 kDa, a una de 65 kDa y a una de 39 kDa.

La enzima se paso a través de una columna de sepharosa 4B-CL que de acuerdo a lo obtenido en la cromatografía realizada, la lipasa se purificó 7 veces con una recuperación de la actividad enzimática del 17% aproximadamente una constante catalítica (kcat) de $6.98 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ (para tributirina) y una de $3.604 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ (para p-NPP). Hecho el análisis del pico I por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras se observaron dos bandas de proteína reportando

un peso molecular de 65 y 39 kDa respectivamente, cuyos pesos se ven reducidos por un efecto del β -mercaptoetanol teniendo ahora que la proteína de 65 se reduce a 54 kDa y la de 39 a 30 kDa. Dicho peso molecular puede variar de acuerdo al grado de agregación que presente la enzima (18).

La proteína de 54 kDa obtenida es similar a otra lipasa reportada como la de *Pseudomonas fluorescens* (MC50) (55 kDa) (6), pero substancialmente diferente a lo reportado para otras lipasas del género *Pseudomonas* (29 kDa a 40 kDa) o de otras bacterias como *Staphylococcus aureus* (70 kDa) y *Staphylococcus hyicus* (86 kDa) (32,35,59). Mientras que el pl de 6.1 reportado para esta proteína no coincide con lo dicho por Stuer y col. 1986 (54), el cual observó un pl de 5.8 y un peso molecular de 29 kDa para la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PAC 1R) datos muy similares al pl y peso molecular obtenidos para la segunda proteína que se observa al analizar el pico I por electroforesis. Lo anterior, nos hace pensar que la proteína de 54 kDa es muy diferente a la reportada por la literatura y por lo tanto, se trate de otro lipasa y que la proteína de menor peso molecular sea producto de degradación de esta o bien, que esta última sea la lipasa que reporta Stuer y col. 1986 (54), ya que la cepa PAO-2003 de *Pseudomonas aeruginosa* tiene esta lipasa y por lo tanto, cuando se transformo dicha cepa con la introducción del plásmido RO que lleva la información de la cepa original (IGB-83) debe de tener las dos lipasas de las cuales sólo la lipasa de 54 kDa muestra una mayor actividad que la de 30 kDa en condiciones de altas temperaturas y pH's alcalinos.

Con el efecto de los parámetros fisicoquímicos en la actividad enzimática se observó que a medida que se aumenta la temperatura, la velocidad de reacción aumenta hasta llegar a un óptimo (55 C) y posterior

a ello la actividad de la enzima disminuye por inactivación térmica como sucede con la mayoría de las reacciones enzimáticas. En el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima se nota también una tendencia a la disminución de la actividad, lo que se explica quizás a que los enlaces hidrófobos, iónicos y electrostáticos se debilitan con el calor y un aumento en la energía cinética permite en conjunto la rotación de las uniones, lo que podría cambiar la posición normal de los grupos radicales importantes. Además debido a que la energía de activación es considerable, los efectos de la temperatura suelen ser drásticos y por lo tanto, el rango de operación de la enzima es limitado y fuera de él, la desnaturalización de la proteína es casi total.

El efecto del pH nos proporciona una información valiosa con respecto a la naturaleza de la enzima y al sitio activo en particular con lo cual, se puede ver que su mecanismo de reacción óptimo es en zona básica (pH 8.5) teniendo una fuerte afinidad por sustratos insolubles (tributirina en este caso) cuya actividad obtenida de 3.5 U/ml al pH indicado es 2 veces mayor que la actividad mostrada para un sustrato soluble a las condiciones óptimas que están en zona ácida (pH 6.5). Por lo tanto, la lipasa estudiada muestra dos pH's óptimos, lo que nos dice que esta enzima muestra una característica de esterasa (afinidad por sustratos solubles) y una de lipasa verdadera (afinidad por sustratos insolubles).

Es necesario insistir en que el pH al cual la lipasa alcanza su máxima actividad (pH 8.5 para tributirina y pH 6.5 para p-NPP) no necesariamente debe de coincidir con el pH al que se observa su máxima estabilidad.

Del efecto en la actividad lipolítica de detergentes aniónicos como el SDS y el dodecil bencen sulfonato podemos decir que de acuerdo a lo

reportado por Andree y col. 1980 (2) para el dodecil bencen sulfonato a una concentración de 0.4 mg/ml donde la actividad se ve inhibida hasta en un 60%, es lógico el resultado que obtuvimos nosotros (datos no mostrados) para éste mismo surfactante dado que la mínima concentración que probamos fue de 50 mg/ml donde prácticamente la actividad lipolítica se inhibió. Esto comparado con lo anterior, nos dice que nosotros usamos 100 veces más de surfactante que lo hasta ahora reportado. Pero sin embargo, con SDS la actividad recuperada después de 30 minutos de incubación fue bastante buena manteniendose estable hasta una concentración de 150 mg/ml, sin mostrar un cambio significativo en la actividad lipolítica.

En los detergentes catiónicos como el cetil piridinium, se encontró que la enzima es estable en el surfactante después de 30 y 60 minutos hasta una concentración de 150 mg/ml al no haber una variación significativa de la actividad con respecto al control. Además, se puede apreciar que el surfactante aumenta la solubilidad del sustrato, lo cual se ve reflejado en la elevada actividad lipolítica.

Para el caso del detergente zwitteriónico CHAPS, sucede el mismo efecto que el anterior con respecto a la solubilidad del sustrato pero lo más importante es la excelente estabilidad que muestra la enzima después de un periodo de incubación de 30 y 60 minutos respectivamente donde prácticamente no se aprecia una variación de la actividad lipolítica con respecto al control.

Con tritón X-100 (detergente no iónico), la enzima muestra una estabilidad aceptable después de 30 minutos de incubación hasta una concentración de 100 mg/ml con respecto a la actividad inicial. No así, después de 60 minutos de incubación donde la actividad disminuye considerablemente.

A pesar de que la actividad lipolítica se inhibe en un 50% con respecto a la inicial en presencia de los tripolifosfatos de sodio, la actividad de la enzima se mantiene estable a cualquier concentración usada después de un periodo de incubación de 30 y 60 minutos con dicho compuesto.

Por último, dentro del bloque de detergentes, podemos ver que la actividad lipolítica en presencia de un detergente comercial (ARIEL) se ve fuertemente estimulada a la concentración de 50 mg/ml teniendo un incremento aproximado del 60% con respecto a la actividad inicial. Mostrando el mismo patrón de actividad después de 30 y 60 minutos de incubar la lipasa con el detergente a la misma concentración. Sin embargo, aunque la actividad disminuye conforme se aumenta la concentración, la lipasa sigue mostrando una buena estabilidad a los tiempos de incubación establecidos; pues la variación que pueda existir con respecto a la actividad lipolítica es mínima. Con el resultado anterior podemos decir que la enzima muestra una buena estabilidad a todos los componentes de este detergente incluyendo las proteasas. Lo que nos lleva a la conclusión de que la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* es un buen candidato para su empleo en la elaboración de detergentes .

Si consideramos que el valor de K_m de una enzima generalmente es bajo (10^{-1} a 10^{-6} M); cuanto más pequeño es, nos indica que la enzima tiene mayor afinidad por su sustrato y, por lo tanto, su unión es más fuerte. De esta forma, con los resultados obtenidos de las constantes cinéticas y comparandolos con los de la literatura podemos decir que el valor de K_m determinado para p-NPP es un valor pequeño y por ende la enzima muestra una afinidad por el sustrato; afinidad que no podemos decir si es baja o alta comparada con la afinidad que pudiera tener la enzima con el otro

sustrato empleado para el cual no se determinaron las constantes cinéticas. Pero si podemos decir que el valor de $K_m = 0.0103 \text{ M}$ determinado para el sustrato en cuestión es más grande que el que reporta Douglas, H (1991) (11) para trilaurina como sustrato y por lo tanto la unión de la enzima con p-NPP no es tan fuerte.

De los anticuerpos policlonales obtenidos, se reportó un título de 1:10 y de 1:160 para el anticuerpo ratón antilipasa y el anticuerpo conejo antilipasa respectivamente. Siendo este último el que se caracterizó a través de las pruebas de inmunoelectrotransferencia e inmunoprecipitación para determinar el grado de pureza de la enzima. De esto resultó que el anticuerpo conejo antilipasa a través del patrón obtenido por inmunotransferencia, sólo reconoció una proteína de 54 kDa la cual corresponde a una de las dos proteínas que conforman el pico I de la cromatografía de filtración en gel que se realizó. Sin embargo, el anticuerpo también reconoce una banda de mayor peso molecular que no se reveló en el control de proteína teñido con amido black, lo que nos hace suponer que dicha banda corresponde a una porción del LPS asociado a la proteína el cual (como se mencionó en la sección de resultados), al ser altamente inmunogénico mostró una reacción cruzada muy alta con el anticuerpo. Por tal razón, aunque el anticuerpo se preadsorbio contra el LPS está reconociendo algo de lo que no se haya preadsorbido.

Finalmente, después de inmunoprecipitar la lipasa unida al anticuerpo se recuperó un 50% aproximadamente de la actividad lipolítica al eluir el complejo Ag-Ac con glicina-HCl 100 mM pH 3.0 y al hacer el análisis electroforético en un gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras de esta fracción, se observó que existe una proteína de 65 kDa y una de 39 kDa. Lo anterior nos demuestra que el anticuerpo conejo

antilipasa esta reconociendo dos proteínas que pueden ser dos lipasas diferentes o la proteína de 39 kDa sea un producto de degradación de la proteína de 65 kDa o que la proteína de bajo peso molecular sea un contaminante.

De esta forma, con la caracterización del anticuerpo conejo antilipasa se pudo verificar la pureza de la enzima. Sin embargo, nos vimos limitados para ello por la presencia del LPS que esta asociado con la enzima. Pero, a pesar de ello en todos los análisis electroforéticos que se hicieron del pico I (Cromatografía de filtración en gel) y del pico II (obtenido de la columna de afinidad que se uso para inmunoprecipitar el complejo Ag-Ac), así como en la inmunoelectrotransferencia siempre se observaron dos bandas de proteína de las cuales al parecer el anticuerpo conejo antilipasa reconoce sólo una proteína bien definida (54 kDa). Asimismo, los anticuerpos policlonales permiten la detección de la lipasa en otros microorganismos transformados y pueden servir como un segundo método de purificación por afinidad.

Hasta ahora, con la realización de la caracterización bioquímica de la enzima lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* podemos decir que la enzima reúne al menos las principales características que una enzima debe mostrar para su posible uso en detergentes. Ante esto, la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* (IGB-83), se perfila como un fuerte candidato para su empleo en detergentes.

CONCLUSIONES.

1.- Con la caracterización bioquímica de la lipasa de Pseudomonas aeruginosa (IGB-83) se logró establecer que dicha enzima muestra las características de:

- a) Activa a pH's alcalinos (pH 8.5),
- b) Termorresistente (55°C),
- c) Estable a la presencia de proteasas.

Por lo tanto, esta enzima puede ser un candidato para su posible uso en detergentes al presentar dichas características que son necesarias para cualquier enzima que se desee usar en la elaboración de detergentes.

2.- Con la obtención de los anticuerpos policlonales antilipasa de ratón y conejo se cuenta con una herramienta más para caracterizar a la enzima lipasa a partir de la cepa original o bien, en microorganismos transformados los cuales, tienen clonado el gen de la lipasa. Además se puede contar con un sistema de purificación por afinidad con los anticuerpos para separar la lipasa de otras proteínas contaminantes.

APENDICE

MEDIO FAM

Sales	100 ml
Trazas	2.5 ml
Agar	1.5 gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada ajustando el pH a 7.5 con NaOH 0.1 N, esterilizando en autoclave a 15 lb. de presión por 20 minutos.

SALES

Se preparó una solución 10X.

NaNO ₃	100 mM
KH ₂ PO ₄	41 mM
Na ₂ HPO ₄	160 mM
K ₂ SO ₄	9.8 mM
MgSO ₄	1.5 mM
CaCl ₂	0.6 mM
EDTA + Fe ⁺⁺⁺	0.1 mM

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

TRAZAS

ZnSO ₄	0.8 mM
MnSO ₄	1.1 mM
H ₃ BO ₃	0.9 mM
CuSO ₄	6.0 mM
Na ₂ MoO ₄	0.2 mM
CoCl ₂	0.2 mM
KI	0.4 mM
EDTA + Fe ⁺⁺⁺	0.3 mM

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

FeSO ₄	0.1 mM
NiCl ₂	1.7 mM
H ₂ SO ₄	0.8 mM

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

MEDIO LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona o Peptona de caseína	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	1.7 mM
Agar	1.5 gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada ajustando el pH a 7.5 con NaOH 0.1 N, esterilizando a 15 lb. de presión por 20 minutos.

SOLUCION SATURADA DE DIAMINOBENZIDINA (SOLUCION II/DAB)

Amortiguador de Fosfato de Sodio	10 ml
DAB	6 mg

La solución es estable por pocas horas (preparar al momento de usarse).

SOLUCION DE Co-Ni 1%

CoCl	0.25 gr
NiCl	0.25 gr

Disolver en 5 ml de agua desionizada cada reactivo por separado. Ya disueltos mezclar ambas sales y aforar a 25 ml. Esta solución es estable por tiempo indefinido a 4 C.

SOLUCION DE H₂O₂ 1%

Peroxido al 30% (Sol. comercial)	33 μ l
H ₂ O desionizada	970 μ l

SOLUCION DE REVELADO

Solución II/DAB	10 ml
CoNi 1%	300 μ l
H ₂ O ₂ 1%	50 μ l

REFERENCIAS.

- 1.- Ahern, T.J. and Klibanov, M. The Mechanism of Irreversible Enzyme Inactivation at 100°C. *Science* (1985): 228: 1280-1284.
- 2.- Andree, H., Müller, R.W. and Schmid, D.R. Lipases as Detergent Components. *J. Appl. Biochem.* (1980): 2: 218-229.
- 3.- Arnold, G.R., Shanani, M and Dwivedi B. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. *J. Dairy Sci.* (1975): 58: (8): 1127-1143.
- 4.- Aunstrup, K. Production, Isolation and Economics of Extracellular Enzymes. *Appl. Biochem. Bioeng.* (1979): 2: (2): 27-69
- 5.- Bahn, M. and Schmid, R.D. Enzymes for Detergents. *Biotec.* (1987): 1: 119-130
- 6.- Bozoglu, F., Swaisgood, E.H. and Adams, M.D. Jr . Isolation and Characterization of an Extracellular Heat-Stable Lipase Produced by *Pseudomonas fluorescens* MC50. *J. Agric. Food. Chem* (1984): 32: 2-6
- 7.- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitative of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-binding. *Anal. Biochem.* (1976): 72: 248-254.
- 8.- Cadieux, J. Kuzio, J. Micazzo, H.F. and Kropinski, M.D. Spontaneous Release of Lipopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* (1983): 155: (2): 817-825
- 9.- Coleman, W. La Biología en el Siglo XIX. Editorial Fondo de Cultura Económica. México. (1980). pp. 219-220; 229-230.
- 10.- Customizing lipases for Industrial Processing. *Biotechnology Bulletin* (1987): 6: (1).
- 11.- Douglas, A.M.; Prausnitz, M.J. and Blanch, W.H. Kinetics of Lipase-

Catalysed interesterification of Triglycerides in Cyclohexane. *Enzyme Microb. Technol.* (1991): 13: 98-103.

12.- Douzou, P. *Las Biotecnologías*. Editorial Fondo de Cultura Económica, México. (1980). pp. 93-95.

13.- Dring, R. and Fox, P.R. Purification and characterization of a heat-stable lipase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 29. *Ir. J. Fd Sci. Technol.* (1983): 7: 157-171.

14.- Fisher, E.B. and Kleber, P.H. Isolation and Characterization of the Extracellular Lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. *J. Basic Microbiol* (1987): 27: (8): 427-432.

15.- Fujii, T., Tatara, T. and Minagawa, M. Studies on Application of Lipolytic Enzyme in Detergency I. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (1986): 63: (6): 796.

16.- Fukumoto, J.; Iwai, M. and Tsujisaka, Y. Studies on Lipase. I. Purification and Crystallization of a Lipase Secreted by *Aspergillus niger*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (1964): 9: 353-361.

17.- Gilbert, J.E.; Drozd, W.J. and Jones, W.C. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF-2. *J. General Microbiology* (1991): 137: 2215-2221.

18.- Gilbert, J.E.; Cornish, A. and Jones, W.C. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF-2. *J. General Microbiology* (1991): 137: 2223-2229.

19.- Godfrey, T. and J. Reichelt. *Industrial enzymology: The application of enzymes in industry*. The Nature Press, New York. (1983). pp. 1-7.

20.- Gormsen, E., Høge-Jensen, B., Christensen, T., Boel, E. and Stentoft-Olesen, B. Lipolase. A Microbial Lipase for Detergents, Developed by Application of r-DNA Technique. Novo Industri A/S. BSO/A1R D-881372.

(1988). (Patente. USA)

21.- Haehu, H. Bioquímica de las fermentaciones. Editorial Aguilar Madrid España. (1956). pp 26, 28, 31, 35-37.

22.- Han, D. and Shick, R.J. Characteristics of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil in AOT-Isooctane Reversed Micelles. Biotech. & Bioeng. (1986): 28: 1250-1255.

23.- Han, Y.W. and Anderson A. Semisolid Fermentation of Ryegrass Straw. Appl. Microbiol. (1975): 30: 930-934.

24.- Harlow, Ed. and Lane, D. Antibodies: A laboratory manual. Col Spring Harbor Laboratory. (1988). USA.

25.- Iwai, M. and Tsujisaka, Y. The Purification and the Properties of three Kinds of Lipases from *Rhizopus delemere*. Agr. Biol. Chem. (1974): 38: (6): 1241-1247.

26.- Jäger, E.K. and Winkles, V.K. The Effect of Native and Modified Hyaluronate upon the Formation of Exolipase by *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. (1983): 19: (1): 59-63.

27.- Johnson, D.A.; Gautsch, J.W. and Elder, J.H. Improved Technique Utilizing Nonfat Dry Milk for Analysis of Proteins and Nucleic Acids Transferred to Nitrocellulose. Gene Anal. Tech. (1984): 1: 5-8.

28.- Kilara, A. Enzyme-Modified Lipid Food Ingredients. Proc. Biochem. Abr. (1985): 35-45.

29.- Kokusho, Y.; Machida, H. and Iwasaki, S. Studies on Alkaline Lipase: Isolation and Identification of Lipase Producing Microorganisms. Agr. Biol. Chem. (1982): 46: (5): 1159-1164.

30.- Kouker, G. and Jaeger, E.K. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases Appl. Envir. Microbiol. (1987): 53: (1): 211-213

31. Krussman, H. and Bercovici, R. Detergency by surfactant/cosurfactant

systems. J. Chem. Tech. Biotechnol. (1991): 399-408.

32.- Kugimiya, W.; Otani, Y.H.; Hashimoto, Y. and Takagi, Y. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Lipase Gene from *Pseudomonas fragi*. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986): 141: (1): 185-190.

33.- Kuno, H. and Kihara, K.H. Simple Microassay of Protein with Membrane Filter. Nature (1967): 215: 974-

34.- Laemmli, E.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature (1970): 227: 680-685.

35.- Lee, C.Y. and landolo, J.J. Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. Journal of Bacteriology (1986): 166: 385-391.

36.- López-Munguía, A. En Prospectiva de la Biotecnología en México, Fundación Javier Barros Sierra/CONACYT. México.(1985). 24: 265.

37.- López-Munguía, A. y Quintero, R. Tecnología Enzimática: aplicaciones en alimentos y medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, México, (1987). pp 29-35.

38.- Lu, J.Y.; Liska, J.B. Lipase from *Pseudomonas fragi*. II. Properties of the Enzyme. Appl. Microbiol. (1969): 18: (1): 108-113.

39.- Macrae, A.R. and Hammond R. Present and Future Applications of Lipases. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.(1985): 3: 193-217.

40.- Merril, C.R.; Goldman, D. and Van Keuren, M.L. Gel Protein Stains: Silver Stains. In: Methods in Enzymology (1984): 104: 441-447.

41.- Nahas, E. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* Under Various Growth Conditions. Journal of General Microbiol.(1988): 134: 227-233.

42.- Nishio, T.,Chikano T. and Kamimura M. Purification and some

- Properties of Lipase Produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B Agr. Biol. Chem.(1987): 51: (1): 181-186
- 43.- Norin, M., Boutelje J., Holmberg E. and Hult K. Lipase immobilized by absorption. Effect of Support Hydrophobicity on the reaction rate of esther synthesis in ciclohexane. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1988): 28: 527-530.
- 44.- Okumura, S.; Iwai, M. and Tsujisaka, Y. Positional Specificities of Four Kinds of Microbial Lipases. Agr. Biol. Chem. (1976): 40: (4): 655-660.
- 45.- Pal, N., Das, S. and Kundu, K. Influence of Culture and Nutritional Conditions on the Production of Lipase by Submerged Culture of *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol. (1978): 56: (6): 593-598.
- 46.- Portoles, A.A. La Célula Bacteriana. Editorial Aguilar. Madrid, España. (1959). pp. 279-289.
- 47.- Quintero, R.R. Prospectiva de la Biotecnología en México. Fundación Javier Barrios Sierra / CONACyT. México. (1985).
- 48.- Quintero, R.R. Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana. México.
- 49.- Segel, H.I. Biochemical Calculations. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. (1976): 4: 208-322.
- 50.- Seitz, W.E. Industrial Applications of Microbial Lipases: A Review. J. Amer. Oil Chem. Soc. (1974): 51: 1216.
- 51.- Semeriva, M., Benzonana G. and Denuelle, P. Some properties of a Lipase from *Rhizopus arrhizus*: Separation of a glycopeptide bound to the Enzyme. Biochem Biophys Acta (1969): 191: 598-610.
- 52.- Scriban, R. Biotecnología. El Manual Moderno. México. (1985): 6: 242-281.
- 53.- Shabtai, W. and Mishne, D.N. Production, Purification and Properties

of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. Appl. Environ. Microbiol. (1992): 58: (1): 174-180.

54.- Stuer, W., Jaeger, E.K. and Winkler, K.V. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. (1986): 168: (3): 1070-1074.

55.- Sugiura, M. and Isobe, M. Studies on the Lipase of *Chromobacterium viscosum*. III. Purification of a Low Molecular Weight Lipase and Its Enzymatic Properties. Biochim. Biophys. Acta. (1974): 341: 195-200.

56.- Sugiura, M. and Isobe, M. Effects of Temperature and State of Substrate on the rate of hydrolysis of glycerides by Lipase. Chem. and Pharm. Bull. (1975): 23: 681-682.

57.- Tamayo, L.E. Caracterización microbiológica de cepas bacterianas productoras de enzimas lipasas capaces de ser usadas en la elaboración de detergentes. Tesis de Licenciatura (1989). México. Universidad Nacional Autónoma de México.

58.- Tomisuka, N.; Ota, Y. and Yamada, K. Studies on Lipase from *Candida cylindracea*. Part I: Purification and Properties. Agr. Biol. Chem. (1966): 30: (6): 576-584.

59.- Tung A.S., Ju, S.T., Sato S. and Nisonoff. Production of large amounts of antibodies in individual mice. J. Immunol. (1976): 116: 676-681.

60.- Tyski, S., Hryniewicz, W. and Jelaszewicz, J. Purification and some properties of the *Staphylococcal* extracellular lipase. Biochem. Biophys. Acta (1983a): 749: 312-317.

61.- Van Ort, M.G.; Deever, A.M.; Dijkman, R.; Tjeenk, M.L.; Verheij, H.M.; De Haas, G.H.; Wenzing, E. and Gotz, F. Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. Biochemistry (1989): 28: 9278-9285.

62.- Winkhans, H.D. The Detergent an Cleanser Market in Europe. *Chimica oggi*. Octubre (1987). pp. 41-46.

63.- Winkler, U. and Stuckmann, M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysacharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. (1979): 138: (3): 663-670

64.- Yamame, T. Enzyme Technology for the lipids Industry: An Engineering Overview. J.Amer.Oil Chem. Soc. (1987): 64:(12):1657-1662.