



9
Z E J
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO SELECTIVO DE UN MICROORGANISMO
PRODUCTOR DE LIPASA PROVENIENTE DE UN
AMBIENTE EXTREMO**

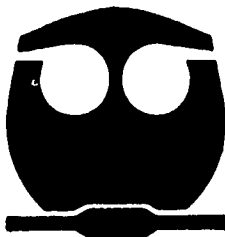
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A .

ISMAEL BUSTOS JAIMES



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO


Presidente: Prof. Eduardo Bárzana García.
Vocal: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero.
Secretario: Profa. Amelia Farrés González-Saravia.
1er. suplente: Profa. María Elsa Escudero García.
2do. suplente: Profa. Adriana Guadalupe Mejía Chávez.

1972
UN-31237
1972
31237
31237

TRABAJO QUE SE DESARROLLO EN EL:

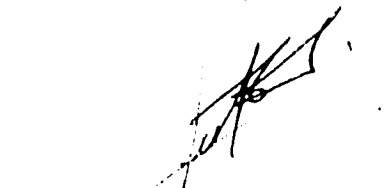
LABORATORIO 312 DEL CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNAM.

ASESOR



Amelia Farrés González-Saravia.

SUSTENTANTE



Ismael Bustos Jaimes.

A mi Madre.

A Georgina.

A la memoria de José Luis.

A la memoria de Fernando.

"¿Qué se puede querer si todo es horizonte?"

Silvio Rodríguez.

Quisiera expresar mi agradecimiento a muchas personas además de las mencionadas anteriormente. Es difícil mencionarlos a todos, y pido una disculpa a aquellos que no mencione, pero es difícil...

A mis amigos, René, Fito, Facho, Alexander (Armando), Adelfo, Alicia, Jesús, María Luisa, Norma (a ambas), Amanda, Magda, Idalia, Elsa, Mo (querida de la...), Laura (también a las dos), la siempre indispensable Lety, Jazmín, la Güerigoyen, Carlos, Sergio, Loma, Vero, Fabiola, Ili, Maribel, Sandy, Oli, la Coatza, Emy (Noé), Teté, el pájaro Dodo, Rocío, Maru (sí, las dos), Jim Morrison, Mary Paz, Claudia (varias), el Tex-TEX, etc., etc., etc.

Un agradecimiento especial a mi asesora, la Dra. Amelia Farrés, por su apoyo en este trabajo y por creer en mi.

También deseo agradecer los profesores Eduardo Bárzana, Raúl Aguilar, María Elsa Escudero y Adriana Guadalupe Mejía, el tiempo empleado para la revisión de esta tesis, así como sus atinadas observaciones.

Quiera agradecer a los profesores Alfonso Lira y Elba Rojas por su ayuda en este trabajo y su amistad.

Finalmente deseo agradecer a la Facultad de Química y a la U. N. A. M., todo lo que me dieron.

INDICE.

Elemento.	Página
Resúmen.	1
Capítulo 1. Microorganismos extremófilos y sus enzimas.	2
Capítulo 2. Generalidades sobre lipasas.	13
Capítulo 3. Generalidades sobre aislamiento selectivo de microorganismos.	20
Capítulo 4. Justificación y objetivos.	40
Capítulo 5. Material y métodos.	42
Capítulo 6. Resultados y discusión.	52
Capítulo 7. Conclusiones.	72
Capítulo 8. Recomendaciones.	73
Bibliografía.	74

RESUMEN.

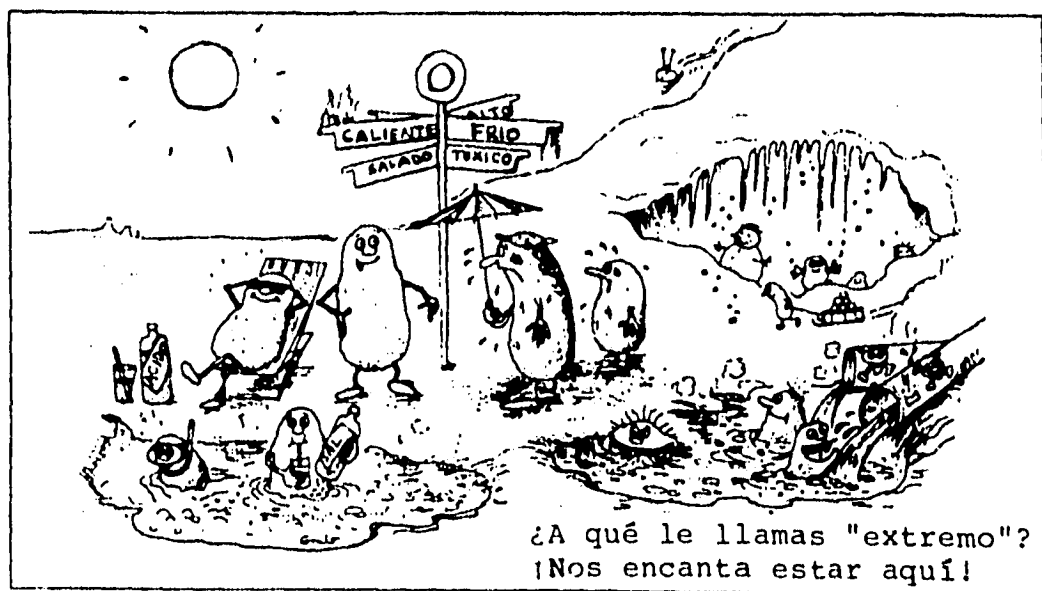
Los microorganismos extremófilos y sus enzimas son de particular interés industrial ya que permiten simplificar las condiciones de los procesos. Los usos de lipasas se han diversificado y con ello los requerimientos de la industria por enzimas capaces de trabajar en ambientes extremos. Los objetivos de este trabajo consistieron en aislar un microorganismo productor de lipasa con actividad a altas temperaturas y caracterizar su actividad. El lugar del aislamiento fue Los Azufres, Michoacán, México. Se desarrolló un sistema de enriquecimiento *in situ* de los microorganismos de interés. Para este enriquecimiento se utilizaron cartuchos para cromatografía líquida de octadecilsilano embebidos con manteca vegetal. Se recogieron las muestras después de una semana de estancia en el lugar elegido. Se realizaron los ensayos de aislamiento con técnicas de plaqueo directo y de enriquecimiento selectivo con el uso de alta temperatura de incubación como agente selectivo para la obtención de organismos. Se obtuvieron dos microorganismos lipolíticos, sólo uno de los cuales resultó termófilo, en el cual se centró el resto de la investigación. El microorganismo se clasificó mediante pruebas bioquímicas clásicas en el género *Bacillus* y se le denominó GMA1 al no poder ubicarlo en una especie definida con este único criterio taxonómico. La medición de actividad lipolítica se realizó mediante la técnica de caída de pH y encontraron óptimos de actividad a 50°C y pH de 10.5. Muestra actividad en un intervalo de 5°C a 80°C, conservando más del 75% de su actividad a esta última temperatura durante 10 minutos. El rango de pH en el que manifiesta actividad va de 8.6 a 11.3. Presenta gran afinidad por ácidos grasos de cadena corta y es inhibida por Ca^{2+} , Mg^{2+} y grupos sulfhidrilo.

CAPITULO 1.

MICROORGANISMOS EXTREMOFILOS Y SUS ENZIMAS.

Introducción.

Los microorganismos y sus enzimas se han utilizado para diversos procesos industriales, médicos y ambientales. Estos procesos requieren frecuentemente el uso de condiciones extremas como temperaturas, fuerza iónica, presión, pH, así como solventes orgánicos. Por ello ha sido necesario el aislamiento de microorganismos y enzimas que puedan realizar las reacciones de estos procesos en estas condiciones impuestas. Estos microorganismos se pueden encontrar en distintos ambientes que para el hombre pueden parecer extremos, pero para ellos resultan óptimos o muy cercanos a lo óptimo para su desarrollo. Recientemente el término "extremófilo" se ha usado para describir a estos microorganismos, incluyendo en éstos a los termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos, osmófilos, barófilos, resistentes a radiación y resistentes a metales pesados. Este grupo de microorganismos había sido considerado como curiosidades de laboratorio y hasta hace poco se comenzó a considerar su potencial de aplicación biotecnológica (Herbert 1992). El descubrimiento de enzimas más activas y con mayor estabilidad a condiciones extremas de proceso ha dado por resultado la expansión del mercado de éstas (Zamost y col. 1988).



Fuente: Herbert (1992).

Termófilos.

La importancia de las enzimas termoactivas radica en las varias ventajas que éstas presentan en procesos industriales con respecto a las enzimas termolábiles. La principal consiste en que se puede elevar la temperatura del proceso y por ello, la velocidad de la reacción. En general un incremento de 10°C puede elevar la velocidad de reacción al doble, lo cual en su momento puede constituir una reducción en la concentración de enzima usada en el proceso. Aparejado a la actividad se tiende a observar una alta termoestabilidad que les da a estas enzimas una mayor vida media, lo que representa un ahorro en costos. Además el uso de altas temperaturas en proceso (mayores a 60°C) inhiben el desarrollo microbiano, disminuyendo así la probabilidad de contaminación. Por otro lado, el uso de altas temperaturas reduce la viscosidad, lo cual es útil en las operaciones de mezclado y transferencia de masa (Zamost. 1988). En la Tabla 1.1 encontramos enzimas termofílicas que se encuentran disponibles en el mercado para aplicaciones comerciales; como se puede ver la temperatura de proceso puede ser muy variable al igual que sus aplicaciones.

TABLA 1.1. Enzimas termoestables disponibles y su aplicación industrial.

Enzima	Temperatura de proceso (°C)	Aplicación
Carbohidratos		
α-Amilasa	90-110	Hidrólisis de almidón, cervecería panadería, textiles.
α-Amilasa fúngica	50-60	Maltosa.
Glucoamilasa	50-60	Hidrólisis de maltodextrinas.
Pululanasa	50-60	Jarabes de alta glucosa.
Xilosa isomerasa	50-60	Jarabes de alta fructosa.
β-Galactosidasa	30-50	Hidrólisis de lactosa.
Celulasa	45-60	Hidrólisis de celulosa.
Pectinasa	30-50	Clarificación de jugos de frutas.
Proteasas		
Proteasas ácidas	30-50	Procesamiento de alimentos.
Proteasas neutras (fúngicas)	40-60	Panadería, cervecería.
Proteasas alcalinas	40-60	Detergentes.
Lipasas	30-70	Detergentes, procesamiento de alimentos.

Fuente: Herbert 1992

Amilasas. Dos amilasas han sido estudiadas en gran detalle, éstas son la α-amilasa y la β-amilasa. La α-amilasa es una endoenzima que hidroliza los enlaces glucosídicos α-1,4 de manera aparentemente aleatoria en la amilosa. Actúa de manera similar en la amilopectina, sin embargo los enlaces α-1,6 no son hidrolizados por lo cual se forma una pequeña cantidad de panosa, un trisacárido que contiene estos enlaces. A esta enzima se le conoce como "enzima

licuefactante" por su capacidad de reducir la viscosidad de soluciones de almidón. El tratamiento con esta enzima de almidón, produce una mezcla de maltosa, glucosa y un poco de panosa. La β -amilasa es una exoenzima que remueve unidades de maltosa del extremo no reductor de la cadena de almidón. Dado que la maltosa aumenta la dulzura de la solución de almidón, a esta enzima se le conoce como "enzima sacarificante" (Richardson y Hyslop 1985). Las α -amilasas termoestables se conocen desde 1977, cuando se detectaron como impurezas en la producción de proteasas de *Bacillus stearothermophilus* (Sidler y Zuber 1977). Las α -amilasas termoestables despertaron un gran interés en la industria, ya que podían trabajar hasta 110°C, por lo cual se incrementó la investigación en el área y se han encontrado otros microorganismos productores de estas enzimas, como *Bacillus licheniformis* (Morgan y Priest 1980), *Thermoactinomyces vulgaris* (Sakano y col. 1982) y *Thermomonospora curvata* (Glymph y Stutzenberger 1977). El interés en estas enzimas llevó a los investigadores a buscar en otros sistemas de expresión para aumentar los rendimientos de la enzima. Se clonó la α -amilasa de *B. stearothermophilus* en *E. coli* usando el pBR322 como vector con buenos resultados, en contraste con la clonación de otras amilasas como las de *B. coagulans* y la de *B. subtilis* con este mismo vector, que presentaron inestabilidad (Tsukagoshi y col. 1984). Por otro lado la amilasa de *B. licheniformis* se ha clonado en *B. subtilis* y en *E. coli*, obteniéndose clonas productoras que conservan la termoestabilidad de la α -amilasa original (Joyet y col. 1984).

Proteasas. Las proteasas de microorganismos neutrófilos y alcalófilos representan la mayor fuente de enzimas proteolíticas producidas. Las proteasas alcalinas, o las subtilisinas, secretadas por microorganismos neutrófilos del género *Bacillus* son estables en un rango de pH de 5 a 10 a bajas temperaturas, pero se inactivan fácilmente a altas temperaturas y en medios alcalinos en ausencia de Ca^{2+} . Las proteasas alcalinas de microorganismos alcalófilos no han sido estudiadas en gran detalle pero mantienen muchas similitudes con las subtilisinas. Las serín-proteasas de los alcalófilos muestran una mejor estabilidad en medios alcalinos y puntos isoelectricos extremadamente básicos (Durham y col. 1987). Las proteasas alcalinas como la de *Thermomonospora fusca* YX tienen varias propiedades que la hacen potencialmente comercial. Presentan actividad en un amplio rango de temperatura y pH, y es resistente a desnaturalización por calor y agentes químicos. Una aplicación de estas proteasas está en la hidrólisis de proteína ya sea de plantas, pescados o animales, considerando que la hidrólisis ácida convencional degrada al triptófano y convierte a la glutamina y asparagina a sus formas ácidas. Estos hidrolizados son de gran importancia clínica para

personas que por prescripción médica deben recibir una alimentación líquida con alto contenido en proteína. Otro uso es el de limpieza de membranas de ultrafiltración o de ósmosis inversa contaminadas con proteínas. Algunos tipos de estas membranas, especialmente las de acetato de celulosa se pueden dañar por las condiciones extremas de temperatura y pH usadas para la limpieza de equipo para procesamiento de productos lácteos. La proteasa de *T. fusca* puede hacer el trabajo de las enzimas convencionales que se utilizan para la limpieza de estos equipos, con mejor eficiencia, y en menos de una hora (a 65°C, pH 8), comparado con las 24 horas que tardan las otras enzimas. Las proteasas alcalinas se utilizan también en detergentes, donde la subtilisina Carlsberg (de *Bacillus licheniformis*) ha dominado el mercado por su amplia especificidad y su pH óptimo muy cercano al pH de lavado (aproximadamente 9), además muestra actividad de 55 a 60°C. Las proteasas como la de *T. fusca* presentan actividad por arriba de 80°C y son menos sensibles a peróxido de hidrógeno (Gusek y Kinsella 1988). Otras proteasas, como las mostradas en la Tabla 1.2, han sido estudiadas dada su potencial aplicación industrial y sus características, como la termopsina de *Sulfolobus acidocaldarius*, una arqueobacteria termófila. Esta enzima hidroliza proteínas en varios sitios internos (actividad endopeptidasa) con actividad óptima a pH 2 y 90°C. Es activa en un rango de pH de 0.5 a 11.5 y de 5 a 100°C de temperatura (Lin y col. 1992).

TABLA 1.2. Características de varias proteasas termoactivas.

Microorganismo/ proteína	Tipo de enzima	pH*	Temp.* (°C)	Vida media
<i>Bacillus licheniformis</i> Subtilisina A1	S	9.0	60	50min/65°C
<i>B. thermoproteoliticus</i> Termolisina	M	7.0	80	15min/85°C
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1 Acualisina	S	10.0	75	180min/80°C
<i>Thermus aquaticus</i> T351 Caldolisina	M	8.0	90	60min/90°C >10000min/75°C
<i>Streptomyces</i> sp. 1689 Proteasa A	SH-S	10.5	80	30min/80°C
<i>S. rectus</i> va <i>proteolyticus</i>	S	9.0	70	30min/80°C
<i>Desulfurococcus</i> sp. Arqueolisina	S	8.0	100	90min/95°C 9min/105°C
<i>Thermomonospora fusca</i> Proteasa YX	S	9.0	80	15min/85°C
<i>Pyrococcus furiosus</i> Pyrolisina	ND	6.8	98	3600min/98°C
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> Termopsina	ND	2.0	90	>90min/90°C*
<i>Vibrio proteolyticus</i> Vibriolisina	ND	8.0	65	20min/65°C

* La enzima no muestra pérdida de actividad después de 90 minutos. * Valor óptimo.
S, Serina; M, Metal; ND, No Descrito.

Fuente: Zamost y col. 1988.

Xilanasas. Existen otras enzimas con aplicaciones de gran interés industrial como las xilanasas. Las xilanasas se han utilizado con cuatro fines principalmente; 1) degradación enzimática de desechos agrícolas para la producción de alcoholes combustibles; 2) tratamiento enzimático de alimentos para animales para la liberación y posterior aprovechamiento de pentosas; 3) tratamiento de pulpas para la obtención de celulosa para producción de rayón; y 4) para el bioblanqueado de pulpas de madera. En la industria papelera este bioblanqueado sirve para dar un mejor brillo a las pulpas blanqueadas, reduciendo las cantidades de cloro usadas e incrementando la calidad del papel para procesos posteriores de reciclado. En 1989, Novo Nordisk S/A lanzó al mercado una xilanasas para el blanqueado de pulpas de madera, la Pulpzyme® HA, que es una preparación enzimática que contiene una hemicelulasa producida por *Trichoderma reesei*.

Lipasas. Las lipasas se utilizan para la catálisis de varias reacciones como son; 1) hidrólisis de lípidos; 2) acidólisis (reemplazo de un ácido graso por un ácido graso libre); 3) transesterificación (intercambio de ácidos grasos entre

triglicéridos); y 4) síntesis de ésteres. Como se menciona en el capítulo correspondiente a lipasas, es importante que no esté presente una gran cantidad de agua cuando se desea conservar el enlace éster, de modo que las reacciones se realizan en una mezcla de los reactivos, para este fin se prefiere que la mezcla se caliente entre 50 y 80°C para mantener estas grasas en estado líquido. Se han encontrado varias lipasas termoactivas, como las descritas por Lie y col. (1991); Gowland y col. (1987); Emanuilova. y col. (1993); y Watanabe y col. (1977). Las lipasas usadas para transesterificación, acidólisis o síntesis de ésteres se inmovilizan para aumentar su termoestabilidad y utilizarse en columnas como la lipasa de *Mucor miehei* que eleva su óptimo a 70°C tras la inmovilización (Zamost y col. 1988).

Ciclodextrin-glicosil transferasas. El almidón puede ser degradado por un grupo de enzimas denominado "ciclodextrin-glicosil transferasas" (CGTasas, 1, 4- α -D-glucano-4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferasa, EC 2.4.1.19). La CGTasa degrada almidón al catalizar las reacciones de ciclización y desproporción como se muestran en la Figura 1.1. En el proceso de producción de ciclodextrinas se utiliza un paso previo para la solubilización del almidón mediante el uso de una α -amilasa que debe ser inactivada posteriormente para obtener un buen rendimiento de ciclodextrinas. El procedimiento requiere del uso de la CGTasa de *B. mascerans* pero requiere de mucho tiempo para la obtención de buenos rendimientos y por ello aumentan las probabilidades de contaminación. La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627 posee un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 95°C, lo cual ha hecho que esta enzima se utilice industrialmente para la hidrólisis de almidón y síntesis de ciclodextrinas (Zamost y col. 1988).

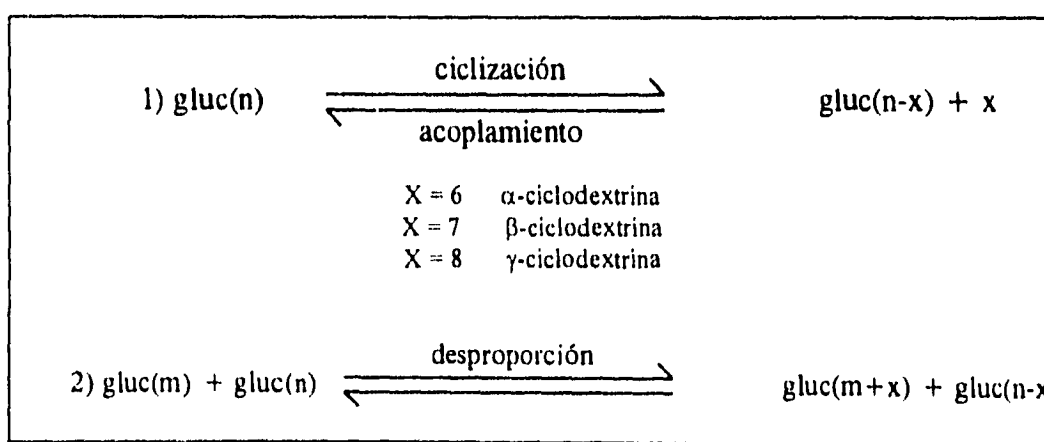


FIGURA 1.1. Reacciones de ciclización y desproporción catalizadas por la CGTasa.
Fuente: Zamost y col. (1988).

DNA polimerasa. Otra de las aplicaciones de las enzimas termoactivas está en la investigación, como es el caso de la DNA polimerasa (*Taq* polimerasa) del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus* (Brock y Freeze 1969), que es utilizada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de regiones específicas de DNA (Mullis y Faloona 1987). Inicialmente se utilizaba la polimerasa de Klenow, pero el proceso incluye un paso de desnaturalización de DNA a 95°C donde esta enzima se desnaturalizaba, mientras que la polimerasa de *Thermus aquaticus* a esta temperatura tiene una vida media (40 min) que le permite ser adicionada una sola vez y seguir funcionando a lo largo de los ciclos de amplificación, representando menores costos en el proceso. El mismo principio se ha aplicado para la inclusión de otras enzimas a los procesos de amplificación de DNA, como la DNA ligasa de *Thermus thermophilus*.

Psicrófilos.

Los microorganismos psicrófilos han tenido aplicación en la producción de alimentos madurados, como quesos y leches. Las enzimas de *Mucor miehei* (Renilase® y Marzyme®) se han utilizado en la manufactura de quesos como sustitutos de la renina de ternera. El procesado a temperaturas intermedias (28-37°C) produce una actividad residual de coagulación cuando el suero se utiliza en otros productos lácteos. Esta actividad se elimina fácilmente con un tratamiento térmico si se utiliza una enzima psicrófila. La hidrólisis de lactosa que normalmente se realiza a 30-40°C con la β -galactosidasa de *Kluyveromyces* tiene bajos rendimientos ya que el tiempo de reacción es de sólo 4 horas para disminuir el riesgo de contaminación bacteriana. La solución a este problema es el uso de una enzima psicrófila que trabaja en un rango de temperatura de 5 a 10°C y prolongar la reacción hasta las 24 horas, obteniéndose rendimientos de hasta el 80% con muy bajos riesgos de contaminación. En la maduración de quesos se ha utilizado también una enzima psicrófila, la Neutrasa® de *B. subtilis*, la cual produce un sabor muy intenso tras un mes de incubación a 18°C, comparable al producido normalmente en cuatro meses. Otra aplicación potencial de los psicrófilos es la producción de aceites microbianos. Varias especies de hongos y levaduras son capaces de acumular cantidades importantes de triglicéridos y otros lípidos, tanto como 80% del peso total de la biomasa. Estos lípidos son ricos en ácidos grasos poliinsaturados de las series ω -3 (como el cicosopentanoico) y ω -6 (como el γ -linolénico y el araquidónico) que son esenciales para la dieta del humano. Los microorganismos productores de estos ácidos son *Mucor* y *Mortierella* spp. los cuales pueden ser cultivados en reactores convencionales a temperaturas bajas (12°C).

Otra aplicación poco usual está en la formación de núcleos de hielo para la producción de nieve artificial y helados a temperaturas en las que el agua se mantiene superenfriada. Las *Pseudomonas* (Hielo +) producen proteínas que sirven para la formación de estos cristales de hielo a temperaturas de -3 a -5°C en lugar de las usuales de -8 a -10°C. Para esta aplicación se usan células muertas que aún poseen estas proteínas. En condiciones normales, estos organismos dañan las cosechas al permitir la formación de hielo, pero se ha visto que las *Pseudomonas* Hielo - evitan este daño al impedir la colonización de las Hielo + (Herbert 1992).

Alcalófilos y Acidófilos.

Las enzimas alcalófilas presentan un campo de aplicación importante en la industria de los detergentes, ya que éstos en solución pueden alcanzar valores de pH óptimo de 8.0 a 10.5. Se han utilizado principalmente proteasas producidas por microorganismos del género *Bacillus* que presentan la característica de ser alcalófilas. También hay una serie de amilasas de este tipo, igualmente producidas por *Bacillus* spp. que pueden tener uno o hasta tres pHs óptimos de actividad dependiendo de su tipo. Pero existen otras enzimas alcalófilas, como las CGTasas, pululanasa, celulasas, β -1,3 glucanasas, degradadoras de manano, lipasas, β -lactamasa, xilanasa pectinasas, catalasa y fosfatasa alcalina. Varias de estas enzimas se usan en lavandería ya que muchas veces ciertas sustancias son difíciles de remover de algunos tejidos por simple acción detergente (Horikoshi 1990). En cuanto a lipasas, como se puede ver en el capítulo correspondiente a éstas, pueden ser de distinto pH óptimo. Cuando se clasifican las lipasas por su pH óptimo, pueden ser neutras, ácidas o alcalinas, entre estas últimas como la de *Penicillium crustosum* y una fracción de la de *Mucor miehei* presentan un pH óptimo de 9.0. La lipasa de *Achromobacter* sp. posee un pH óptimo de 10.0. *Pseudomonas nitroreducens* va *thermotolerans*, produce una lipasa con un pH óptimo de 9.5 igual que la lipasa de *Pseudomonas fragi*, sus temperaturas óptimas de actividad son de 50 y 75°C respectivamente. Estos microorganismos fueron aislados mediante el uso de un cultivo de enriquecimiento con 2% de aceite de olivo y sales al cual se le ajustó el pH a 9.5-10.0 (Watanabe y col. 1977).

Los microorganismos acidófilos se benefician o crean la acidez de su ambiente. Una de las claves de su acidofilia es la capacidad de oxidar compuestos con radicales sulfidrilos en presencia de oxígeno para producir ácido sulfúrico. Esta habilidad puede ser explotada para la extracción de metales como cobre de depósitos minerales con alto contenido de FeS₂. Microorganismos como *Thiobacillus ferrooxidans* (Herbert 1992), *T. thiooxidans* y *Sulfolobus*

acidocaldarius (Fliermans y Brock 1972) son los responsables de estas aplicaciones. También se han usado para disminuir la cantidad de sulfuro en el carbón con el fin de disminuir las emisiones de sulfuro al quemar éste. Por otro lado se han aislado otras enzimas que trabajan en medio ácido, como son las pululanazas que se utilizan en la degradación de almidón, como la de *Bacillus acidopullulyticus* (Jensen y Norman 1984).

Halófilos.

Los halófilos, como su nombre lo indica, son microorganismos que requieren cantidades de sal que para otros microorganismos son inhibitorias; estos microorganismos se han dividido en dos, 1) moderadamente halófilos que tienen un óptimo de crecimiento a una concentración entre 0.2 y 2.0 M de NaCl como *Rhodothermus marinus* (Alfredsson y col. 1988), y 2) extremadamente halófilos que crecen entre 3.0 y 5.0 M de sal. En este grupo están las halobacterias pertenecientes a las arqueobacterias. La única eubacteria perteneciente a este grupo es *Ectothiorhodospira*, mientras que los eucariotes están representados por *Dunaliella*. Esta alga es una fuente de β -caroteno que posee muchas aplicaciones en el campo de alimentos y es un precursor de vitamina A. Su proteína es similar en composición a la de la harina de soya y ha sido utilizada como alimento para ganado y peces. Debido a su gran tolerancia a la sal, su cultivo tiene bajas probabilidades de contaminación. Como parte de su estrategia para soportar la alta salinidad, *Dunaliella* acumula glicerol (30% p/p), el cual es ampliamente usado en la industria alimentaria, farmacéutica y química. Los halófilos también producen compuestos con actividad biológica, como antibióticos y compuestos antivirales. Por otro lado producen surfactantes y bioemulsificantes con grandes aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria. Microorganismos como *Halobacterium mediterranei* produce un exopolisacárido con excelentes propiedades reológicas, resistente a pH, temperatura y salinidad. Estos polímeros pueden ser utilizados en la industria aceitera como agentes emulsificantes y controladores de movilidad. Otras arqueobacterias como *Haloferax mediterranei* producen bioplásticos que pueden ser una alternativa a los termoplásticos derivados del petróleo. Este poli- β -hidroxialcanoato (PHA) en forma de copolímero de poli- β -hidroxibutirato (PHB) y β -hidroxivalerato (PHV) son producidos por *Alcaligenes eutrophus* bajo el nombre de "Biopol" (ICI). Estos plásticos son fácilmente degradables, sin embargo son muy caros comparados con los convencionales. Otra aplicación interesante es la de búsqueda de antibióticos y drogas antitumorales con el uso de los plásmidos pGRB-1 de una cepa de *Halobacterium* y el plásmido pHVI de *Halobacterium volcanii*. Además, una

proteína de 84 kDa de *Halobacterium halobium* ha sido utilizada para detectar anticuerpos específicos de cáncer usando un análisis de western blot .

De hecho existen otros microorganismos capaces de acumular metales pesados o radionúclidos tomándolos de aguas contaminadas con estos. Esto puede usarse como proceso de extracción o bien como bioremediación. También existen organismos capaces de degradar compuestos orgánicos que resultan tóxicos para otros microorganismos, como el tolueno, que también pueden ser utilizados en la bioremediación (Herbert 1992).

proteína de 84 kDa de *Halobacterium halobium* ha sido utilizada para detectar anticuerpos específicos de cáncer usando un análisis de western blot .

De hecho existen otros microorganismos capaces de acumular metales pesados o radionúclidos tomándolos de aguas contaminadas con estos. Esto puede usarse como proceso de extracción o bien como bioremediación. También existen organismos capaces de degradar compuestos orgánicos que resultan tóxicos para otros microorganismos, como el tolueno, que también pueden ser utilizados en la bioremediación (Herbert 1992).

FALTA PAGINA

No 12..a la.....

CAPITULO 2.

GENERALIDADES SOBRE LIPASAS.

Introducción.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces éster de los triacilglicéridos, liberando ácidos grasos libres y dependiendo de la naturaleza de la lipasa y sus condiciones de actividad, glicerol, mono o diglicéridos con diferencias en las posiciones finales de esterificación (Godtfredsen 1990). Las lipasas actúan en la interfase agua lípido a diferencia de las tradicionales esterasas que hidrolizan el mismo enlace pero el sustrato debe ser soluble en fase acuosa (Derewenda y Sharp 1993). La actividad lipolítica es una función del área de la interfase por unidad de volumen, que se le ha denominado "concentración de interfase". Esta forma de medir la concentración de sustrato refleja la acción de la enzima en una interfase y su necesidad de entrar en la fase acuosa y posteriormente adsorberse en la interfase para interactuar con su sustrato. La actividad lipolítica está mediada en algunas ocasiones por efectores como iones de metales alcalinos o alcalinotérreos, en el caso de la lipasa pancreática porcina, se pueden contar además a las sales biliares y cofactores proteicos (O'Connor y Bailey 1988).

Importancia económica de las lipasas.

Los microorganismos productores de lipasa están ampliamente distribuidos en la naturaleza como podemos ver en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1. Microorganismos productores de lipasa.

MICROORGANISMO	MICROORGANISMO	MICROORGANISMO
<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Myxococcus xantus</i>
<i>Absidia hyalospora</i>	<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Penicillium crustosum</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i>	<i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Phycomyces nitens</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Rhizopus japonicus</i>	<i>Pichia miso</i>
<i>Alcaligenes dinitrificans</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Amylomyces rouxi</i>	<i>Rhizopus niveus</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
<i>Arthrobaacter</i> sp.	<i>Rhizopus nodosus</i>	<i>Proteus</i> sp.
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Rhodotorula pilimonae</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces fragilis</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Fusarium solari</i>	<i>Saccharomyces lipolytica</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Sporotrichum thermophile</i>
<i>Candida auricularia</i>	<i>Humicola insulens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida curvata</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
<i>Candida cylindraceae</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Candida deformans</i>	<i>Leishmania donovani</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>Candida foliorum</i>	<i>Malbrancheae pulcella</i>	<i>Streptomyces fradiae</i>
<i>Candida humicola</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i>	<i>Streptomyces panayensis</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Talaromyces thermophilus</i>
<i>Candida rugosa</i>	<i>Mucor javanicus</i>	<i>Thielavia mino</i>
<i>Candida tsukubaensis</i>	<i>Mucor lipolyticus</i>	<i>Torula thermophila</i>
<i>Chaetomium thermophile</i>	<i>Mucor miehei</i>	
<i>Chromobacterium chocolateum</i>	<i>Mucor pusillus</i>	

Fuente: Godtfredsen (1990), y Hedgedus y Khachatourians (1988).

Las lipasas no han tenido una gran aplicación comercial como las proteasas o carbohidrasas. Esto podría deberse a que las áreas de aplicación industrial de las lipasas no habían sido identificadas y a que la producción de lipasas ha presentado ciertas dificultades técnicas en la escala industrial. Los incrementos en rendimiento por mutagénesis clásica y desarrollo de medios de cultivo han hecho económicamente posible el uso industrial de las lipasas. Sin embargo la mejora determinante en la producción se ha hecho por clonación de los genes de lipasa, más que por aislamiento selectivo, inmutagénesis, desarrollos de medio de cultivo y sistemas de fermentación. Las lipasas comúnmente disponibles y los fabricantes se encuentran en la Tabla 2.2. Entre estas se encuentra la Lipolasa®, así como la lipasa de *Mucor miehei*, ambas producidas en *Aspergillus oryzae* como sistema de expresión (Godtfredsen 1990).

TABLA 2.2. Fuentes industriales de lipasa.

LIPASA	FUENTE
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Alcaligenes</i> sp.	Meito
<i>Arthrobacter</i> sp.	Sumitomi
<i>Aspergillus niger</i>	Amano Novo Röhm
<i>Candida cylindraceae</i>	Amano Enzyme Dev. Co. Meito
<i>Chromobacterium viscosum</i>	US Biochemicals Toyo Jozo
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano Novo
<i>Mucor miehei</i>	Amano Gist Röhm Novo
<i>Phycomyces nitens</i>	Takeda
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
Lipasa	Fuente
<i>Rhizopus</i> sp.	Serva Nagase
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Precibio (Francia) Boehringer Mannheim Rapidase Gist-Brocades
<i>Rhizopus delemar</i>	Chemical Dynamics Tanabe
<i>Rhizopus japonicus</i>	Amano Nagase Osaka Sauken Lab.
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano

Fuente: Godtfredsen (1990).

Aplicaciones de lipasas microbianas.

Existen varias aplicaciones para las lipasas, como la producción de nuevos tipos de triglicéridos con características modificadas, como punto de fusión bajo para las grasas de uso en alimentos sólidos, mediante la transesterificación enzimática de triglicéridos disponibles en presencia de bajas cantidades de agua para que el producto mayoritario de la reacción sea el de transesterificación. Otra aplicación es la síntesis de otros ésteres como los glicosídicos y tioésteres (Godtfredsen 1990). Del mismo modo, cuando se ponen a reaccionar en un solvente orgánico, con mínimo contenido de agua ya que deba existir una fracción finita y pequeña que permanezca unida a la enzima para que ésta

funcione (Miller y col. 1988), producen la esterificación de alcoholes con ácidos grasos; estos compuestos son los responsables de los sabores y aromas en muchos productos, por lo cual este método se ha propuesto para la producción industrial de saborizantes y aromas aplicables a la industria alimentaria (Langrand y col. 1990). La maduración de quesos incluye la hidrólisis de lípidos para la producción de sabores, la cual se ha visto que no es específica en posición pero si preferente en el tamaño de la cadena de ácido graso siendo mejor para cadenas cortas (Kwak y col. 1989). Las lipasas y las esterasas pueden utilizarse para la síntesis estereoquímica de ésteres. Estos ésteres estereoespecíficos son muy útiles en la industria farmacéutica y química (Katz y col. 1993), como por ejemplo el naproxen, cetoprofen y muchos intermediarios tanto de síntesis de medicamentos como de insecticidas y herbicidas (Hou 1993). En la Tabla 2.3 se presenta una revisión de las distintas aplicaciones industriales de las lipasas.

TABLA 2.3. Areas de aplicación industrial de las lipasas microbianas.

INDUSTRIA	EFEECTO	PRODUCTO
Alimentos lácteos	Hidrólisis de grasa de leche Maduración de queso Modificación de mantequilla	Agentes saborizantes Queso Mantequilla
Panadería	Mejora el sabor y prolonga la vida media	Productos de panadería
Bebidas	Mejora el aroma	Bebidas
Condimentos	Mejora la calidad	Mayonesas, condimentos
Complementos alimenticios	Transesterificación	Complementos alimenticios
Cárnicos	Desarrollo de sabor y remoción de grasa	Productos cárnicos.
Grasas y aceites	Transesterificación	Mantequilla de cacao, Margarina
	Hidrólisis	Acidos grasos, glicerol, Mono y diglicéridos.
Química	Enantioselectividad	Bloques quirales y químicos
Farmacéutica	Síntesis Transesterificación	Químicos Lípidos especiales
	Hidrólisis	Digestivos
Cosméticos	Síntesis	Emulsificadores y agentes humectantes
Peletería	Hidrólisis	Productos de peletería
Papelera	Hidrólisis	Productos de papel
Limpieza	Hidrólisis	Removedores de limpieza y agentes surfactantes

Fuente: Bell y Parsons (1975); Godtfredsen (1990); Hou (1993) y Soberón-Chavez y Palmeros (1994).

Caracterización y estudio de lipasas.

Las lipasas han sido caracterizadas de acuerdo a parámetros como el perfil de actividad contra pH, estabilidad y actividad con respecto a la temperatura, especificidad posicional en la hidrólisis de triglicéridos y especificidad por ciertos ácidos grasos. La especificidad posicional es una característica importante para la aplicación industrial y analítica de las lipasas. Las lipasas de *A. niger*, *R. delemar*, *M. miehei* y *H. lanuginosa* poseen especificidad para la hidrólisis de ésteres de glicerol en posición 1,3, mientras que las lipasas como la de *G. candidum* y *P. cyclopium* no muestran especificidad. La lipasa de *G. candidum* ha mostrado especificidad para la hidrólisis de lípidos insaturados mientras que la lipasa de *Fusarium oxysporum* aparentemente prefiere la hidrólisis de ácidos grasos saturados.

Varias lipasas han sido clonadas y secuenciadas y entre ellas están las de *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas fragi*, *Mucor miehei*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* y *H. lanuginosa* en cuanto a las microbianas. Entre las no microbianas que se han estudiado de este modo, tenemos a la lipasa hepática de rata, la lipasa pancreática porcina, la lipasa lipoproteína humana y su enzima relacionada lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT). Una comparación entre estas secuencias se puede ver en la Tabla 2.4. Aparentemente hay un residuo de serina localizado en una región de residuos hidrofóbicos, que se encuentra muy conservada en todos los casos (Godtfredsen 1990 y Derewenda y Sharp 1993).

TABLA 2.4. Homología entre sitios de unión con el sustrato de distintas lipasas.

Lipasa	Aminoácidos													
<i>P. fragi</i>	R	V	N	L	I	G	H	S	Q	G	A	L	T	A
<i>S. aureus</i>	K	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G	Q	T	I
<i>S. hyicus</i>	P	V	H	F	I	G	H	S	M	G	G	Q	T	I
<i>R. miehei</i>	K	V	A	V	T	G	H	S	L	G	G	A	T	A
Lingual de rata	K	I	H	Y	V	G	H	S	Q	G	T	T	I	G
Hepática de rata	K	V	H	L	I	G	Y	S	L	G	A	H	V	S
Páncreas cerdo	N	V	H	V	I	G	H	S	L	G	S	H	A	A
Lipoprot. Humana	N	V	H	L	L	G	Y	S	L	G	A	H	A	A
LCAT Humana	P	V	F	L	I	G	H	S	L	G	C	L	H	L

Fuente: Godtfredsen 1990 y Derewenda y Sharp (1993).

Las lipasas poseen una estructura característica α/β , esto es, una estructura de hoja β -plegada central con hélices α en menor proporción. En las lipasas hasta ahora estudiadas por cristalografía de rayos X, se ha visto que el sitio catalítico está localizado en el carboxilo terminal de la hoja central. El sitio catalítico de las lipasas presenta un residuo de histidina (His) y un residuo ácido como aspartato (Asp) o glutamato (Glu), los que, junto con un residuo de serina

(Ser) que ataca nucleofílicamente el enlace éster de los ácidos grasos durante la catálisis, del mismo modo en que se ha observado que ataca en el caso de las serin-proteasas ya que el enlace peptídico que resulta ser electrónicamente muy similar al enlace éster. Este residuo de serina es activado por el acoplamiento entre los residuos de Asp e His. En las lipasas el residuo de Ser activo es el que se encuentra en la secuencia consenso mencionada anteriormente, aunque el resto de los aminoácidos de la triada catalítica provienen de distintas regiones de la proteína. La serina encontrada dentro del pentapéptido consenso se encuentra en el caso de las lipasas en una conformación ($\phi = 62^\circ$, $\psi = -121^\circ$). Este motivo estructural consiste en una cadena β seguida por un giro rígido que contiene al residuo de serina y en seguida un α hélice, a este motivo se le conoce como β - ϵ Ser- α . El análisis de secuencia de aminoácidos alrededor de residuos de serina activos, indican que este motivo puede constituir la unión estructural que relaciona a las familias de serín-hidrolasas.

En todas las enzimas estudiadas el centro catalítico está por debajo de una o mas vueltas superficiales. En las lipasas esta cubierta consiste en una corta hélice anfipática. Bajo condiciones de inhibición, esta hélice se aleja del sitio activo y a través de la superficie de la molécula moviendo su centro de gravedad 8Å y girando sobre su propio eje casi 180°. Como resultado de este movimiento se expone una gran superficie hidrofóbica de aproximadamente 750Å donde 12 aminoácidos son responsables de la mayor parte, Ile85, Trp88, Ile89, Leu92, Phe94, Val205, Leu208, Phe213, Val254, Leu255, Leu258 y Leu267 para el caso de la lipasa de *Mucor miehei*. Cuando se alinean estos aminoácidos con los otras cuatro lipasas conocidas, se ve que están altamente conservados confirmando así su significancia funcional. La activación de lipasas mayores, como la humana pancreática (hPL), presentan un fenómeno más complejo, ya que éstas poseen cofactores como la colipasa para el caso de la hPL. Estudios estructurales mostraron que la colipasa se une exclusivamente al dominio del carboxilo terminal, no obstante aún no se sabe que cambios conformacionales ocurren durante la adsorción de la enzima en la interfase lípido-agua, dejando a la colipasa en contacto con otras partes de la enzima, incluyendo la cubierta antes mencionada (Derewenda y Sharp 1993).

La medición de actividad lipolítica siempre ha sido controvertida, ya que existen distintos sustratos que se pueden emplear para dicho ensayo, distintas condiciones de reacción como pH y temperatura, así como la disposición del sustrato, esto es las características de la emulsión. Se ha observado que la actividad de una lipasa medida por un solo método no es representativa de la actividad real de la enzima, ya que los sustratos que se usan para el ensayo de

actividad pueden interactuar de manera distinta con la enzima y dependen del proceso que se esté midiendo, no siendo igual para la hidrólisis de lípidos como para la síntesis de ésteres (Vorderwülbecke y col. 1992).

CAPITULO 3.

GENERALIDADES SOBRE AISLAMIENTO SELECTIVO DE MICROORGANISMOS.

Introducción:

Desde la era prehistórica el hombre ha aprovechado a los algunos microorganismos para beneficio propio, sin saber, sin embargo, que los microbios eran el agente causal de dichos beneficios.

TABLA 3.1. Microorganismos y aplicaciones comerciales.

PRODUCTO	MICROORGANISMOS
Amilasa	<i>Bacillus</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.
Celulasa	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.
Lactasa	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Kluyveromyces</i> spp.
Lipasa	<i>Mucor</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.
Proteasa	<i>Bacillus</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.
Renina	<i>Mucor</i> spp.
Acido cítrico	<i>Aspergillus</i> spp.
Etanol	<i>Saccharomyces</i> spp.
Dextranas	<i>Leuconostoc</i> spp.
B 12	<i>Pseudomonas</i> spp.
L-Lisina	<i>Corynebacterium</i> spp.
Antibióticos	<i>Penicillium</i> spp. <i>Streptomyces</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.
Insulina	<i>E. coli</i> (recombinante).
Transformación de esteroides	<i>Arthrobacter</i> spp.

Fuente: Steele y Stowers (1991).

Posteriormente, el descubrimiento de la existencia de los microorganismos y el desarrollo de los métodos de cultivo han tenido por resultado los métodos biotecnológicos modernos, de los cuales se han derivado los métodos tanto de aislamiento de microorganismos de interés como de fermentación y cultivo de los mismos, lo que ha hecho de los microbios una fuente muy importante de productos usados en la vida moderna.

Los microorganismos han sido usados para la obtención de cientos de productos valuados en decenas de billones de dólares en todo el mundo. Los microorganismos que se seleccionan de manera natural son más aceptados por los consumidores, de modo que es más fácil utilizarlos por razones de mercadotecnia. Por esta razón muchas industrias mantienen programas permanentes de aislamiento selectivo con fines de uso en producción. Por otra parte existe la idea de que la diversidad de los microorganismos va a generar en un futuro nuevas tecnologías que impactarán directamente sobre nuestro modo de vida. En la Tabla 3.1 vemos algunos microorganismos y su relación con productos de uso humano.

La selección de microorganismos a nivel industrial se realiza sistemáticamente utilizando un esquema similar al mostrado en la Figura 3.1. El aislamiento selectivo primario es principalmente cualitativo, dando así la oportunidad de probar con una gran cantidad de organismos directa o indirectamente dependiendo de la actividad que se desea evaluar. El aislamiento selectivo secundario es cualitativo y cuantitativo, su objetivo es determinar la actividad precisa de los organismos para verificar producción y degradación de compuestos específicos, y evaluar la producción potencial de los microorganismos identificados como de interés en el paso anterior (Steele y Stowers 1991). Un ejemplo de un programa de aislamiento selectivo de microorganismos es el que realiza Novo Industri A/S., del cual han obtenido microorganismos con actividades enzimáticas de gran interés industrial como la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus*, la cual se ha adaptado bien a las condiciones del proceso de hidrólisis de almidones (pH=4.5 y 60°C) con altos contenidos de amilopectina (polímero lineal de D-glucosa con enlace α -1,4 ramificado con residuos del mismo carbohidrato con un enlace glucosídico α -1,6 cada 20 a 25 residuos de glucosa), donde las α amilasas, β amilasas y glucoamilasas no han mostrado actividad o buena eficiencia de hidrólisis (Jensen y Norman 1984).

Los criterios prácticos para el aislamiento selectivo de microorganismos para la producción de enzimas de interés industrial son los siguientes:

- 1- El aislamiento extensivo se debe entender como una técnica para obtener al organismo más apto.
- 2- El organismo debe producir la enzima con buen rendimiento, en un tiempo relativamente corto y preferentemente en cultivo sumergido.
- 3- El organismo debe crecer y producir la enzima de interés en un medio barato y cuyos componentes estén disponibles en todo momento.
- 4- El organismo debe ser fácilmente eliminado del medio de cultivo una vez realizada la fermentación.
- 5- La enzima debe ser preferentemente extracelular y fácilmente aislable del medio fermentado.
- 6- El microorganismo no debe ser patógeno y preferentemente no estar relacionado filogénicamente con microorganismos patógenos.
- 7- Idealmente el microorganismo no debe producir toxinas u otras sustancias biológicamente activas.
- 8- El organismo debe ser genéticamente estable y no susceptible a bacteriofagos.

Además de estos parámetros, se deben considerar algunas cuestiones como: ¿Qué actividad se requiere? ¿Cuáles son las características precisas de la enzima requerida? ¿Cómo se requiere la enzima y bajo qué condiciones se va a utilizar?

Dentro de este contexto existen una serie de enzimas recientemente aisladas con aplicaciones comerciales actuales y potenciales. Entre ellas encontramos por ejemplo a la termolisina de *B. thermoproteolyticus* que se aplica para la síntesis de Aspartame; la fructosil transferasa de *B. subtilis* que es utilizada para la síntesis de disacáridos no convencionales; la lipasa específica para ácidos grasos de cadena $\Delta 9$ de *Geotrichum candidum*, que se utiliza para el análisis de triacil gliceroles, entre muchas otras. Por otra parte sistemas mas complejos que incluyen a un microorganismo completo han tenido éxito en procesos como la síntesis de acrilamida a partir de acrilonitrilo con una enzima denominada nitrilasa de *Corynebacterium* y *Nocardia* spp. (Cheetham 1987).

Las fuentes de microorganismos más comúnmente usadas son ambientes que ofrecen por sí mismos las presiones de selección que se desean en el organismo objeto, como pueden ser aguas termales, hielos glaciares o desechos industriales, donde las poblaciones de microorganismos se seleccionen fisicoquímicamente (Brock y Darland 1970). En la tabla 3.2 podemos ver algunos ejemplos de aislamiento de microorganismos termófilos. Se ha especulado que menos de 1% de los microorganismos terrestres han sido identificados y caracterizado. Considerando esto como

cierto, existe una enorme posibilidad de descubrir nuevas aplicaciones potenciales en esta enorme biodiversidad. Ejemplos de estas actividades, pueden ser la actividad en hielo, así como la actividad anticongelante (Steele y Stowers 1991).

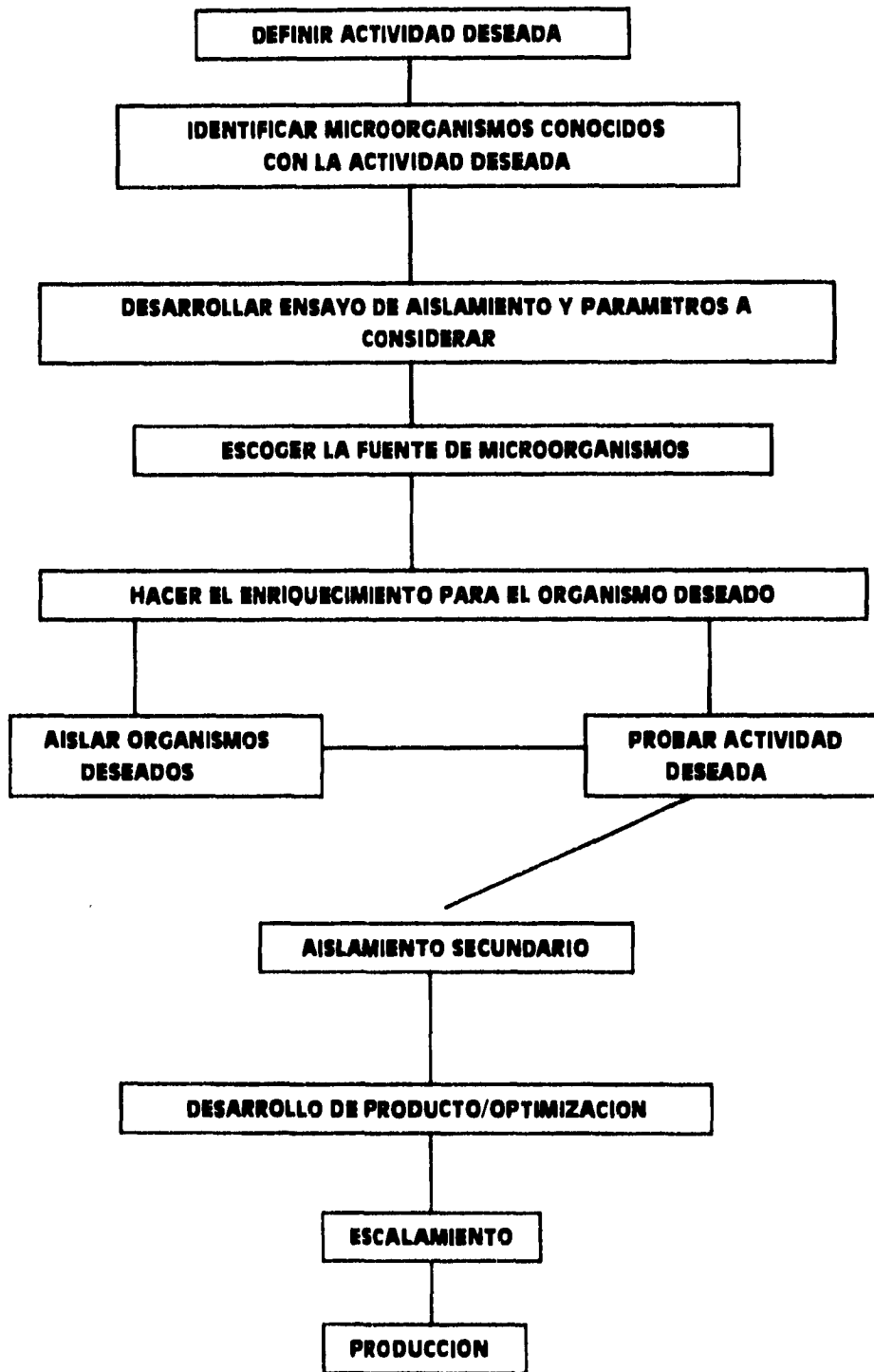


FIGURA 3.1. Esquema general de un programa industrial de aislamiento selectivo de microorganismos (Steele y Stowers 1991).

TABLA 3.2. Fuentes para aislamiento de microorganismos termófilos.

SITIO/SUBSTRATO	MICROORGANISMO
Aguas termales y suelo	
-Extremadamente ácido	<i>Sulfolobus</i> spp. <i>Thermoproteus tenax</i> . <i>Thermoplasma</i> spp. <i>Thermopilum pendens</i> . <i>Thiobacillus</i> spp. <i>Desulfurococcus</i> spp. <i>Dactylaria gallopava</i> .
-Neutral	<i>Thiobacillus</i> spp. <i>Methanothermus fervidus</i> .
-Neutral a alcalino	<i>Thermus</i> spp. <i>Chloroflexus a</i> . <i>Thermomicrobium roseum</i> . <i>Bacillus</i> spp.
Ventilas termales submarinas.	<i>Thermotoga maritima</i> . <i>Methanococcus</i> spp. <i>Pyrodictium</i> spp.
Suelos geotérmicos	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.
Paja, ensilado	<i>Bacillus</i> spp. <i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Faenia reactivirgula</i> . <i>Saccharomonospora viridis</i> . <i>Saccharopolyspora gregorii</i> . <i>Streptomyces</i> spp. <i>Thermomyces</i> spp. <i>Malbranchea cinnamomea</i> .
Bagazo de caña	<i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> . <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> . <i>Thermomyces lanuginosus</i> . <i>Chrysosporium thermophilum</i> . <i>Acremonium thermophilum</i> . <i>Talaromyces</i> spp. <i>Thermoascus</i> spp. <i>Allescheria terrestris</i> .
Cereales	<i>Saccharopolyspora hordei</i> . <i>Faenia reactivirgula</i> . <i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Thermoascus</i> spp. <i>Thermomyces lanuginosus</i> .
Compostas vegetales	<i>Thermoactinomyces</i> sp <i>Clostridium</i> spp
Compostas de hongos	<i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Thermomonospora</i> spp. <i>Scytalidium thermophilum</i>

Compostas municipales	<i>Bacillus stearothermophilus</i> . <i>Thermomonospora</i> spp. Varios hongos.
Aguas negras	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
Aguas negras con otros deshechos	<i>Streptomyces</i> spp.
Estiércol	<i>Clostridium thermocopriae</i> . <i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Thermomonospora</i> spp. <i>Streptomyces</i> spp.
Otro ambiente calentado	
Efluentes de centrales de energía	<i>Dactylaria gallopava</i> .
Agua caliente en procesos	<i>Thermus</i> spp.
Acumulaciones de deshechos de carbón	<i>Dactylaria gallopava</i> . y otros hongos.
Alimentos enlatados	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.
Substrato no calentado	
Tierra	<i>Thermoactinomyces</i> y otros actinomicetos
Turba	<i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Saccharomonospora</i> spp.
Sedimentos de ríos y lagos	<i>Bacillus schlegelii</i> . <i>Methanospirillum</i> sp. <i>Thermoleophilum album</i> . <i>Methanogenum frittonii</i> . <i>Thermoactinomyces</i> spp.
Sedimentos marinos	<i>Methanogenum</i> sp.
Lixiviaciones de Vertedero de una mina de cobre.	<i>Thiobacillus</i> sp.
Polvo casero	<i>Thermoactinomyces</i> spp. <i>Faenia rectivirgula</i> .
Aire	<i>Thermoactinomyces</i> spp. y otros actinomicetos de fuentes vegetales.
Azúcar	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.

Fuente: Lacey (1990).

Por lo expuesto anteriormente, se da a continuación una revisión más profunda de los procedimientos básicos de enriquecimiento y aislamiento selectivo primario. Inmediatamente se proporciona una visión global sobre microorganismos termofílicos, medios y métodos de aislamiento, incubación, mantenimiento y finalmente una reseña de aislamiento experimental de microorganismos lipolíticos y activos a altas temperaturas.

Enriquecimiento.

El concepto de enriquecimiento es algo que no ha variado desde los inicios de la microbiología experimental, sin embargo el uso que se le ha dado, si ha variado. En esencia el enriquecimiento consiste en proporcionar las condiciones adecuadas para que se desarrolle el microorganismo deseado, adicionando de algún modo componentes que inhiban o maten a los microorganismos que pueden estar presentes pero no son deseables. La formulación del medio de cultivo que incluye el uso de una sola fuente de carbono para microorganismos de los que es deseable metabolizar dichos compuestos, así mismo los inhibidores de ciertas rutas específicas y ajustes de pH son las presiones selectivas más empleadas. El uso de una exclusiva fuente de carbono, ha dado por resultado el aislamiento de microorganismos capaces de metabolizar compuestos como hidrocarburos clorados, benceno, anilina y otros compuestos recalcitrantes. De esto se tienen varios ejemplos, como es *Agrobacterium* sp. capaz de degradar EDTA férrico a concentraciones de 100mM. El EDTA es usado como quelante de metales en muchos productos industriales y debido a su recalcitrancia, este tiene una alta demanda de oxígeno al ser un desecho que se encuentra presente en efluentes industriales. Incluso se ha visto que tiene el potencial de utilizarse en aguas de reflujos de reactores nucleares, degradando al EDTA unido a radionúclidos, inhibiendo así su migración del sitio de almacenamiento. Uno de los problemas que puede tener el uso de una sola fuente de carbono, está dado por las bacterias fijadoras de bióxido de carbono. Este problema puede resolverse al poner un indicador exclusivo para los productos del metabolismo de la fuente de carbono.

Algunos microorganismos pueden ser fácilmente aislados, sin embargo otros pueden requerir una selección más intensiva. En ocasiones una población microbiana puede contener un número relativamente pequeño de los microorganismos con el genotipo buscado, pueden exhibir una baja actividad en una enzima particular o pueden estar inhibidos por el compuesto que están intentando degradar. En cualquier caso, los ajustes graduales hacia un quimiostato o cultivo continuo pueden ser usados para obtener un enriquecimiento lento del microorganismo deseado. De este modo se pueden seleccionar pequeñas poblaciones de microorganismos y/o explotar las mutaciones del resto de la población. Este método es muy tedioso, requiriendo incluso varios meses de cultivo continuo pero puede ser por otra parte, la técnica más efectiva en ciertos casos.

La manipulación del pH ha dado frutos como lo son el aislamiento de organismos capaces de crecer en valores extremos de pH. El medio alcalino, se utiliza rutinariamente para aislar bacterias alcalofílicas. Los microbios que producen enzimas hidrolíticas activas en pH alcalino tienen un enorme potencial de uso industrial como son las formulaciones de detergentes para lavandería, producción de pulpas y papel, y en el procesamiento de alimentos. Dentro de las enzimas con actividad alcalofílica se han encontrado proteasas (Durham y col. 1987), amilasas, lipasas (Watanabe y col. 1977), celulasas (Fukumori y col. 1985) y xilanasas. Para cualquier ensayo de aislamiento selectivo es necesario comprender ciertos requerimientos metabólicos y fisiológicos. Cuando se encuentra presente un sistema de lanzadera de Na/H, el crecimiento de ciertos alcalófilos obligados dependerá de la presencia del ion sodio en el medio de cultivo. Pueden presentarse requerimientos similares para obtener desarrollo cuando se está empleando una única fuente de carbono. Una deficiencia de Ca requerido para la estabilidad de ciertas proteasas, puede dar por resultado un falso negativo durante un aislamiento selectivo. Incluso se ha visto que diferentes géneros microbianos pueden predominar en enriquecimientos provenientes del mismo ambiente, en el mismo medio y al mismo pH sólo por cambiar el sistema de amortiguamiento.

Los parámetros físicos como la temperatura pueden ser manipulados para aislar organismos psicrófilos o termófilos. Las enzimas que poseen actividad a altas temperaturas tienen mucha demanda a nivel industrial. Estas enzimas se utilizan para procesos de conversión en la industrialización de frutas y vegetales, almidones, y la reducción estereoespecífica de alcoholes. Uno de los problemas en el aislamiento de microorganismos termófilos es la ineficiencia del agar para gelificar a altas temperaturas, lo cual se ha solucionado con el uso de goma gelana, producida por *Pseudomonas* sp. cuyo nombre comercial registrado es Gelrite (Steele y Stowers 1991).

Aislamiento selectivo primario.

Como se dijo anteriormente, la selección primaria de microorganismos es de fundamental importancia. De su rapidez, versatilidad y eficiencia depende el éxito del programa de aislamiento. La base del aislamiento primario es el método de análisis que nos ayude al aislamiento en base a la característica deseada. De esta forma podemos tener métodos directos (en los que detectamos específicamente el producto que deseamos obtener) o indirectos, como son aquéllos

en que se deben acoplar técnicas analíticas como la espectrofotometría, fluorometría, cromatografía y otras para detectar el producto de una reacción enzimática.

Métodos indirectos. Los principios de cualquier método para un aislamiento selectivo primario deben ser especificidad y facilidad. Como ejemplos encontramos los comúnmente usados para la detección de enzimas hidrolíticas como amilasas y proteasas. En los dos casos anteriores se producen zonas de identificación inmediata de la actividad de la enzima (por hidrólisis de caseína se produce una zona translúcida y la hidrólisis de almidón se puede detectar agregando yodo en solución al medio). En algunos casos, la sensibilidad o especificidad son inadecuados. La detección de lipasa presenta un problema particular debido a la aparente falta de especificidad en las lipasas conocidas así como con la distinción entre lipasas verdaderas y esterases. Comúnmente se utiliza tributirina como sustrato para detectar la actividad lipolítica no obstante que no es específico para las lipasas; su uso es debido a la facilidad que presenta para dispersarse en un medio acuoso, más que la trioleína que sería un sustrato más adecuado. Los tweens también son usados como sustratos. Algunos métodos de detección de lipasa dependen de la reacción de los ácidos grasos liberados con iones calcio presentes en el medio para formar un precipitado, sin embargo si el organismo utiliza eficientemente estos ácidos grasos se pueden presentar falsos negativos. Por ello la detección de lipasa sigue siendo un problema resuelto parcialmente. Las reacciones colorimétricas o fluorométricas nos permiten la detección rápida de productos microbianos tanto en agar como en caldo de cultivo.

Bioensayos. Los bioensayos han sido desarrollados y utilizados para la selección de microorganismos con actividades antitumorales o antibióticas. Se utilizan además para la detección de nuevos compuestos, aumentando la eficiencia de esta labor significativamente. Otra área de aplicación de los bioensayos es la detección de actividad insecticida, como en el caso de nikkomicinas, milbemicinas, tetranactina y avermectinas.

Métodos directos. En la selección de microorganismos, los métodos directos son muy empleados, esto es debido a que su alta especificidad y sensibilidad lo hacen tanto más costoso, como más tardado, por lo cual su uso se restringe a poblaciones relativamente pequeñas como las que se someten a la selección secundaria. Durante este proceso se

en que se deben acoplar técnicas analíticas como la espectrofotometría, fluorometría, cromatografía y otras para detectar el producto de una reacción enzimática.

Métodos indirectos. Los principios de cualquier método para un aislamiento selectivo primario deben ser especificidad y facilidad. Como ejemplos encontramos los comúnmente usados para la detección de enzimas hidrolíticas como amilasas y proteasas. En los dos casos anteriores se producen zonas de identificación inmediata de la actividad de la enzima (por hidrólisis de caseína se produce una zona translúcida y la hidrólisis de almidón se puede detectar agregando yodo en solución al medio). En algunos casos, la sensibilidad o especificidad son inadecuados. La detección de lipasa presenta un problema particular debido a la aparente falta de especificidad en las lipasas conocidas así como con la distinción entre lipasas verdaderas y esterases. Comúnmente se utiliza tributirina como sustrato para detectar la actividad lipolítica no obstante que no es específico para las lipasas; su uso es debido a la facilidad que presenta para dispersarse en un medio acuoso, más que la trioleína que sería un sustrato más adecuado. Los tweens también son usados como sustratos. Algunos métodos de detección de lipasa dependen de la reacción de los ácidos grasos liberados con iones calcio presentes en el medio para formar un precipitado, sin embargo si el organismo utiliza eficientemente estos ácidos grasos se pueden presentar falsos negativos. Por ello la detección de lipasa sigue siendo un problema resuelto parcialmente. Las reacciones colorimétricas o fluorométricas nos permiten la detección rápida de productos microbianos tanto en agar como en caldo de cultivo.

Bioensayos. Los bioensayos han sido desarrollados y utilizados para la selección de microorganismos con actividades antitumorales o antibióticas. Se utilizan además para la detección de nuevos compuestos, aumentando la eficiencia de esta labor significativamente. Otra área de aplicación de los bioensayos es la detección de actividad insecticida, como en el caso de nikkomicinas, milbemicinas, tetranactina y avermectinas.

Métodos directos. En la selección de microorganismos, los métodos directos son muy empleados, esto es debido a que su alta especificidad y sensibilidad lo hacen tanto más costoso, como más tardado, por lo cual su uso se restringe a poblaciones relativamente pequeñas como las que se someten a la selección secundaria. Durante este proceso se

eliminan falsos positivos y negativos. La instrumentación que se usa en esta etapa es radicalmente distinta a la usada en un inicio. Se usan técnicas como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía de Gases, Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear y otras que se distinguen igualmente por su rapidez, selectividad y sensibilidad (Steele y Stowers 1991).

Microorganismos termófilos.

Los microorganismos termófilos se definen como aquéllos capaces de crecer a altas temperaturas, superiores a 40°C generalmente. Dentro de este género encontramos tiobacilos acidófilos, bacterias fotosintéticas púrpura, algas verde-azules, así como actinomicetos, hongos, diatomeas, algas verdes eucariotes, entre otros. La definición de "termofilia" siempre ha causado controversia y puede diferir dependiendo de la clase taxonómica de que estemos hablando. Esta dificultad para determinar la termofilia esta dada porque en la mayoría de los grupos taxonómicos, existen una serie de relaciones de temperatura y desarrollo que pueden caer desde la psicofilia hasta la termofilia, como en el caso de *Aspergillus fumigatus*, hongo que se desarrolla en un rango de 10 a 50°C. En 1964 Cooney y Emerson definieron a los "hongos termófilos" como aquéllos capaces de crecer en un rango de temperatura entre 20 y 50°C o muy aproximado a esto. En este mismo año, Crisan usó el criterio de temperatura óptima de crecimiento, proponiendo el valor de 40°C para la misma definición. Castenholz en 1969 propuso que para que una cianobacteria fuese considerada como termofílica, parte o todo el rango de crecimiento de ésta debía estar alrededor de 45°C; para los actinomicetos Henssen propuso que el mínimo de desarrollo debía estar cerca de 28°C y el óptimo en 50°C aproximadamente. Brock en 1986 mostró que existían termófilos extremos que pueden tener temperaturas óptimas de crecimiento de 70 y hasta 105°C. Tenemos entonces que los límites superiores de crecimiento para hongos es de 60 a 62°C; para algas de 55 a 60°C; para cianobacterias y bacterias fotosintéticas de 70 a 73°C; para eubacterias alrededor de 90°C (Lacey 1990) y para arqueobacterias 110°C (Fischer y col. 1983).

Elección del medio de aislamiento para microorganismos termofílicos.

Se han utilizado un gran número de sustratos para microorganismos termofílicos, sin embargo la variedad es menor que la usada para el aislamiento selectivo de mesófilos específicos. La selección se ha visto obstaculizada por la falta

de observación crítica. El uso de quitina coloidal para el aislamiento de *Streptomyces* spp., ya que se consideraba que todos los microorganismos de este genero podian degradar quitina, fue un error ya que posteriormente se demostró que sólo el 25% de las cepas que se estudiaron hidrolizaban fuertemente quitina. De la misma forma para eliminar bacterias Gram-negativas se utilizaba 4.6% de NaCl (p/v), sin embargo también inhibían a algunas especies de *Streptomyces* y *Thermoactinomyces*. De este modo la concentración de sal puede usarse para aislar diferencialmente a varios géneros de microorganismos marinos y halofílicos. Las bases de datos existentes de estudios de taxonomía numérica tanto de actinomicetos como de bacterias, ofrece la posibilidad de un desarrollo racional de medios de cultivo. Así se puede tener información extensiva sobre utilización de carbohidratos, fuentes de nitrógeno, degradación de ciertos substratos, tolerancia a antibióticos y otros inhibidores, así como otros requerimientos fisiológicos o tolerancias para microorganismos particulares. Algunos ejemplos de estos desarrollos se pueden ver en la Tabla 3.3. La mayoría de las bacterias termofílicas requieren de factores de crecimiento. Estos pueden ser dados por extracto de levadura, triptona, peptona u otros substratos complejos. Pero pueden existir requerimientos más específicos, los cuales pueden ser cubiertos por otros nutrimentos. De este modo microorganismos auxótrofos que requieren ácidos glutámico y aspártico, se pueden desarrollar en ácido aspártico con isoleucina y prolina o bien en biotina, ácido fólico y ácido *p*-aminobenzoico. El constituyente activo del extracto de levadura que permite el desarrollo del género *Thiobacillus* es la cisteína según demostró Brierly en 1978. Para *Clostridium thermocellum*, la biotina, piridoxamina, vitamina B₁₂ y el ácido *p*-aminobenzoico son requeridos en medios definidos mientras que la metionina puede ser substituir a la vitamina B₁₂ o al ácido *p*-aminobenzoico, pero no a ambos simultáneamente (Lacey 1990).

TABLA 3.3. Agentes selectivos usados en el aislamiento de actinomicetos y géneros relacionados.

Agente selectivo.	Taxa seleccionado	Referencia.
Nutricional		
Adenina	<i>Saccaropolyspora</i>	McGregor-Patterson, 1987
Hipurato y NaCl	<i>Faenia reactivirgula</i>	Mattison-Rose, 1986
Rafinosa e histidina	<i>Streptomyces cyaeus</i> , <i>S. rochei</i> , <i>S. diastaticus</i>	Goodfellow y Williams, 1986
Antimicrobiano		
Benomil	Mucoraceae	Tansey, 1984
Dihidroximetilfuratriazina	<i>Microtetraspora</i>	Tomita y col., 1980
Kamamicina	<i>Thermomonospora</i>	McCarty y Cross, 1981
Nitrofurazona	<i>Streptomyces</i>	
Novobiocina	<i>Thermoactinomyces</i>	Cross, 1968
Penicilina y NaCl	<i>Streptomyces</i>	Mackay, 1977
Penicilina y polimixina	Actinimicetos	Williams y Davies, 1965
Polimixina	Actinimicetos	Dulaney y col., 1955
Rifampicina	<i>Saccharomonospora</i> <i>Thermomonospora</i>	Athalye y col., 1981
Rubomicina	<i>Actinomadura</i>	Lavrova y col., 1972
Estreptomocina	<i>Actinomadura</i>	Lavrova, 1971

Fuente: Lacey (1990).

El agar es el método tradicional para solidificar medios, pero su uso es limitado a altas temperaturas ya que de 95 a 100 °C se funde nuevamente. Es satisfactorio su uso hasta temperaturas de 65 a 70°C si se incrementa su concentración de 2 a 4%, pero a pH extremo (< 5 o > 9) se hidroliza a altas temperaturas. Además algunas especies como *Clostridium thermoaceticum*, no crece bien en altas concentraciones de agar. Por estas razones se han probado varios substitutos como κ-carragenina (Sigma) como sal de potasio al 2 o 2.5 %, que forma un gel rígido que solidifica a 55°C. Sin embargo su temperatura de uso no es mayor de 70°C. De esta modo se han probado también almidón, sílica gel, goma gelana solidificada en presencia de calcio o magnesio, en temperaturas de 80 a 88, 60 y 100°C respectivamente con buenos resultados (Lacey 1990). No obstante, el agar ha dado buenos resultados en el aislamiento de microorganismos termófilos como *Rhodothermus marinus*, aislado en aguas termales submarinas (Alfredsson y col. 1988) y *Thermus aquaticus*, un microorganismo extremadamente termófilo para el cual se requirió un medio líquido para enriquecimiento, aunque en principio también crece en agar a 75°C (Brock y Freeze 1969).

TABLA 3.3. Agentes selectivos usados en el aislamiento de actinomicetos y géneros relacionados.

Agente selectivo.	Taxa seleccionado	Referencia.
Nutricional		
Adenina	<i>Saccaropolyspora</i>	McGregor-Patterson, 1987
Hipurato y NaCl	<i>Faenia reactivirgula</i>	Mattison-Rose, 1986
Rafinosa e histidina	<i>Streptomyces cyaeus</i> , <i>S. rochei</i> , <i>S. diastaticus</i>	Goodfellow y Williams, 1986
Antimicrobiano		
Benomil	Mucoraceae	Tansey, 1984
Dihidroximetilfuratriazina	<i>Microtetraspora</i>	Tomita y col., 1980
Kamamicina	<i>Thermomonospora</i>	McCarty y Cross, 1981
Nitrofurazona	<i>Streptomyces</i>	
Novobiocina	<i>Thermoactinomyces</i>	Cross, 1968
Penicilina y NaCl	<i>Streptomyces</i>	Mackay, 1977
Penicilina y polimixina	Actinimicetos	Williams y Davies, 1965
Polimixina	Actinimicetos	Dulaney y col., 1955
Rifampicina	<i>Saccharomonospora</i> <i>Thermomonospora</i>	Athalye y col., 1981
Rubomicina	<i>Actinomadura</i>	Lavrova y col., 1972
Estreptomycin	<i>Actinomadura</i>	Lavrova, 1971

Fuente: Lacey (1990).

El agar es el método tradicional para solidificar medios, pero su uso es limitado a altas temperaturas ya que de 95 a 100 °C se funde nuevamente. Es satisfactorio su uso hasta temperaturas de 65 a 70°C si se incrementa su concentración de 2 a 4%, pero a pH extremo (< 5 o > 9) se hidroliza a altas temperaturas. Además algunas especies como *Clostridium thermoaceticum*, no crece bien en altas concentraciones de agar. Por estas razones se han probado varios substitutos como κ-carragenina (Sigma) como sal de potasio al 2 o 2.5 %, que forma un gel rígido que solidifica a 55°C. Sin embargo su temperatura de uso no es mayor de 70°C. De esta modo se han probado también almidón, sílica gel, goma gelana solidificada en presencia de calcio o magnesio, en temperaturas de 80 a 88, 60 y 100°C respectivamente con buenos resultados (Lacey 1990). No obstante, el agar ha dado buenos resultados en el aislamiento de microorganismos termófilos como *Rhodothermus marinus*, aislado en aguas termales submarinas (Alfredsson y col. 1988) y *Thermus aquaticus*, un microorganismo extremadamente termófilo para el cual se requirió un medio líquido para enriquecimiento, aunque en principio también crece en agar a 75°C (Brock y Freeze 1969).

Tratamientos para el sustrato y procedimientos de enriquecimiento para microorganismos termofílicos.

Tanto los tratamientos como los procedimientos de enriquecimiento difieren un poco en principio, no obstante que su fin es el mismo, un incremento en la proporción de los microorganismos de interés en el sustrato. Esto es, se le proporcionan al microorganismo las condiciones nutricionales y de incubación que seleccionen al microorganismo o bien inhiban a sus competidores. Los tratamientos al sustrato se aplican a éste antes de la preparación del medio, mientras que en los procedimientos de enriquecimiento, el sustrato se adiciona al medio de cultivo.

Tratamientos al sustrato. Estos se pueden dividir en aquéllos en que el sustrato se pone directamente en el medio de cultivo y en los que el sustrato se trata previamente con nutrientes y/o se incuba previamente a temperaturas favorables para el organismo que se desea aislar o desfavorables para sus competidores.

-Incubación previa: El aislamiento selectivo de hongos y levaduras frecuentemente se ha auxiliado por la incubación del sustrato natural en cámaras húmedas, utilizando preferentemente temperaturas de 50°C ya que a 40°C los organismos aislados usualmente no son termofílicos mientras que a 50°C se obtienen termofílicos hasta en un 85% de las ocasiones.

-Mejoramiento del sustrato: Este tratamiento ha sido utilizado para mejorar poblaciones de hongos, levaduras y actinomicetos termofílicos. En 1976 Tensey y Jack suplementaron muestras de suelo con 1% (p/p) de polvo de celulosa, cera de Carnauba, quitina no blanqueada, una mezcla de queratina, lactosa con gentamicina, almidón soluble o lignina. Esto se incubó a 50°C con agua estéril suficiente para mantener la humedad. Sólo la muestra con celulosa mostró una mejora sobre el suelo no mejorado, pero sólo una especie (*Talaromyces emersonii*) fue aislada de esta muestra y no se encontró en las muestras no tratadas. La adición de sales de Czapek, 0.1% de extracto de levadura, 100 U/ml. de penicilina G y 100 U/mL de estreptomycinina a astillas de madera producen un desarrollo más abundante de termófilos a 50°C que las astillas que sólo contenían agua. Sin embargo se ha visto que los materiales orgánicos que se han usado para el mejoramiento del sustrato no son necesariamente específicos para termófilos.

-Tratamientos térmicos: El aislamiento de actinomicetos poco comunes o de crecimiento lento ha sido comúnmente bloqueado por la abundancia de *Streptomyces* spp. y otras bacterias que crecen más rápidamente. Sin embargo las esporas de varios actinomicetos son resistentes al calor y la desecación, y esta característica ha sido usada para

optimizar se aislamiento. En 1965 Nüesch y Agate mientras que en 1967 Bhat, encontraron que el secado por aire de muestras de suelo o su calentamiento de 50 a 60°C incrementaban las poblaciones de, respectivamente, estreptomicetos mesófilos y termófilos en relación con otras bacterias. Nonomura y Ohara en 1969, encontraron que un tratamiento térmico drástico de 100 a 120°C durante una hora reducía enormemente la cantidad de bacterias y permitía el aislamiento de microorganismos poco comunes de crecimiento lento como *Microbispora* y *Streptosporangium* spp., ambos mesófilos y termófilos. Se aislaron más mesófilos cuando el tratamiento fue de 100°C que cuando fue de 120°C, y viceversa para los termófilos. En otros estudios se ha recomendado el tratamiento de la muestra por 30 minutos a 80°C para el aislamiento selectivo de organismos capaces de oxidar metano y formar exoesporas.

-Otros tratamientos: El hipoclorito de sodio y el etanol han sido usados para mejorar el aislamiento de hongos y levaduras termófilos. No obstante nunca se ha aislado un termófilo tras 5 minutos de tratamiento con hipoclorito de sodio al 5% mientras que las muestras de suelo tratadas con alcohol al 70% presentaron sólo un microorganismo más de los que se podían aislar de muestras no tratadas. Esto funciona para organismos de esporas grandes que es difícil remover.

-Adición directa al medio de cultivo: La adición directa de la muestra al medio de cultivo es una de las técnicas más comúnmente empleadas para el aislamiento de microorganismos termofílicos. Las muestras se pueden mezclar con agar fundido en una caja de Petri o puede ser dispersado en la superficie de las cajas preparadas. Para realizar estas técnicas es necesario dominar las técnicas básicas de laboratorio de microbiología.

Procedimientos de enriquecimiento. El enriquecimiento se ha utilizado para el aislamiento de bacterias y rara vez para hongos, levaduras y actinomicetos. La selectividad de este enriquecimiento depende de muchos factores, como son los nutrientes, pH, aereación, fuerza iónica, temperatura, periodo de incubación (especialmente en cultivos por lotes), factor de dilución (en cultivos de flujo continuo) y para algunos organismos la iluminación. Hongos y levaduras termófilos capaces de degradar lignina han sido enriquecidos botellas conteniendo 1g de muestra y 30 mL de medio con lignina suplementado con sulfato de gentamicina e incubado a 50°C. Las colonias filamentosas aisladas se sembraron en el mismo medio pero sin glucosa. Posteriormente se sembraron en otro medio con 2% de agar

para purificación e identificación. En 1957 Henssen aisló actinomicetos termofílicos incluyendo a varias especies nuevas a partir de estiércol en condiciones aerobias y anaerobias. El desarrollo se obtuvo en tiras de papel filtro humedecidas con una solución nutritiva que estaba contenida en tubos dentro de un contenedor tubular con 30 mL de una solución de pirogalol al 20% con 30 mL de NaOH al 20% para absorber el oxígeno. Se incubó de 50 a 60°C.

Durante muchos años se consideró a *Bacillus stearothermophilus* como el modelo de bacteria termofílica. La metodología de aislamiento de ésta era variada con una temperatura de incubación común de 55°C. Sin embargo hoy en día se conocen muchas bacterias termofílicas que crecen incluso a 110°C. Las bacterias que crecen en estas condiciones se conocen como arqueobacterias (Fischer y col. 1983). También se han encontrado termoplasmas. En estudios recientes en aguas termales del Parque Nacional Yellowstone y Oregon en los Estados Unidos se ha utilizado medio D (composición en Tabla 3.4) o pequeñas variaciones de éste. Castenholz en 1981 ha recomendado que el medio debe ser diluido aproximadamente a 1 parte de inóculo por 20 partes de medio e incluir una cantidad del agua natural de donde se efectuó el aislamiento para evitar un estresamiento de los microorganismos nativos. Estas muestras pueden ser almacenadas en la oscuridad de 10 a 20°C durante varias semanas. El enriquecimiento puede realizarse en matraces Erlenmeyer con un tapón que permita la aireación. Incluso se pueden utilizar tubos, pero se obtienen desarrollos lentos debido a la reducida área de absorción de CO₂. La incubación de estas muestras debe hacerse entre 50 y 70°C, dependiendo de la especie o fenotipo de interés en oscuridad o luz de algún tipo en especial. No se conoce ninguna especie de cianobacteria que crezca a 75°C. En ausencia de aire se puede agregar NaHCO₃ o Na₂CO₃ como fuente de carbono. Las cianobacterias y en general microorganismos de ambientes salinos pueden requerir la adición de 2 a 3% de NaCl al medio. El medio "D" suplementado con 0.1% de triptona y 0.1% de extracto de levadura, ha sido utilizado para aislar *Thermus* spp. de aguas termales.

TABLA 3.4. Composición del medio "D".

Aguadestilada	1000mL	Sol. de micronutrientes	
Acido nitroacético	0.1g	Agua destilada	1000mL
Sol. de micronutrientes	0.5mL	H ₂ SO ₄ conc.	0.5mL
Sol. de FeCl ₃ (0.29g/L)	1.0mL	MgSO ₄ ·H ₂ O	2.28g
CaSO ₄ ·H ₂ O	0.06g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.50g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025g
NaCl	0.008g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025g
KNO ₃	0.10g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.045g
NaNO ₃	0.70g		
Na ₂ HPO ₄	0.11g		

Fuente: Lacey (1990).

Dentro de las bacterias termofílicas que pueden ser aisladas en condiciones aerobias, se encuentran las que capaces de utilizar hidrocarburos que forman endoesporas y las que no forman esporas, clasificadas como *Bacillus* y *Thermoleophilum* respectivamente (Lacey 1990) y dentro de los utilizadores de sulfato están *Thiobacillus* (Fliermans y Brock 1972) y *Sulfolobus* (De Rosa y col. 1975).

Preparación y tratamiento de suspensiones. Lo más usual es preparar diluciones de 1:10 o 1:100 del sustrato original, o bien preparar diluciones logarítmicas. Se han utilizado varios tipos de diluyentes, pero entre las que han dado mejores resultados están la solución Ringer de 1/4 de fuerza con 2% de inositol; solución de peptona bacteriológica al 0.1% con 2% de inositol y 0.05% de Tween-80; y solución acuosa de agar al 0.2%. La dispersión de la materia se debe alcanzar por trituración mecánica en un mortero o por agitación, por vibración sónica u homogeneización. Sin embargo durante la dispersión se observan efectos adversos, principalmente la destrucción del sustrato y la destrucción de los microorganismos. El método común de agitar el sustrato y muestrear con pipeta tiene enormes variaciones. Ningún método garantiza una toma de muestra gravimétricamente homogénea, no obstante la agitación en un agitador magnético de una solución viscosa, ya sea con 0.2% de agar o 1.0% de carboximetilcelulosa en la solución, presenta mejores resultados. La agitación continua produce mayores cuentas en placa.

La filtración, centrifugación en gradientes de densidad con CsCl, el intercambio iónico, el calentamiento, tratamiento con fenol y cloro, y separación de fase, han sido tratamientos que se les da a las suspensiones de microorganismos de manera ordenada, para concentrar células, separar células de partículas de suelo, inactivar microorganismos de

especies predominantes o separar diferentes grupos de microorganismos. Así la filtración en membrana se usa en la industria azucarera para el conteo de termófilos como *Bacillus stearothermophilus*, *B. coagulans*, *Desulfotomaculum nigrificans* y *Clostridium thermohydrosulfuricum*. El gradiente de densidad en CsCl o Percoll (sílica sol-polivinilpirrolidina), se ha usado para separar bacterias y actinomicetos. Después de una Centrifugación de 173500g durante 17 horas a 4°C se obtuvo un gradiente de densidad en un tubo donde se aislaron *Mycromonospora* en la banda de 1.35 a 1.42 g/mL, mientras que *Bacillus* se aisló en la banda de 1.25 a 1.30 g/mL y *Streptomyces* se encontró en la banda de 1.15 a 1.35 g/mL. Los sistemas bifásicos se han usado para la separación y concentración de esporas. Los tratamientos térmicos antes o después de inocular placas de agar se utilizan también para la selección de microorganismos, utilizando 110°C durante 10 minutos.

Inoculación en placa. La inoculación se puede realizar en cajas Petri mezclando la suspensión con agar fundido o bien esparciendo la suspensión en la superficie de las placas de agar previamente solidificadas.

El cubrir la superficie del agar con un filtro de membrana es usado para el aislamiento de actinomicetos y es la base para el aislamiento de *Faenia rectivigurla*, importante en la enfermedad pulmonar de granjeros. Las suspensiones de esporas se dispersan en un filtro de membrana de éster de celulosa con un diámetro de 9.0 cm, con poros de 0.20 a 0.45 µm. Los filtros se incuban con el agar durante 5 a 7 días a 55°C para que el micelio de los actinomicetos crezca y pueda atravesar la membrana hacia el agar mientras que las bacterias se quedan en la superficie del filtro. Al cabo de este período se retira el filtro y se reincuba para que se obtenga desarrollo del micelio que logró crecer a través de los poros del filtro (Lacey 1990).

Incubación.

La incubación a altas temperaturas puede provocar la desecación del agar que dado el momento puede inhibir el desarrollo de microorganismos. Por ello es esencial mantener una alta humedad en los alrededores de las placas, ya sea colocando recipientes con agua dentro de la incubadora, sellando las cajas con Parafilm o encerrando las cajas en bolsas de polietileno o desecadores sellados con agua en el interior. Para algunas especies se requiere además una mezcla especial de gas. Se pueden utilizar incubadoras de aire caliente en un amplio rango de temperaturas, hasta de

100°C o mayores. Los baños de agua se pueden usar hasta 75°C, ya que en adelante se requieren dispositivos que impidan la rápida evaporación de agua, o bien usar líquidos de mayor punto de ebullición como glicerol, aceite o parafina líquida. Alrededor de 100 °C se pueden usar baños eléctricos de arena si su temperatura puede ser lo suficientemente bien controlada. A estas temperaturas la presión del sistema debe elevarse de 1 a 3 atm para elevar la solubilidad de los gases en el medio. Por arriba de 100°C el agua sólo puede usarse bajo presión, 5 lb/in² (Lacey 1990).

Mantenimiento.

Para el almacenamiento a corto plazo se pueden conservar las cepas a temperaturas ambientales o de refrigeración para la mayoría de los microorganismos. Para los microorganismos anaerobios, un ajuste de pH es necesario para mantener su viabilidad. Los organismos capaces de formar esporas se pueden conservar en glicerol >60% a -20 o -70°C. Los métodos estándar de conservación a largo plazo se pueden usar también, como el almacenamiento en nitrógeno líquido o liofilización de las cepas (Lacey 1990).

Aislamiento selectivo de microorganismos lipolíticos y activos a altas temperaturas.

El aislamiento selectivo de microorganismos se realiza normalmente en cultivos por lote, de manera alternativa se puede realizar un aislamiento en cultivo continuo. Es necesario aplicar una presión de selección adecuada a las condiciones de trabajo que se desean en los microorganismos seleccionados. Las lipasas son enzimas que hidrolizan triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres, fuentes de carbono y energía de fácil asimilación para los microorganismos. Por ello es obvio pensar que la fuente de carbono en un cultivo continuo para seleccionar microorganismos lipolíticos sean lípidos. Por este método se han logrado aislar bacterias como *Pseudomonas alcaligenes* y *Enterobacter intermedium* entre otras. Un sistema de cultivo continuo empleado consiste en un fermentador que contiene un medio de cultivo sintético sin fuente de carbono, la cual se encuentra en una columna externa por la que se hace circular el medio de cultivo para que los microorganismos tuvieran acceso a la fuente de carbono y obtener así un enriquecimiento (Lie y col. 1991). Se han aislado varias bacterias lipolíticas en Estados Unidos e Inglaterra, partiendo de diversos sustratos de temperaturas altas, como son las aguas termales y compostas.

Estas muestras fueron enriquecidas previamente con la adición de aceite de oliva. La temperatura de estos lugares varió entre 42 y 91°C, excepto las colectadas en aguas termales americanas, que variaron de 45 a 88°C. Sus metodologías de aislamiento variaron entre muestras, pero el criterio de selección siempre fue la clarificación de una placa de agar con 0.1% de aceite de oliva emulsificado. Con este trabajo se aislaron más de 140 cepas potencialmente lipolíticas, sin descartar que se tengan aislamientos no independientes entre ellos (Gowland y col. 1987). También en las aguas termales de Bulgaria se han aislado bacterias termofílicas productoras de lipasa. Las condiciones de estos sitios variaron entre 42 a 80°C y pH de 6.0 a 8.5. Para este trabajo se utilizó un sistema de cultivo continuo como el usado por Lie y col. en 1991. De este trabajo se obtuvo una cepa de *Bacillus* sp. termoalcalofílica denominada MC7 cuya lipasa mostró una actividad máxima a 60°C y pH=8.5. Mostró además termorresistencia a 70°C conservando el 100% de su actividad y teniendo una vida media de 3 h. Estas pruebas hacen aparecer a esta enzima mucho más termoestable que la de *Pseudomonas fragi* 22.39 B así como la de *Alcaligenes* sp cepa N 679 y sólo un poco menos que la de *Pseudomonas* sp. KWI-56 considerando que esta no es alcalofílica (Emanuilova y col. 1993).

CAPITULO 4.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

Justificación.

Una de las metas de los estudios científicos es elevar la eficiencia de los procesos de producción de bienes de consumo. En este campo se ha visto que las enzimas termoestables juegan un papel fundamental en varios procesos y sus aplicaciones no han sido exploradas en su totalidad.

El estudio y uso de las lipasas se está extendiendo dadas las aplicaciones potenciales de estas enzimas en diferentes industrias así como en investigación, aumentando de este modo su importancia económica. Por otra parte las lipasas termoactivas y en general las que son capaces de presentar actividad en ambientes extremos han cobrado importancia industrial ya que sus características las hacen más adecuadas para los procesos industriales que generalmente requieren condiciones desnaturalizantes para la mayoría de las enzimas.

Existen varias lipasas en el mercado, casi todas son fungales y esto alarga sus tiempos de producción, por lo que una lipasa bacteriana, que generalmente se produce más rápido, podría eventualmente competir en este mercado. De hecho existen varias lipasas bacterianas como las de *Pseudomonas* (Watanabe y col., 1977; Gilgert y col. 1991; Lie y col. 1991; Palmeros, B. y col., 1994), pero éstas presentan problemas de manipulación debido a la patogenicidad de este microorganismo, por lo que sería de gran utilidad un microorganismo no asociado a patógenos como serían bacterias lácticas o del género *Bacillus*. Para ello existen ensayos de aislamiento selectivo con muy buenos resultados como los de Gowland y col. (1987) y Emanuilova y col. (1993).

Un estudio de aislamiento selectivo de microorganismos nos remonta necesariamente a la toma de conciencia y al uso de la importante biodiversidad con que se cuenta en el país.

Objetivos generales:

- Aislar un microorganismo lipolítico cuya enzima sea termoactiva.
- Caracterizar la actividad de la lipasa de este microorganismo.

Objetivos particulares:

- Seleccionar un lugar para realizar el aislamiento dadas las características que señala el objetivo general.
- Desarrollar un método que permita obtener una buena captación de microorganismos productores de lipasa termoactiva.
- Aislar el microorganismo en forma pura.
- Caracterizar bioquímicamente de manera general al microorganismo.
- Determinar las condiciones óptimas de medición de actividad lipolítica.
- Caracterización bioquímica de la enzima seleccionada.

CAPITULO 5.

MATERIAL Y METODOS.

Reactivos.

-Acido oleico	Sigma
-Agar	Difco
-Agarosa	BioRad
-Caldo BHI	Difco
-CaSO ₄ ·2H ₂ O	Baker analyzed
-Extracto de levadura	Difco
-Fe(NO ₃) ₂	Merck
-FeCl ₃	Merck
-Glicerol	Merck
-HCl	Baker analyzed
-KNO ₃	Baker analyzed
-MgSO ₄ ·7H ₂ O	Baker analyzed
-MnSO ₄ ·4H ₂ O	Baker analyzed
-Na ₂ HPO ₄	Merck
-NaCl	Merck
-NaNO ₃	Baker analyzed
-NaOH	Baker analyzed
-Polimixina	Sintex
-Tributirina	Sigma
-Tryptosa	Difco
-Tris (hidroximetilaminometano)	Merck
-Tween 80	Canamex
-ZnSO ₄	Merck

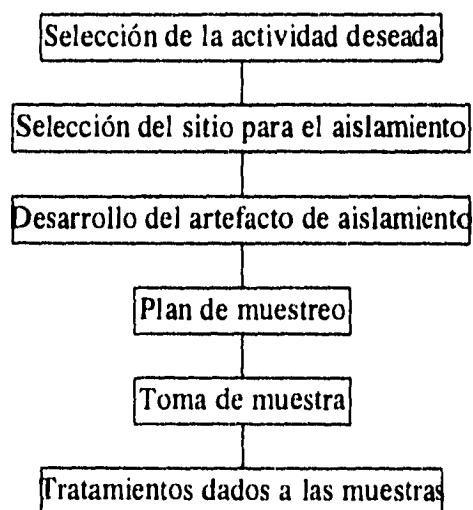
Selección de la actividad deseada.

El primer paso para la realización de este trabajo es la obtención de microorganismos, para lo cual se siguió la metodología mostrada en la Figura 5.1. La actividad seleccionada es la lipolítica.

Desarrollo del artefacto de aislamiento.

Los artefactos de aislamiento son dispositivos que permiten el enriquecimiento selectivo de microorganismos en ambientes en los que es difícil aislar los microorganismos de interés ya sea por sus cuentas bajas o por la presencia de microorganismos indeseables en el medio (Levanon 1987). En el presente caso se empleó un sistema que permite la interacción de lípidos con una base sólida aún en presencia de agua a altas temperaturas para tener acceso a las muestras enriquecidas. Para este fin, como se ve en la Figura 5.2, se embebió un cartucho de dodecilsilano, normalmente usado en cromatografía de líquidos para separación de compuestos por su polaridad, embebido con manteca vegetal la cual se adicionó fundida con ayuda de una jeringa. Este artefacto se corta por la mitad con un bisturí, se ata con un cordón a una piedra del lugar permitiendo que el cartucho flote en la superficie del agua y manteniéndolo simultáneamente en una zona restringida por la longitud del cordón.

FIGURA 5.1. Metodología seguida para la obtención de microorganismos.



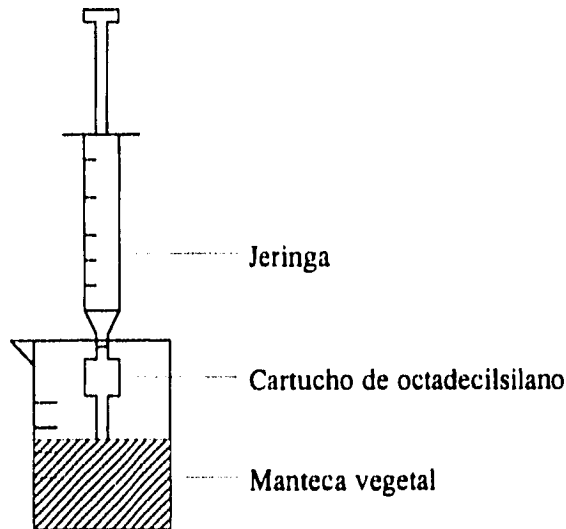
Plan de muestreo.

El plan de muestreo se hizo con base tanto en las características del dispositivo de aislamiento como al tiempo considerado para obtener algún enriquecimiento considerando que el objetivo era aislar bacterias. Los dispositivos de aislamiento se dejaron 8 días en los lugares elegidos para tal efecto con las características que se consideraron más adecuadas, esto es mayores temperaturas. Estos datos fueron tomados con un termómetro y un potenciómetro portátil marca Corning mod. pH103 con electrodo combinado marca Orion mod. 91-56.

Toma de muestra.

La toma de muestra se hizo sumergiendo en el agua del lugar elegido, matraces de 250 mL estériles, recogiendo (en su caso) además de los cartuchos aproximadamente 150 mL del agua del lugar con tierra suspendida naturalmente en ella. Las muestras se transportaron a la Ciudad de México a temperatura ambiente en ausencia de luz en un lapso de aproximadamente 3 horas y se guardaron en refrigeración (5°C) hasta su uso, 24 a 120 horas después.

FIGURA 5.2. Preparación del dispositivo para el aislamiento.



Tratamiento primario dado a las muestras.

Las muestras se trataron de acuerdo a la Figura 5.3. Las muestras se homogenizaron dentro de los matraces en vortex durante 1 minuto antes de la toma de esta para posteriores tratamientos. Inmediatamente se procede a inocular el homogeneizado en distintos medios tomando como base al medio "D" (Lacey 1990) modificado con la siguiente formulación final: solución de FeCl_3 (0.29 g/L) 1.0 mL; solución de micronutrientes ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 439.8 mg/L; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, 723.5 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 203.0 mg/L) 0.5 mL; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g; NaCl, 0.008g; KNO_3 , 0.1g; NaNO_3 , 0.7g; Na_2HPO_4 , 0.15g; H_2O , 1000 mL. Este medio se adicionó con 0.1% de triptosa, 0.1% de extracto de levadura y 1.0% de tributirina emulsificada (medio DELTT).

Este medio se utilizó ajustando su pH a 3 para pruebas líquidas, y a pH 7.2 para placas de agar (+ 1.5% de agar) y en combinación con caldo BHI (infusión cerebro-corazón) a pH 7.2.

Por otra parte se utilizó caldo nutritivo adicionado de polimixina, que en muchos casos no afecta a microorganismos del género *Bacillus* por ser producida por uno de ellos, *B. polymyxa* (Priest y col. 1988), a distintas concentraciones. El antibiótico utilizado corresponde a una concentración que va desde 0.00001153 g/mL de sulfato de polimixina equivalente a 76866.66 UI de polimixina base hasta 0.0 UI, ajustando el pH a 7.2.

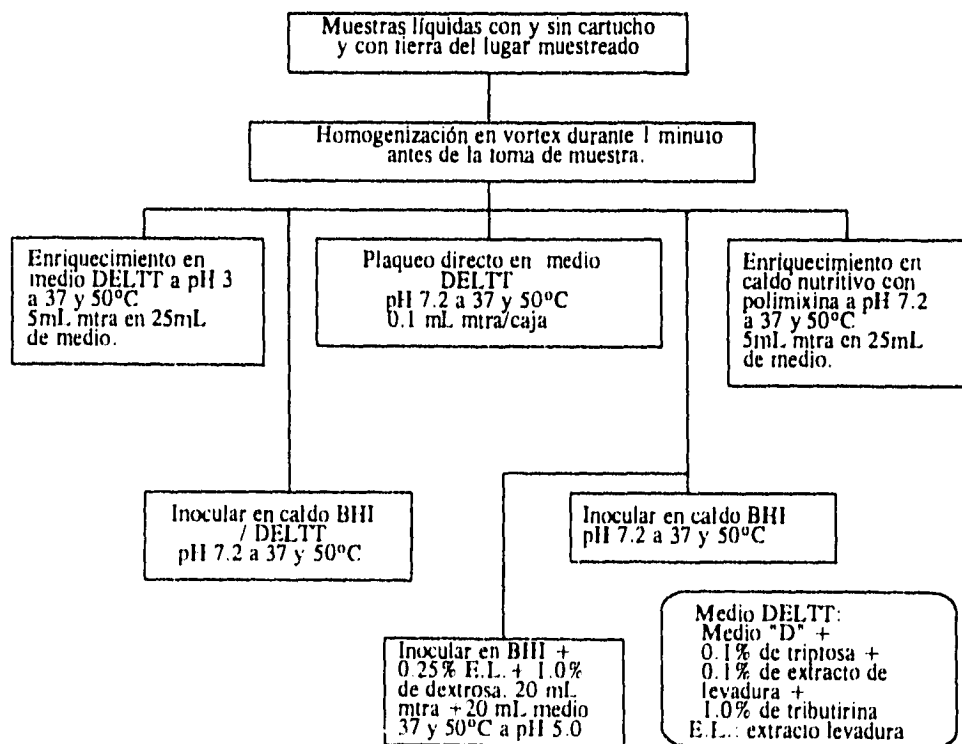
Finalmente se utilizó caldo BHI a pH 7.2 y caldo BHI adicionado con 0.25% de extracto de levadura y 1.0% de dextrosa anhidra.

En todos los medios líquidos se inoculó con 5 mL del homogeneizado en 25 mL de medio líquido, excepto el último el cual se inoculó con 20 mL de muestra en un volumen igual de medio.

Las placas se inocularon con 0.1 mL de homogeneizado y se extendieron con una varilla de vidrio doblada en ángulo de aproximadamente 90°, estéril. Todos los cultivos se realizaron a 37 y 50°C.

Los medios de cultivo utilizados se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los ajustes de pH se hicieron con NaOH o HCl 0.1M. El desarrollo se evaluó a las 24, 48 y 72 horas, en sólido y en líquido, observando desarrollo en la superficie de la placa o alguna turbidez, sedimento o nata en los cultivos líquidos. Los cultivos líquidos se incubaron en estufa sin agitación.

FIGURA 5.3. Esquema de los tratamientos dados a las muestras.



Tratamiento secundario dado a las muestras.

Los medios de cultivo en los que se observó desarrollo se plaquearon posteriormente a pH de 7.2 y 9.0, a 37°C, para obtener colonias aisladas y evaluar simultáneamente su carácter lipolítico a distintos valores de pH (Figura 5.4). Las colonias aisladas en placa se conservaron en caldo BHI a pH 7.2 previo desarrollo durante 5 días a 37°C y posterior refrigeración a 5°C. Además se conservaron las cepas SCA1 en BHI con desarrollo igual al mencionado anteriormente y 50% de glicerol estéril a -20°C. Las colonias aisladas se probaron también en medio DELTT a valores de pH de 3.0, 7.2 y 9.0 a 37°C. Finalmente se evaluó el desarrollo en agar DELTT a 50°C con pH de 7.2 y 9.0.

Caracterización bioquímica del microorganismo aislado.

El microorganismo aislado se sometió a una caracterización bioquímica general, de acuerdo al sistema UNISCEPT 20E (Analytab Products), prueba de Gram, observación de esporas y morfología de la colonia en placa de agar.

FIGURA 5.4. Tratamiento secundario dado a los microorganismos.

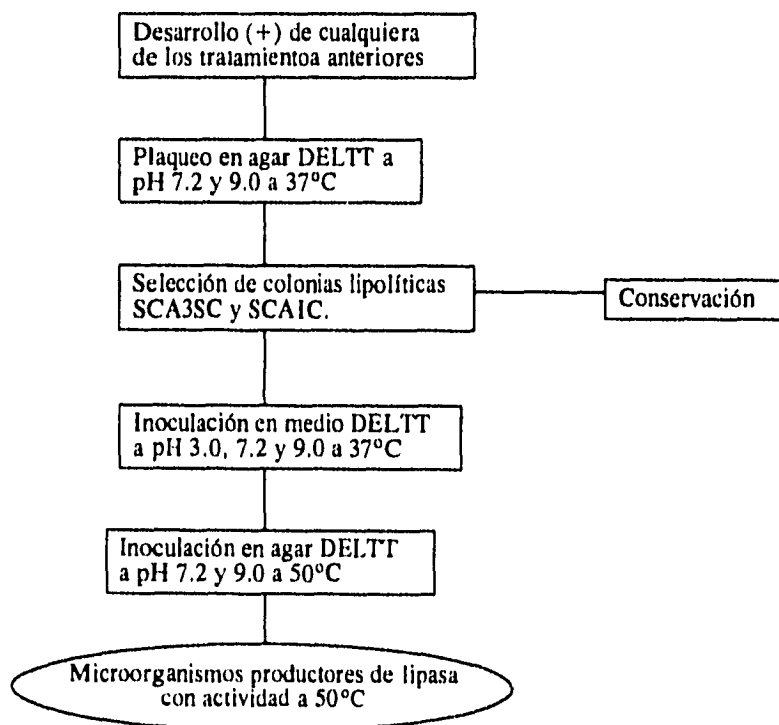
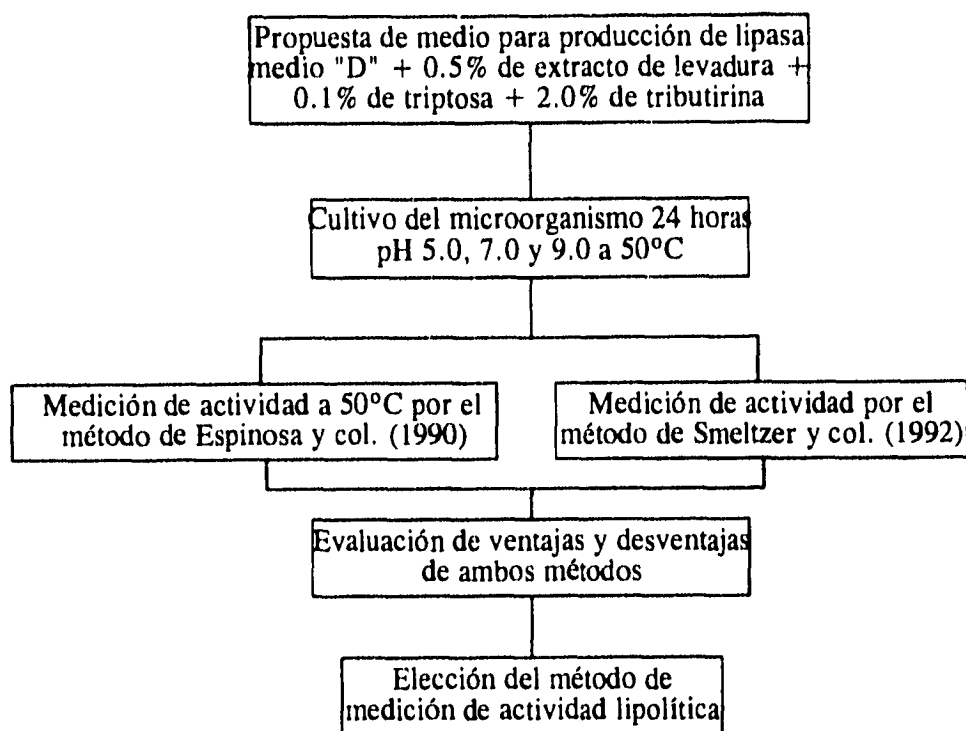


FIGURA 5.5. Producción de lipasa y medición de su actividad por dos métodos.

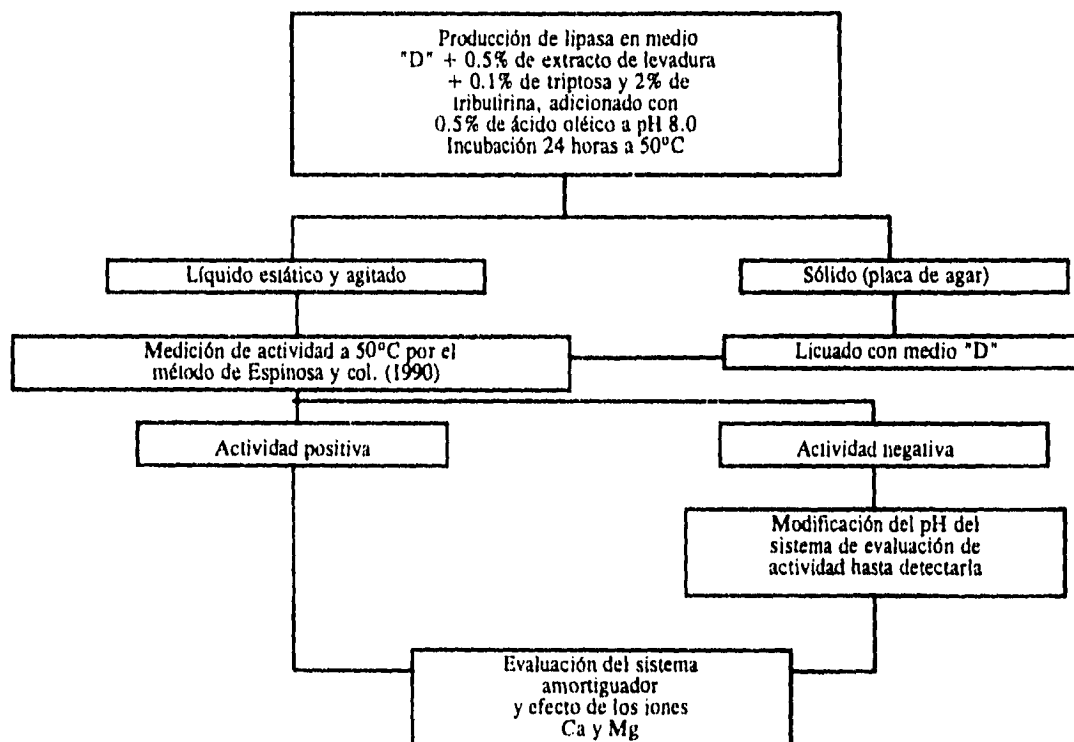


Medición de actividad lipolítica.

Una vez caracterizado el microorganismo se siguió la secuencia de la Figura 5.5. Se propuso un medio líquido para la producción de lipasa consistente en el mismo medio "D" usado en el aislamiento adicionado de 0.5% de extracto de levadura, 0.1% de triptosa y 2.0% de tributirina. Todos los ensayos son por triplicado, excepto las curvas patrón que se hicieron por duplicado, y los resultados se muestran como promedios. Se realizó una incubación a 50°C durante 24 horas y se eliminaron las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, seguido de filtración en membrana Milipore con poro de 0.45 µm; el extracto crudo así obtenido se utilizó para la medición de actividad lipolítica. Esta se determinó por el método de Espinosa y col. (1990) y el de Smeltzer y col. (1992). Con base en los resultados de estas pruebas se eligió un sólo método para la determinación y se prosiguió como se muestra en la Figura 5.6. En este ensayo de actividad lipolítica se parte de muestras adicionadas con 0.5% de ácido oléico en el medio de cultivo para permeabilizar membranas y obtener una mayor excreción de enzimas exocelulares. En este ensayo se determinó que el método de Espinosa y col. (1990) requería de ajustes en el pH de trabajo y por tanto en el sistema amortiguador. Se utilizó una solución amortiguadora de tris 5 mM, ajustando el pH a 11.95 con NaOH 4.0 M. Se probaron tres sistemas de cultivo, líquido estático en matraz EM de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo incubado a 50°C; líquido agitado

a 100 r.p.m. en las mismas condiciones que el anterior; y sólido a 50°C, usando el mismo medio incluyendo agar al 1.5% con siembra masiva. Los medios líquidos se trataron como se mencionó anteriormente; el medio sólido primero se sometió a una molienda en licuadora durante 15 segundos con 50 mL de medio "D" estéril, para posteriormente filtrarse en equipo Millipore con filtro cualitativo de la misma marca. Este filtrado se trata entonces como las otras muestras.

FIGURA 5.6. Producción de lipasa y medición de actividad lipolítica.

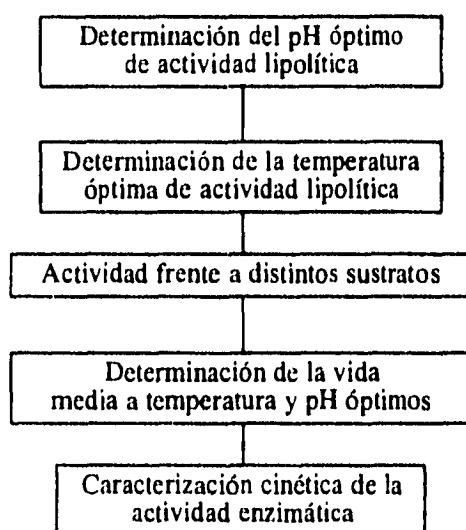


Los inóculos se prepararon a partir de cultivos en placa de agar BHI de 24 horas, pasándolos a solución 0.85% de NaCl estéril hasta obtener una absorbancia de 0.200 a 540 nm contra un blanco de la misma solución sin células. Esta lectura se hizo en un espectrofotómetro Milton Roy mod. Spectronic 21D en celdas de cuarzo de 1 cm de longitud. La actividad se midió con un potenciómetro Orion mod. 520A con un electrodo combinado de la misma marca mod. 91-56. Se utilizó un baño de agua a 50°C marca Neslab mod. Termomix con un agitador magnético marca Cole-Parmer mod. 4802-00.

Evaluación de los sistemas amortiguadores y efecto de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Con base en los resultados de actividad obtenidos (Figura 5.6), principalmente al pH, se evaluaron dos sistemas amortiguadores a ese pH. Se evaluaron por separado los sistemas de tris(hidroximetil)aminometano y cisteína en concentraciones equimolares de 5.0 mM así como su interacción por separado con los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} a una concentración 0.5 mM. Los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden tener influencia en la actividad enzimática, inhibiendo o activando a la enzima (Petrovic y col. 1990). Para evaluar el efecto del Ca^{2+} y Mg^{2+} en la actividad de la enzima se utilizó el mismo método de actividad lipolítica. En cada caso se realizó la curva patrón correspondiente al ensayo para la determinación de actividad.

FIGURA 5.7. Caracterización de la actividad lipolítica en el extracto crudo.



Determinación de pH óptimo de actividad de la enzima en el extracto enzimático.

Una vez establecidas las condiciones de actividad enzimática se procedió a caracterizar la actividad de la enzima utilizando varios parámetros de prueba (Figura 5.7). El pH se probó en un rango de 7 a 11.3, preparando soluciones amortiguadoras de tris 5 mM a distintos valores de pH y midiendo la actividad de la enzima a esas condiciones con el método de Espinosa y col. (1990). Este método tiene como principio la caída de pH en función del tiempo por hidrólisis de tributirina que produce ácido butírico. Considerando esto para la medición a distintos valores de pH, se hacen soluciones amortiguadoras a pH 10.1, 10.4, 10.5, 11.0, 11.4. A partir de la caída de pH en la solución amortiguadora de tris 5 mM y su comparación con una curva patrón de ácido butírico agregado cada 2 minutos,

abarcando todo el rango de pH, se obtienen los valores de actividad en rangos de pH que al menos abarquen 5 puntos en la curva de actividad. La pendiente de estos 5 puntos entre la pendiente de la curva patrón nos da la actividad en ese rango de pH. No obstante no se pueden hacer muchos intervalos porque la pendiente tiende a ser constante en varias zonas, razón por la cual se tomaron las pendientes que mostraron cambios más marcados.

Determinación de la temperatura óptima de actividad de la enzima en el extracto enzimático.

La temperatura se probó en un rango de 40 a 80°C por el método de Espinosa y col. (1990), usando intervalos de 10°C. Para este fin se utilizaron los mismos aparatos que en la actividad normal, excepto que en la medición a 80°C se utilizó un baño de agua consistente en un vaso de precipitados de 500 mL con agua sobre una parrilla eléctrica marca Lindberg, mod. 53166. Las actividades se compararon contra curvas patrón de ácido butírico hechas en el mismo medio de reacción a la misma temperatura del ensayo.

Actividad de la enzima frente a varios sustratos.

La actividad frente a distintos triglicéridos, utilizando tributirina al 2% (todos los triglicéridos se hicieron partiendo de una emulsión al 5% en agua destilada, con 0.01% de tween 80 como emulsificante, en licuadora durante 25 segundos), así como trioleína, tricaprilina, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de girasol a las mismas concentraciones en la solución amortiguadora de tris 5 mM.

Actividad residual de la enzima por incubación del extracto crudo a 50°C.

La actividad residual se evaluó ajustando el pH del extracto crudo a 10.5 y posteriormente se sometió un tratamiento térmico a 50°C en baño de agua y tomando muestra a distintos tiempos y midiendo actividad lipolítica por el método de Espinosa y col. (1990).

Características cinéticas de la actividad enzimática.

Para la caracterización cinética se hicieron curvas de actividad contra distintas concentraciones de sustrato utilizando una sola emulsión de tributirina como fuente de este, con el fin de estabilizar el tamaño de gotas de triglicérido en la

fase dispersa. El propósito es hacer una cinética tipo Michaelis-Menten y posterior evaluación por el método de Lineweaver-Burk.

CAPITULO 6.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Selección del sitio de aislamiento.

Para este fin se consideraron dos fuentes naturales de microorganismos termófilos, como podían ser ciertas industrias que utilizan calor en sus procesos como la industria de embutidos cárnicos, a la cual no conseguimos acceso, y zonas geotérmicas del país que ofrecían gran potencial pero difícil acceso como Los Humeros, Puebla (Barragán y col. 1991) y otros muchos de cuyas condiciones se sabe poco, y en muchos casos, se encuentran muy alejados de la Ciudad de México (Gutiérrez y col. 1989). Por estas razones y por recomendación de la Dra. Rosa María Proh Ledesma, del Instituto de Geofísica de la U.N.A.M. se decidió ir a Los Azufres, Michoacán. Este sitio tiene facilidad de acceso (carreteras y transporte público hasta los pozos de la C.F.E. que se encuentran en el lugar), hay un rango amplio de temperaturas en las aguas termales del lugar y está relativamente cerca de la Ciudad de México.

Pruebas del artefacto de aislamiento.

Las pruebas realizadas en el laboratorio (cualitativas únicamente) muestran que aún después de 4 horas en agua a ebullición a pH 7.1, la manteca vegetal se mantenía adherida a la base plástica con dodecilsilano y su liberación al medio era mínima. Tras la esterilización de los cartuchos no hay liberación de manteca vegetal y en las pruebas de corte tampoco se liberan las partículas de dodecilsilano con manteca vegetal, quedando adheridas a la base plástica de los cartuchos. Esto garantiza que la presencia de los cartuchos implica la presencia de la fuente de carbono. Sin embargo la disponibilidad de estos lípidos para acción enzimática no se evaluó, aunque si la capacidad de obtención de desarrollo en medio "D" modificado como se describe más adelante y 0.1% de triptosa, donde mostró el desarrollo de bacterias rosadas en la superficie del dodecilsilano. Estas bacterias fueron aisladas inicialmente de leche cortada y mostraron lipólisis en placa de agar con tributirina.

Características fisicoquímicas de los sitios muestreados.

El día 13 de Noviembre de 1993 se realizó la primera parte del trabajo, que consistía en tomar lectura de algunas características fisicoquímicas del lugar, elegir los mejores sitios para colocar los dispositivos de aislamiento en base a la temperatura y depositar éstos. Las lecturas de los sitios elegidos por su alta temperatura se encuentran en la Tabla 6.1.

TABLA 6.1. Características de los lugares seleccionados para aislamiento.

Lugar elegido	Temperatura (°C)	pH	E°(mV)
SCA1	84	2.54	296
SCA2	75	3.00	244
SCA3	77	2.45	256
SCA4	70	3.09	237
SCA5	70	2.96	248

Las siglas de los lugares elegidos indican su procedencia y posición geográfica relativa a un esquema del lugar. Las temperaturas se pueden considerar altas, y los valores de pH bastante ácidos mientras que el potencial redox se puede considerar moderadamente oxidante, lo cual nos indica que el tipo de microorganismos que se pueden aislar en estos lugares serán termofílicos, acidofílicos y aerobios. Para los objetivos planteados estos sitios son buenos prospectos de estudio. Estos sitios se marcaron dentro de un esquema que representa el área de trabajo para evitar confusiones geográficas al momento de recoger las muestras.

Toma de muestra.

Sin cartucho: En el primer viaje a los Azufres se tomó muestra del sitio denominado SCA3. A esta muestra se le denominó entonces SCA3SC para indicar de donde se tomó y que se realizó sin cartucho de dodecilsilano. También se dejaron los cartuchos de dodecilsilano embebidos con manteca vegetal en los sitios elegidos para tal efecto.

Con cartucho: Una semana después se recogieron los cartuchos dejados en los sitios elegidos.

Tratamiento primario dado a las muestras.

En cuanto se tuvieron las muestras se les dio un tratamiento primario con el cual se deseaba obtener desarrollo de microorganismos en cultivos por lotes. Se utilizó el cultivo por lotes considerando que es de fácil manejo y requiere de menor cantidad de equipo, ajustándose a la cantidad de equipo con la que se cuenta en el laboratorio. Los ensayos

realizados consisten en una serie de cultivos con diferentes nutrientes y presiones de selección tratando de agotar las posibilidades de desarrollo microbiano y evitar microorganismos diferentes a los del género *Bacillus*, seleccionado ya que generalmente no es patógeno para el hombre y es de fácil manejo y conservación. En la Tabla 6.2 tenemos un resumen de estos ensayos y sus resultados. De estos ensayos se obtuvieron dos cultivos positivos, SCA1C y SCA3SC, los cuales se sometieron a un segundo tratamiento. El haber tenido sólo dos cultivos positivos no indica que el resto de las muestras estuviesen estériles, sino que el ensayo estaba diseñado para seleccionar eubacterias, mientras que por las características del lugar, éstas debían ser escasas y era más sencillo aislar arqueobacterias, sin embargo en el aislamiento se usaron temperaturas de 50°C y, como regla general, los hipertermófilos tienen un óptimo de crecimiento de 80°C y no pueden crecer por abajo de 60°C. Por otra parte las arqueobacterias difícilmente presentarían el fenotipo deseado, es decir, como en su ambiente los lípidos son raros, este tipo de microorganismos no poseen las enzimas para degradarlos (Segerer y col. 1993).

TABLA 6.2. Tratamientos dados a las muestras para el desarrollo de microorganismos.

Método	Medio	Condiciones	Desarrollo
Enriquecimiento	DELTT 5mL mtra en 25 mL medio (5/25)	pH 3 a 37°C	(-)
		pH 3 a 50°C	(-)
Plaqueo directo	DELTT (0.1 mL/placa)	pH 7.2 a 37°C	(-)
		pH 7.2 a 50°C	(-)
Enriquecimiento	Caldo nutritivo con polimixina (5/25)	pH 7.2 a 37°C + 76000 UI	(-)
		pH 7.2 a 50°C + 76000 UI	(-)
		pH 7.2 a 37°C + 38000 UI	(-)
		pH 7.2 a 50°C + 38000 UI	(-)
		pH 7.2 a 37°C + 7600 UI	(-)
		pH 7.2 a 50°C + 7600 UI	(-)
		pH 7.2 a 37°C sin antibiótico	(-)
		pH 7.2 a 50°C sin antibiótico	(-)
Enriquecimiento	BHI-DELTT (5/25)	pH 7.2 a 37°C	SCA3SC (+)
		pH 7.2 a 50°C	SCA1C(+)
Enriquecimiento	BHI + 0.25% EL + 1% dextrosa (20/20)	pH 5.0 a 37°C	(-)
		pH 5.0 a 50°C	(-)

(+)=Presente, (-)=Ausente.

La literatura reporta otros métodos de aislamiento, como el sistema de cultivo continuo, descrito por Lie y col. 1991, con el que se aislaron varios microorganismos termófilos y lipolíticos. De todos los microorganismos aislados, el denominado CT42 se estudió con más detalle. Se encontró que es un *Bacillus* sp., probablemente *Bacillus stearothermophilus*. Se determinó que la producción de lipasa está inducida por la presencia de Tween 80 en el medio

de cultivo, mostrando además gran especificidad hacia éste, ya que las pruebas con Tween 40 exhiben sólo un 5% de la actividad observada con Tween 80 (Gowland y col. 1987). Este sistema puede ser bueno, pero no es determinante en el aislamiento selectivo de microorganismos termofílicos productores de lipasa termoactiva, y si puede aumentar costos de equipo y operación, ya que se requieren sistemas de bombeo y columnas con sustrato inmovilizado.

Tratamiento secundario dado a las muestras.

Las cepas obtenidas en el tratamiento primario se plaquearon en agar DELTT para obtener colonias aisladas y se sometieron a un segundo tratamiento descrito en la Tabla 6.3, con el fin de establecer diferencias entre estas colonias y para observar características deseables en ellas como la lipólisis, el desarrollo a 50°C con lipólisis, desarrollo a pH ácido y/o alcalino y nuevamente la lipólisis en estas condiciones. Se obtuvieron 5 cepas SCA3SC y 9 cepas SCA1C puras. En cada caso no podemos excluir que se trate de un cultivo inicial puro, ya que en placa y microscópicamente las características de todas las colonias aisladas de cada grupo son iguales. Los resultados de este segundo tratamiento nos ofrecen una diferencia principal en placa entre ambos grupos de colonias, que es la capacidad de todas las SCA1C de crecer a 50°C, mientras que las SCA3SC no lo hacen. Considerando este último dato se centraron los experimentos en las cepas SCA1C, que a partir de este momento se les denominó GMA1. Es notorio que el fenotipo del microorganismo aislado no corresponde a las características del sitio de aislamiento, lo que nos hace pensar en la presencia de este microorganismo en forma esporulada, y que su procedencia es de algún sitio cercano con un pH mayor (aprox. 6) y de menor temperatura (50°C), ya que este microorganismo no crece a 70°C. Estas condiciones se presentan en repetidas ocasiones dentro de la laguna y en lagunas aledañas.

TABLA 6.3. Métodos, medios y condiciones dados a los microorganismos SCA3SC y SCA1C.

Método	Medio	Condiciones	Desarrollo	Lipólisis
Plaqueo	Agar DELTT (siembra por estriado con asa bacteriológica) 0.1 mL/placa	pH 7.2 a 37°C pH 9.0 a 37°C	SCA3SC (+) SCA1C(+) en todos los casos	(+) en todos los casos
Cultivo líquido	Medio DELTT (toma con asa bacteriológica)	pH 3.0 a 37°C pH 7.2 a 37°C pH 9.0 a 37°C	(-) SCA3SC (+) SCA1C(+) SCA3SC (+) SCA1C(+)	---- ND ND ND ND
Plaqueo	Agar DELTT (siembra por estriado con asa bacteriológica) 0.1 mL/placa	pH 7.2 a 50°C pH 9.0 a 50°C	SCA3SC (-) SCA1C(+) SCA3SC (-) SCA1C(+)	---- (+) ---- (+)

ND= No determinado.

Caracterización bioquímica del microorganismo aislado.

El microorganismo es un bacilo largo Gram (+) que, como se vio en el proceso de aislamiento, es capaz de crecer a 50°C produciendo lipólisis sobre tributirina en placa de agar. También crece a 20°C, no creciendo a 5°C ni a 80°C. Las pruebas bioquímicas están en la Tabla 6.4. El microorganismo presenta formación de endoesporas terminales y subterminales. En placa a las 24 horas aparece como una colonia amarilla pálida, de 2.0 a 4.0 mm de diámetro, circular, convexa, con bordes mellados, superficie lisa, de aspecto cremoso y textura poco viscosa. El microorganismo es termófilo y aerobio. Además presenta otras características de interés comercial, como sus actividades xilanolítica y proteolítica.

TABLA 6.4. Caracterización bioquímica de la cepa SCA1.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
β-Galactosidasa	+	Fermentación de sorbitol *	-
Arginina dehidrolasa	-	Fermentación de ramnosa *	-
Lisina descarboxilasa	-	Fermentación de sacarosa *	-
Ornitina descarboxilasa	-	Fermentación de melibiosa *	-
Utilización de citrato	-	Fermentación de amigdalina *	-
Producción de ácido sulfhídrico *	-	Fermentación de L+arabinosa *	-
Ureasa *	+	Reducción de nitrato *	-
Triptofano desaminasa *	-	Catalasa *	+
Indol *	-	Pectinasa	-
Acetoína a partir de piruvato *	+	Proteasa	+
Licuefacción de gelatina *	+	Xilanasa	+
Fermentación de glucosa *	-	Almidón	-
Fermentación de manitol *	-	Celulosa	-
Fermentación de inositol *	-		

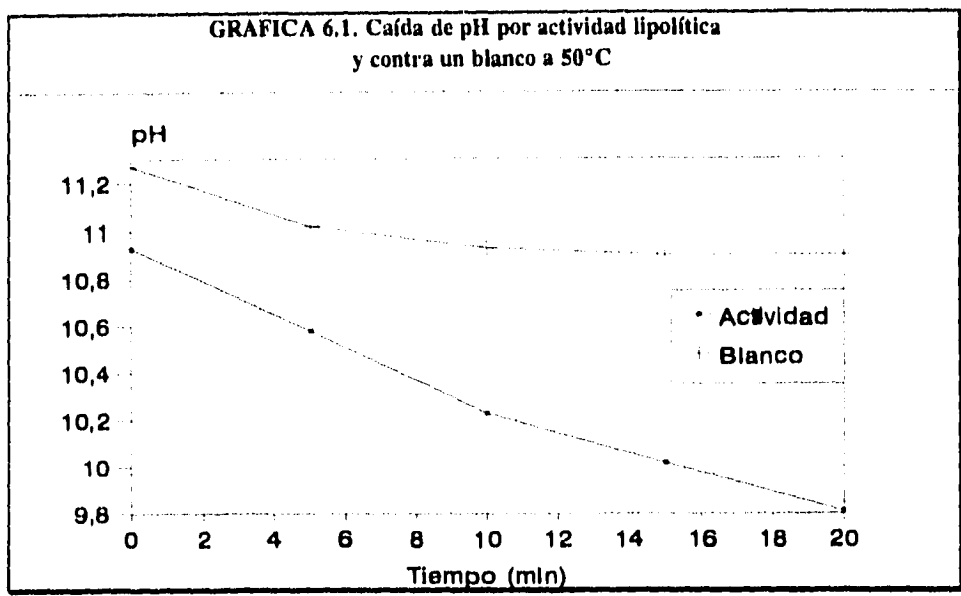
* De acuerdo al sistema UNISCEPT 20E (Analytab Products).

La caracterización bioquímica indica que este microorganismo pertenece al género *Bacillus* y no corresponde a la de ningún otro descrito dentro de este género, sin embargo al que mas se asemeja es a *Bacillus pumilus*, del cual difiere en todas las pruebas de fermentación de carbohidratos, excepto ramnosa y sorbitol y en los tiempos de esporulación, siendo más rápido el microorganismo aislado. No obstante estas pruebas, existen muchos parámetros taxonómicos que están cambiando y que impiden de cualquier modo una clasificación adecuada (Priest y col. 1988).

La identificación completa no se llevó a cabo debido al tiempo requerido para ésta, estimado en 6 a 12 meses. La caracterización hecha nos permite denominar a este microorganismo como *Bacillus* sp. GMA1.

Medición de actividad lipolítica y sistema de cultivo en la producción de enzima.

La actividad lipolítica se evaluó por una caída de pH con respecto al tiempo. Inicialmente se intentó utilizar el método descrito por Smeltzer y col. (1992), pero no se pudo detectar actividad y era difícil realizar el ensayo a 50°C, ya que la medición es espectrofotométrica, lo que implicaba suspender la incubación mientras se tomaba la lectura. Los primeros ensayos con el método descrito por Espinosa y col. (1990), en el que la actividad se mide en un intervalo de pH de 7.0 a 7.5 aproximadamente, resultaron negativos. Debido a esta ausencia de actividad se decidió modificar la solución amortiguadora para medir en medio ácido y alcalino, para lo cual se probaron una solución amortiguadora de maleatos 5 mM a pH 5 y Tris 5 mM a pH 9.0. En medio ácido no se detectó actividad, mientras que en medio alcalino se detectó una ligera caída de pH en un lapso de 10 minutos, lo cual sugirió que la enzima de *Bacillus* sp. GMA1 es alcalófila. Para corroborar lo anterior se preparó la misma solución amortiguadora pero se ajustó el pH a 11.95 de modo que al agregar sustrato y enzima este valor bajaba aproximadamente hasta 11.0, en el cual si se detectó la actividad.



Como se puede ver en la Gráfica 6.1, la hidrólisis espontánea o saponificación de triglicéridos, una posible solubilización de CO₂ y la hidrólisis enzimática son fenómenos que se pueden diferenciar al comparar los perfiles de caída de pH, pero es más difícil medir cada uno de ellos por separado en un sistema en que ambos fenómenos se presentan. Con esta diferencia establecida, se procedió a evaluar el efecto del sistema de cultivo sobre la producción de enzima, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 6.5.

TABLA 6.5. Efecto del sistema de fermentación sobre la cantidad de enzima producida.

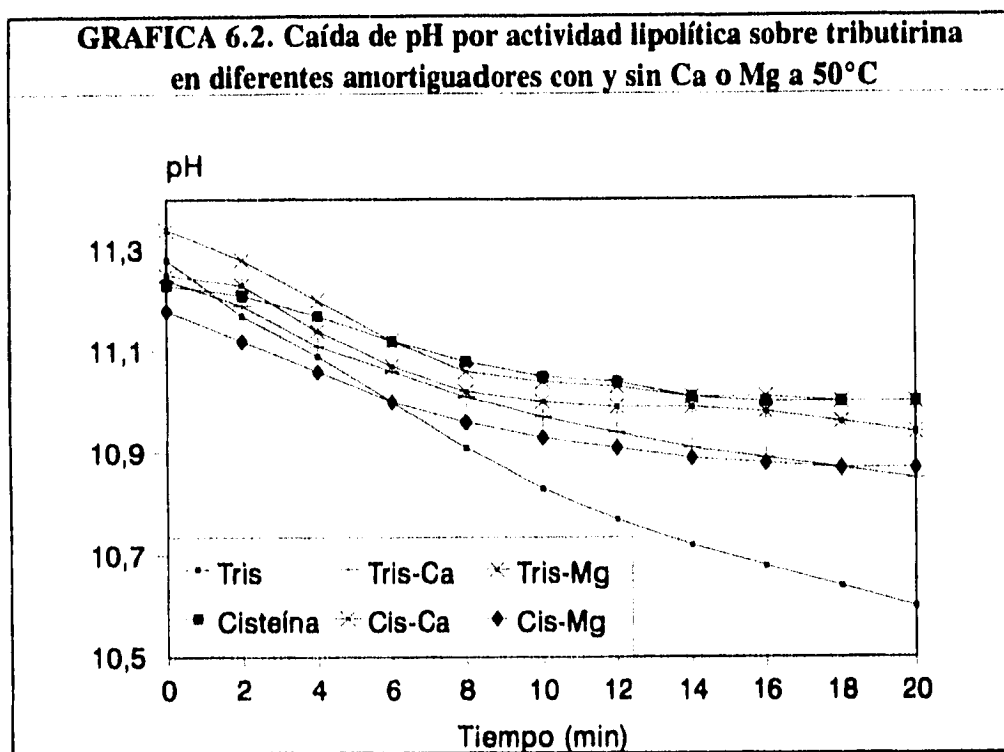
Sistema de cultivo	Actividad (U/mL)
Líquido estático	4.3902
Líquido agitado	4.0625
Sólido	4.2683

Estos resultados demuestran que no existe una diferencia notoria en la producción de enzima, por lo cual se optó por utilizar el método más sencillo para las siguientes fermentaciones, que es el de líquido estático.

Evaluación de los sistemas amortiguadores y efecto de los iones Ca²⁺ y Mg²⁺.

Para la medición de la actividad se requiere de una solución amortiguadora capaz de mantener el pH del sistema con variaciones mínimas permitiendo sin embargo, una variación debida a la liberación de ácido butírico por una lipasa. Para este fin se probaron dos compuestos cuyo valor de pKa se aproxima al valor en que se detectó la actividad, esto

es cerca de 11.0. Las sustancias probadas son el Tris(hidroximetil)aminometano (pKa = 8.3) y la cisteína, esta última sustancia posee un pKa en el α -amino de 10.8 y de 8.3 en su cadena lateral, lo cual daría un buen poder amortiguador y la posibilidad de explorar el efecto de los grupos -SH en la actividad de la enzima.

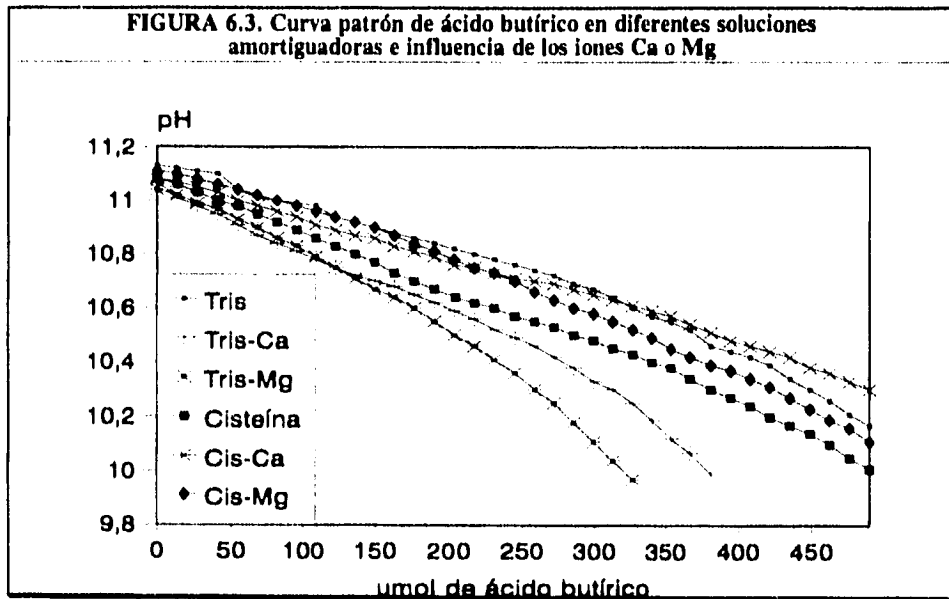


Como se ve en la Gráfica 6.2, el comportamiento de la actividad enzimática en las diferentes soluciones amortiguadoras es similar, sin embargo la caída de pH en amortiguador de Tris es más marcada pero no podemos establecer diferencias sino hasta relacionar las pendientes de estas curvas con las de las curvas patrón mostradas en la Gráfica 6.3. Se obtuvieron los valores de actividad para cada amortiguador y están enlistados en la Tabla 6.6.

TABLA 6.6. Efecto del sistema de amortiguamiento y los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en la actividad lipolítica.

Sol. amortiguadora	Actividad (U/mL)	% de actividad
Tris 5 mM	17.8492	100.00
Cis 5 mM	7.5667	42.39
Tris 5 mM - Ca 0.5 mM	7.8153	43.78
Cis 5 mM - Ca 0.5 mM	16.4976	92.43
Tris 5 mM - Mg 0.5 mM	4.7144	26.41
Cis 5 mM - Mg 0.5 mM	9.7801	54.79

En primera instancia podemos observar un efecto marcado en la actividad en el amortiguador de Tris muy por encima del de cisteína, lo cual podría deberse a una inhibición de la lipasa por grupos sulfhidrilos. Los grupos aminos no parecen afectar porque el Tris también los contiene; estructuralmente no se conoce el sitio de afectación de la actividad ni el nivel de ésta. La inhibición podría darse a nivel de sitio activo, sitio estérico o más general a nivel de estructura terciaria por modificación de puentes disulfuro o sulfhidrilos libres.



Por otra parte tenemos que el efecto del Ca^{2+} y Mg^{2+} con respecto a Tris, son inhibidores de la actividad enzimática, al menos por separado y a la concentración usada (0.5 mM). El Ca^{2+} se puede unir firmemente a proteínas por medio de grupos nucleófilos como los átomos de oxígeno o las cargas negativas de los aminoácidos Asp y Glu. Además el Ca^{2+} puede unirse a múltiples ligandos, 6 a 8 átomos de oxígeno, lo cual puede provocar una interacción cruzada dentro de la proteína provocando modificaciones estructurales e incluso agregaciones protéicas. El Mg^{2+} no tiene afinidad por átomos de oxígeno no cargados y prefiere formar complejos de coordinación pequeños y simétricos, mientras que el Ca^{2+} los puede formar asimétricos y de gran radio. El Ca^{2+} se puede unir a hendiduras irregulares de las proteínas (Stryer 1988). Todas estas características pueden ser las causantes de los efectos regulatorios observados, y aunque pudiera parecer que el Ca^{2+} debiera ser un regulador más fuerte por sus características, no

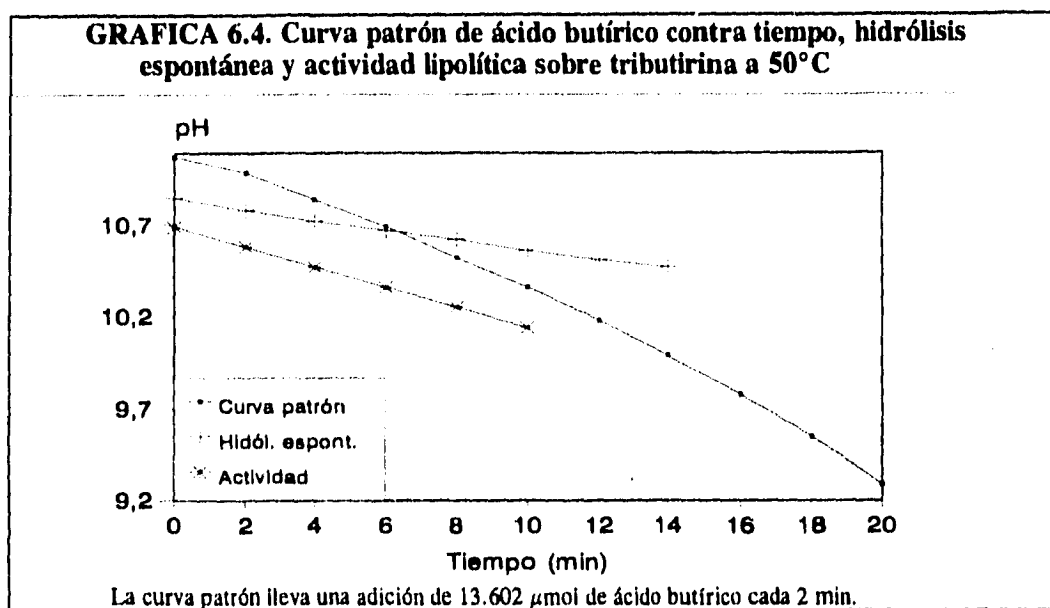
podemos excluir la posibilidad de que el Mg^{2+} forme un complejo con la enzima con un mayor efecto inhibitorio. Sin embargo en el caso de la cisteína la presencia de estos iones mejoró la actividad enzimática, esto puede ser por la interacción entre estos cationes y los grupos sulfhidrilo, reduciendo la acción inhibitoria de estos. Si recordamos que el pKa de la cadena lateral de la cisteína, esto es el grupo sulfhidrilo, está por debajo del pH de trabajo entonces tendremos sulfhidrilos ionizados que perfectamente pueden interaccionar con un catión divalente o monovalente si se encuentra como MOH^+ , donde M es el metal alcalinotérreo, explicando así ese aumento de actividad al agregar estos cationes al amortiguador de cisteína.

Condiciones óptimas de medición de actividad.

Dada la naturaleza del método, la alta temperatura y el pH de trabajo, nos preocupamos por la influencia de la saponificación o hidrólisis espontánea de los lípidos en la actividad medida, para lo cual se hizo una prueba de caída de pH contra tiempo a las condiciones de actividad y comparamos la caída contra la que se produce en presencia de enzima y la producida por adición de ácido butírico en el mismo sistema. Como se muestra en la Gráfica 6.4, nuevamente se ve que ambos fenómenos ocurren simultáneamente y al hacer la curva patrón contra tiempo al mismo ritmo que se toman las lecturas de caída de pH al determinar actividad enzimática, el efecto del fenómeno de hidrólisis espontánea queda considerado y la lectura tomada corresponde sólo a la actividad enzimática. De todos los experimentos anteriores se concluyó que es mejor determinar la actividad en un rango de pH de 10 a 11 para tener una actividad máxima y mejor linealidad en las curvas recordando que para calcular la actividad se relacionan las pendientes de la curva de actividad con la curva patrón. Esto a su vez dio una idea de en que valor buscar el pH óptimo de actividad más adelante.

La evaluación de actividad se hizo a partir de este momento y para toda la caracterización en una solución amortiguadora de Tris(hidroximetil)aminometano 5.0 mM preparada con agua destilada, a pH de 11.95. A falta de otros resultados, propios de la caracterización, se trabajó a 50°C en presencia de 1% de tributirina emulsificada. La curva patrón mostrada aquí se utilizó para la corrección de los valores iniciales de actividad ya que no se había considerado para estos el tiempo. Para los valores de actividad en diferentes amortiguadores no se hizo la corrección contra la curva patrón en función de tiempo. Dado que todas las curvas se trabajaron con adiciones de ácido butírico

cada 30 segundos con el fin de alcanzar homogeneidad en el medio; esto implica que el error se hace constante y lo valida para comparación porcentual.



Determinación de pH óptimo de actividad de la enzima en el extracto enzimático.

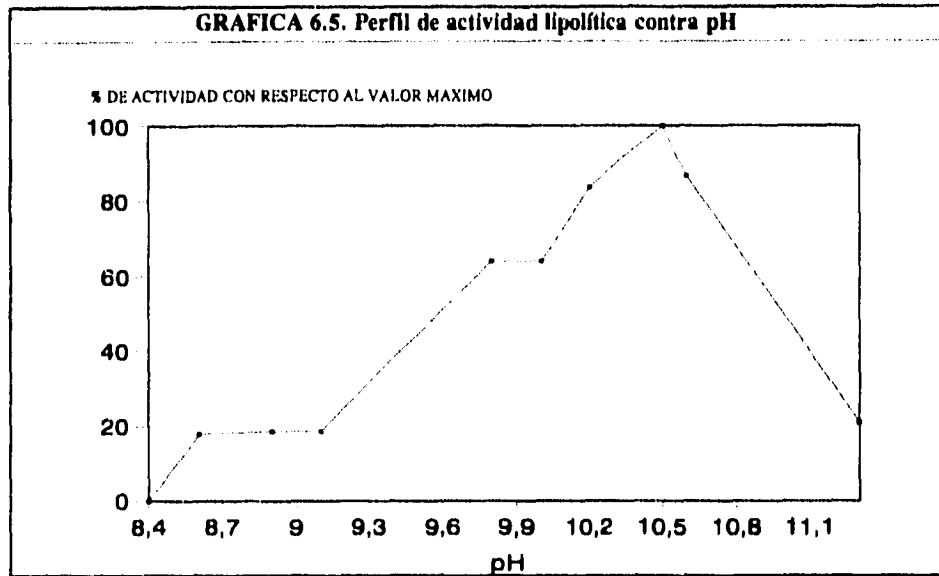
La determinación del pH óptimo de la enzima arrojó los resultados mostrados en la Tabla 6.7, observando un máximo en 10.5. Esta tabla se construyó tomando la pendiente en intervalos más pequeños de pH y mostrando el pH promedio del intervalo.

TABLA 6.7. Determinación del pH óptimo de la enzima en el extracto enzimático.

pH	% de actividad
11.30	21.02
10.60	83.67
10.50	100.00
10.20	83.67
10.10	64.03
9.80	64.03
9.10	18.62
8.90	18.62
8.60	17.96
8.40	0.00

En la Gráfica 6.5 podemos ver los datos de la Tabla 6.7 generando así un perfil de actividad contra pH, observando que el rango de actividad contra pH es un poco estrecho para esta enzima y la actividad varía mucho con respecto a pequeños cambios en el pH. Es importante hacer notar que esta enzima también se produce a pH neutro en placa, presentando actividad a este pH después de varias horas a 50°C, a 37°C e incluso a 5°C. Esto indica que el método de evaluación de actividad lipolítica no es lo suficientemente sensible para medir la actividad a pH neutro y como se mencionó en el capítulo correspondiente a "Aislamiento selectivo de microorganismos", el ensayo para detectar la actividad lipolítica aún tiene muchos problemas por resolver.

De acuerdo al perfil de actividad se puede suponer que los aminoácidos relacionados con actividad tienen grupos ionizables en valores de pH muy alcalinos, como la tirosina, lisina y/o arginina cuyo pKa aproximado en proteínas es de 10.0, 10.0 y 12.0 respectivamente, aunque depende de la temperatura, fuerza iónica y microambiente del grupo ionizable (Stryer 1988). Por otra parte ninguno de estos aminoácidos ha sido reconocido como parte del sitio activo en lipasas. No obstante, como en el caso de las serinoproteasas, se sabe que la presencia de una cavidad oxianiónica, que consiste en dos grupos amino capaces de estabilizar el oxianión en forma tetraédrica formado por el ataque nucleofílico del hidroxilo de la serina reactiva al grupo carbonilo del enlace peptídico o éster en su caso, también está involucrada en la reacción de hidrólisis (Derewenda y Sharp 1993). La conformación de esta cavidad oxianiónica no está restringida a los protones de grupos amino de la serina o glicina del esqueleto de aminoácidos de la proteína, sino que puede involucrar otros aminoácidos como el grupo amido de la cadena lateral de un residuo de asparagina, el cual, por otra parte, no puede formar puentes de hidrógeno en el complejo de Michaelis (enzima-sustrato no covalente) ni en el intermediario acil-enzima (porque el oxígeno no está cargado en estos momentos) pero sí cuando existe la unión covalente entre la enzima y el grupo carbonilo y se encuentran en configuración tetraédrica (Kraut 1977). Dado el valor de pH al que se pierde actividad, se podría pensar en un grupo sulfhidrilo proveniente de cisteína (pKa aproximado en proteínas de 8.5) involucrado en la actividad enzimática, perdiendo actividad al protonarse este sulfhidrilo en pH por debajo de su pKa.



Determinación de la temperatura óptima de actividad de la enzima en el extracto enzimático.

En la Tabla 6.8 están los resultados de actividad enzimática a diferentes temperaturas, leída contra curvas patrón de ácido butírico a la misma temperatura. Como es notorio, esta enzima muestra termoactividad e incluso podría ser activa a mayores temperaturas pero el rango confiable para la lectura con el potenciómetro no es tan alto. Se puede ver además que hacia temperaturas menores de 50°C la caída de actividad es más marcada que hacia mayores, por lo cual se puede suponer que la actividad óptima está entre 50 y 60°C.

TABLA 6.8. Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica del extracto enzimático.

Temperatura (°C)	Actividad (U/mL)	% de actividad
40	4.7905	88.52
50	5.4116	100.00
60	5.1291	94.78
70	4.2776	79.04
80	4.1098	75.94

Actividad de la enzima frente a varios sustratos.

La actividad frente a distintos triglicéridos se determinó con el mismo método, a 50°C y pH entre 10.0 y 11.0, y se comparó en todos los casos contra la curva patrón de ácido butírico ya que no se tenían los ácidos grasos libres y puros de todos los triglicéridos. Los resultados están en la Tabla 6.9.

TABLA 6.9. Actividad lipolítica con respecto a distintos sustratos.

Sustrato	% de actividad
Tributirina	100.00
Tricaprilina	20.01
Trioleina	18.31
Aceite de maíz	17.29
Aceite de oliva	15.25
Aceite de girasol	17.00

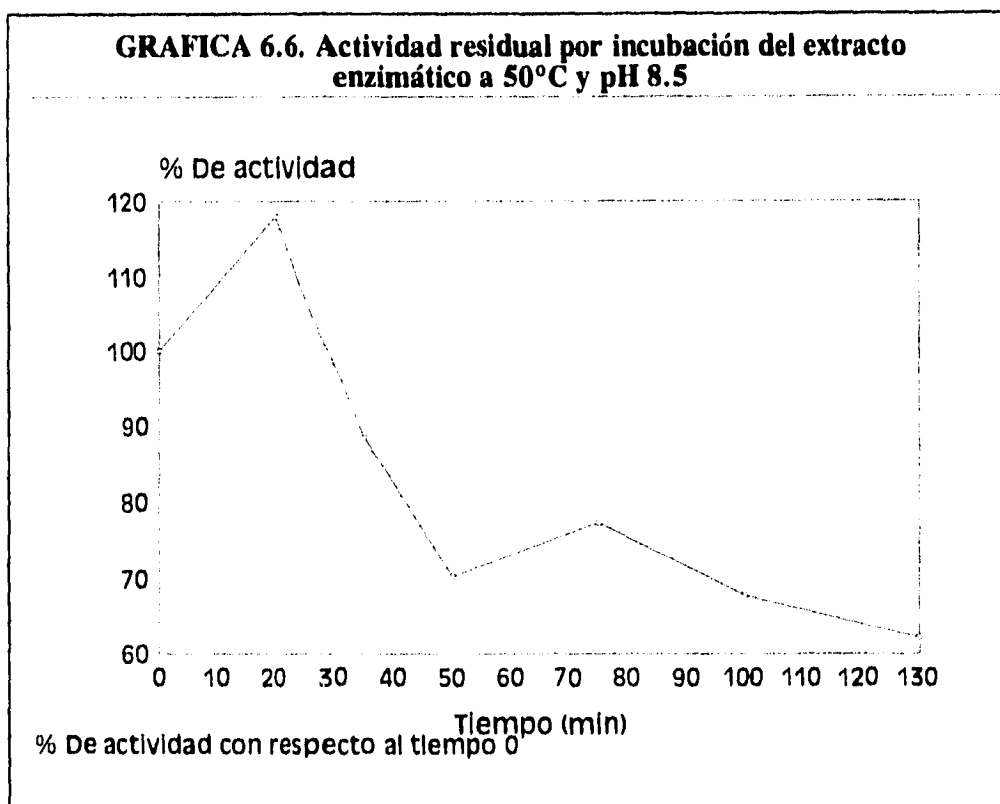
Es notorio que la capacidad hidrolítica aumenta al disminuir la longitud de la cadena del ácido graso, pero aumenta dramáticamente al tener un ácido graso de cadena muy corta (tributirina, C4), mientras en cadenas un poco más largas (tricaprilina, C8) la actividad cae bruscamente. En sustancias con alto contenido de triacilglicérols como los aceites de maíz, girasol y oliva, en los que la composición no es homogénea y predominan los de cadena larga (Nawar 1985), la actividad nuevamente baja.

Actividad residual por incubación de la enzima a 50°C y pH de 10.5.

La actividad residual se determinó a 50°C y pH de 10.5 por ser éstas las condiciones óptimas de actividad de la enzima. La actividad se pierde a los 45 minutos de iniciado el ensayo, que por su naturaleza (larga duración en tiempo) no puede evaluar puntos intermedios en esos 45 minutos. En un segundo intento, se evaluó la actividad residual a pH de 8.5 y 50°C, generando los resultados de la Tabla 6.10 y Gráfica 6.6. Estos datos muestran que la actividad disminuye después de 20 minutos, aunque inicialmente aumenta. Los ligeros repuntes que se aprecian, posiblemente se deban en cierta medida al método de medición o bien a cambios estructurales de estructura terciaria o incluso secundaria con pocas modificaciones del sitio catalítico, como se ha visto para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus*, cuya estructura secundaria puede modificarse antes de la destrucción del sitio catalítico (Amelunxen y col. 1970), un cambio similar ocurre en la glutamino sintetasa de *B. stearothermophilus* por abajo de su temperatura de inactivación, siendo un ejemplo muy claro de cambios estructurales que producen rompimientos en el gráfico de Arrhenius (Matsunaga y Nosoh 1974).

TABLA 6.10. Actividad residual por incubación de la enzima a 50°C y pH de 8.5.

Tiempo (min)	% de actividad
0	100.00
20	117.96
35	88.37
50	70.26
75	77.35
100	67.75
130	62.24



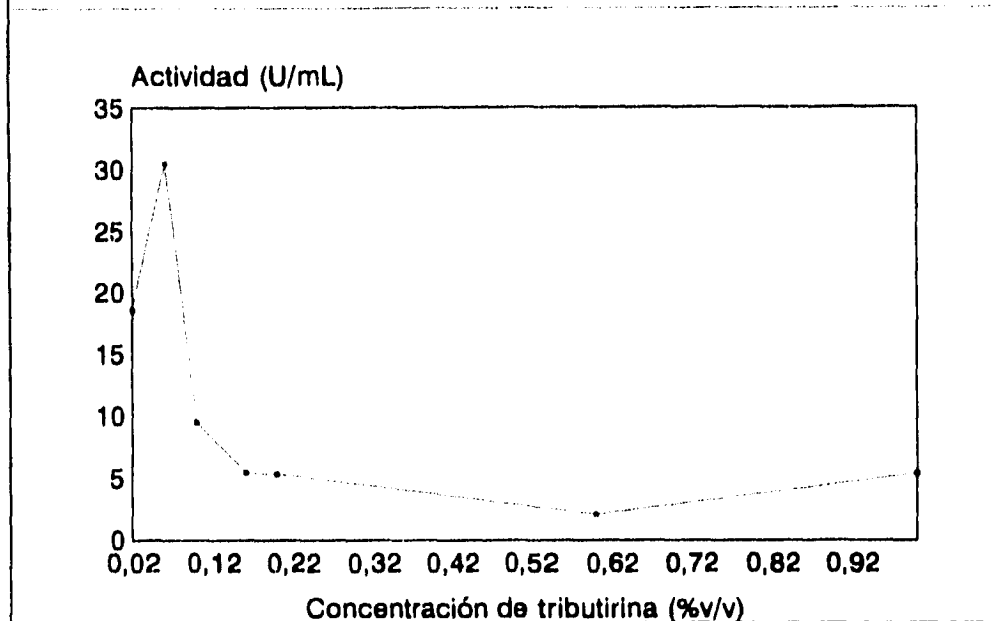
Características cinéticas de la actividad enzimática.

Se determinaron los parámetros cinéticos utilizando un modelo de Michaelis-Menten, obteniendo los datos de la Tabla 6.11 y Gráfica 6.7. Estos datos se obtuvieron por comparación contra curvas patrón de ácido butírico en un sistema de reacción conteniendo la misma concentración de tributirina preparada a partir de la misma emulsión.

TABLA 6.11. Actividad lipolítica de la enzima de *Bacillus* sp. GMA1 con distintas concentraciones de tributirina.

Concentración de tributirina (%v/v)	Actividad (U/mL)
1.00	5.4116
0.60	2.1263
0.20	5.3967
0.16	5.4982
0.10	9.5238
0.06	30.4636
0.02	18.5714

GRAFICA 6.7. Actividad lipolítica de la enzima de *Bacillus* sp. GMA1 con distintas concentraciones de sustrato (tributirina)



Los datos obtenidos no son aplicables al modelo cinético de Michaelis-Menten ya que no presenta un comportamiento hiperbólico, mostrando un máximo de actividad en el segundo punto y luego en decremento (Figura 6.7). Como ya se dijo, las lipasas catalizan la hidrólisis de triglicéridos insolubles en la interfase agua-aceite y por lo mismo la concentración de sustrato depende de la concentración de esta interfase en el sistema. La concentración depende entonces del tamaño de partícula del sustrato emulsificado y de la consistencia de su tamaño durante el ensayo de actividad. La presencia de emulsificante en el medio puede alterar los parámetros cinéticos dado que altera la tensión superficial, modificando el ambiente en que la enzima está trabajando. Por otro lado el tamaño de las partículas de tributirina no se puede controlar con equipo convencional en forma confiable y mucho menos pensar que se van a

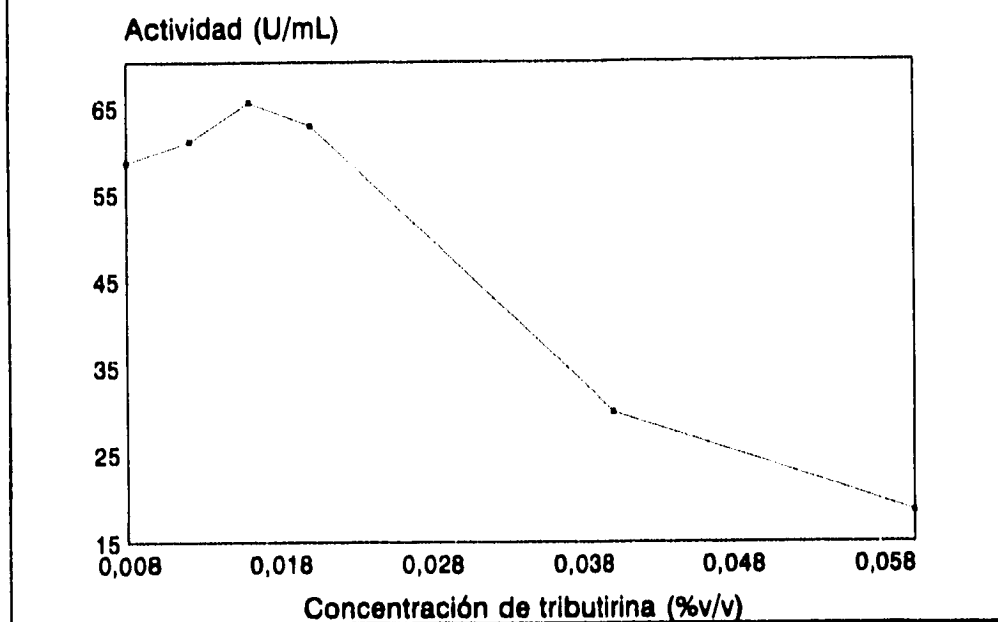
mantener de tamaño constante en un sistema agitado, cambiando igualmente al modificar o detener la agitación. El efecto observado en los datos de la Gráfica 6.7 se ha observado en otras lipasas como la pancreática porcina. Kwon y Rhee en 1984 reportaron el mismo efecto para la lipasa de *Candida rugosa*. Ellos lo atribuyeron al aumento de hidrofobicidad del sistema ya que consideraban que la enzima está expuesta a ambas fases. No obstante en el caso de la lipasa pancreática porcina se mantuvo la hidrofobicidad del sistema constante ya que la solubilidad de la tributirina es de 0.01%, concluyendo que la inhibición es resultado de la interacción entre la tributirina insoluble y la lipasa (O'Connor y Bailey 1988).

Considerando los datos de la Gráfica 6.7 se prepararon diluciones de tributirina dentro del rango en que aparentemente se presenta linealidad en la curva obtenida, de 0.02 a 0.06% de tributirina, con el objeto de determinar en esta zona los parámetros cinéticos de la enzima al suponer una inhibición por sustrato. Los resultados obtenidos están mostrados en la Tabla 6.12 y Gráfica 6.8.

TABLA 6.12. Actividad lipolítica de la enzima de *Bacillus* sp. GMA1 con concentraciones de tributirina menores a 0.06%.

Concentración de tributirina (%v/v)	Concentración de tributirina (mol/L)	Actividad (U/mL)
0.060	6.5270E-3	18.5010
0.040	4.3514E-3	29.7650
0.020	2.1757E-3	62.8265
0.016	1.7405E-3	65.4571
0.012	1.3054E-3	61.0428
0.008	0.8703E-3	58.5827

GRAFICA 6.8. Actividad lipolítica de la enzima de Bacillus sp. GMA1 con concentraciones de tributirina menores a 0.06% (v/v)



Contrario a lo anteriormente visto, en este caso (Gráfica 6.8), la concentración de tributirina si se encuentra por debajo de su nivel de solubilidad, por lo que aquí si es posible encontrar un efecto de modificación de la hidrofobicidad del sistema, principalmente en los dos primeros puntos, los cuales muestran una caída de actividad probablemente debida a la inexistencia o mínima presencia de la interfase en la que actúan las lipasas. Sin embargo estos puntos son los únicos que se comportan de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten. Nuevamente se encuentra un efecto de caída de actividad al elevar la concentración de tributirina en la emulsión. Todas estas variaciones en la actividad, como ya se mencionó anteriormente, pueden deberse a la inestabilidad de las partículas de tributirina en la fase dispersa (en cuanto a tamaño y número), lo que impide un control de la concentración de la interfase sobre todo a altas temperaturas y considerando que se está produciendo un agente surfactante por el pH de trabajo (butirato de sodio), la interfase puede estar desapareciendo y por tanto alterando la acción de la enzima sobre esta. En resumen, debido a la naturaleza insoluble del sustrato de las lipasas es muy difícil evaluar sus parámetros cinéticos. Finalmente la hidrólisis espontánea puede modificar la constante de reacción enzimática si se considera que la tributirina a pH 8 y 25°C presenta este fenómeno (O'Connor y Bailey 1988) y si se consideran como equilibrios simultáneos la constante de reacción de cada una de estas reacciones está condicionada por la de la otra. La constante

de reacción química está relacionada de manera inversa a la concentración de sustrato y evidentemente de manera directa a la concentración de producto, considerando esto tenemos que la evaluación de parámetros cinéticos de la enzima está condicionada a la velocidad de reacción química que depende de la concentración de sustrato, parámetro que es determinante en la caracterización de la enzima. En otras palabras, para evaluar la cinética enzimática en un sistema como éste tendríamos que controlar la reacción química, hacerla constante o evaluarla frente a un sustrato que no presente este comportamiento en las condiciones de reacción óptimas de la enzima. Los ésteres y tioésteres sin embargo, se hidrolizan en medios alcalinos acuosos donde el nucleófilo es el ion hidroxilo a temperaturas moderadamente altas o altas, excepto cuando tienen algún impedimento estérico que impide el ataque de un nucleófilo (March 1985), pero un compuesto de este tipo difícilmente podría interactuar con el grupo nucleófilo de la enzima (-OH de la serina).

Comparación de la enzima de *Bacillus* sp. GMA1 con otras lipasas termófilas y alcalófilas.

En la Tabla 6.13 podemos ver la comparación de la lipasa de *Bacillus* sp. GMA1 con otras lipasas bacterianas termófilas y alcalófilas provenientes de microorganismos mesófilos (*Pseudomonas fragi*) y termófilos.

Tabla 6.13. Comparación de los valores óptimos de temperatura y pH para algunas enzimas bacterianas termófilas y alcalófilas.

Microorganismo productor de la lipasa	pH óptimo de actividad	Temperatura óptima (°C)	Referencia
<i>Bacillus</i> sp. GMA1	10.5	50-60	Este trabajo.
<i>Bacillus</i> sp. CT42	*8.0	*45	Gowland y col. (1987)
<i>Bacillus</i> sp. MC 7	8.5	60	Emanuilova y col. (1993)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IGB 83	10.0	50	Palmeros y col. (1994)
<i>P. nitroreducens</i> var. <i>thermotolerans</i>	9.5	50	Watanabe y col. (1977)
<i>Pseudomonas fragi</i>	9.5	75-80	Watanabe y col. (1977)

* No necesariamente el óptimo.

Desgraciadamente no se consideran los mismos parámetros de caracterización en todos los trabajos mencionados en la Tabla 6.13. No obstante podemos ver que si bien no es la de mayor temperatura, si es la de pH más extremo. Esta característica la hace de interés tanto para investigación como para detergentes, industriales o de uso en el hogar, muy alcalinos. Si bien es cierto que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} inhiben esta lipasa, también es cierto que se pueden acompañar de

ablandadores de agua para evitar este problema. Tiene la ventaja de ser termoactiva, lo cual le permitiría trabajar en procesos a altas temperaturas para hacer una limpieza más eficiente.

CAPITULO 7.

CONCLUSIONES.

-El microorganismo aislado pertenece al género *Bacillus*, es termófilo, no ha sido descrito previamente y produce lipasa activa a altas temperaturas.

-La lipasa de *Bacillus* sp. GMA1 es termófila y alcalófila, presentando máximos en 50°C y pH=10.5.

-La actividad de la lipasa de *Bacillus* sp. GMA1 es inhibida por iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , lo mismo ocurre en presencia de grupos sulfhidrilo libres.

-La actividad de la lipasa de *Bacillus* sp. GMA1 disminuye sensiblemente al actuar sobre triacilgliceroles de cadena larga.

-La vida media de la enzima en las condiciones óptimas de actividad es menor a 45 minutos, a 50°C y pH 8.5, es mayor a 3 horas.

-La caracterización cinética de la enzima no se pudo realizar debido a que el sustrato de estas es insoluble en agua.

-La lipasa de *Bacillus* sp. GMA1 parece estar sujeta al fenómeno de inhibición por sustrato.

-Los objetivos planteados se cubrieron totalmente, aunque quedan muchos aspectos no estudiados, como el funcionamiento y la eficiencia del dispositivo de aislamiento usado.

CAPITULO 8.

RECOMENDACIONES.

- Purificar la lipasa de *Bacillus* sp. GMA1 y caracterizarla con respecto a los parámetros aquí ensayados.
- Hacer curvas de estabilidad a pH y temperatura con la enzima pura.
- Caracterizar bioquímicamente a *Bacillus* sp. GMA1.
- Revisar otras características de *Bacillus* sp. GMA1 que podrían ser de interés industrial, como su proteasa y xilanasas.
- Analizar la enzima de *Bacillus* sp. GMA1 con técnicas moleculares con el fin de establecer correlaciones entre sus características y su estructura para, eventualmente, contribuir a generar herramientas que permitan mejorar otras enzimas, impartiendo a éstas termofilia y/o alcalofilia.
- Mejorar los rendimientos por manipulación de medios de cultivo, temperatura, pH, mutagénesis clásica o utilizando otro sistema de expresión.
- Evaluar otras características de esta lipasa como su regioselectividad o enantioselectividad. Del mismo modo evaluar su comportamiento en solventes orgánicos.

BIBLIOGRAFIA.

- Alfredsson, G. A. y col. "*Rhodothermus marinus*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic, halophilic bacterium from submarine hot springs in Iceland." *J. Gen. Microbiol.* **134**, 299-306 (1988).

- Amelunxen, R. E., Noelken, M. y Singleton, R. "Studies on the subunit structure of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*." *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 447-455 (1970).

- Barragán, R. M. y col. "Geoquímica de fluidos del campo geotérmico de los Humeros, (México)." *Geotermia, Rev. Mex. Geoenergía*, **7** (1), 23-47 (1991).

- Bell, L. y Parsons, J. G. "Factors affecting lipase flavor in butter." *J. Dairy Sci.* **60** (1), 117-122 (1975).

- Brock, T. D. y Darland G. K. "Limits of microbial existence: Temperature and pH." *Science* **169**, 1316-1318 (1970).

- Brock, T. D. y Freeze, H. "*Thermus aquaticus* gen. n. ans sp. n., a non-sporulating extreme thermophile." *J. Bacteriol.* **98** (1), 289-297 (1969).

- Cheetham, P. "Screening for novel biocatalysts." *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 194-213 (1987).

- De Rosa, M., Gambacorta, A. y Bu'lock, J. D. "Extremely thermophilic acidophilic bacteria convergent with *Sulfolobus acidocaldarius*." *J. Gen. Microbiol.* **86**, 156-164 (1975).

- Derewenda, Z. S. y Sharp, A. M. "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases" *Trends Biochem. Sci.* **18**, 20-25 (1993).

- Durham, D. R., Stewart, D. B. y Stellwag, E. J. "Novel alkaline- and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp strain GX6638." *J. Bacteriol.* **169** (6), 2762-2768 (1987).
- Espinosa, E., Sánchez, S. y Farrés, A. "Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313." *Biotechnol. Lett.* **12** (3), 209-214 (1990).
- Emanuilova, E. y col. "Thermoalkalophilic lipase-producing *Bacillus* selected by continuous cultivation." *FEMS Microbiology Lett.* **108**, 247-250 (1993).
- Fischer, F. y col. "Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria." *Nature* **301** (10), 511-513 (1983).
- Fliersmans, C. B. y Brock, T. D. "Ecology of sulphur-oxidizing bacteria in hot acid soils." *J. Bacteriol.* **111** (2), 343-350 (1972).
- Fukumori, F., Kudo, T. y Horikoshi, K. "Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp No. 1139" *J. Gen. Microbiol.* **131**, 3339-3345 (1985).
- Gilbert, E. J., Cornish, A. y Jones, C. W. "Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2." *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2223-2229 (1991).
- Glymph, J. L. y Stutzenberger, F. J. "Production, purification and characterization of α -amylase from *Thermomonospora curvata*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **34** (4), 391-397 (1977).
- Godtfredsen, S. E. en Fogarty y Kelly "Microbial enzymes and biotechnology" Capitulo 7: Microbial lipases. pp 255-274. Ed. Elsevier Applied Science. Northern Ireland. (1990).

- Gowland, P., Kemick, M. y Sundaram; T. K. "Thermophilic bacterial isolates producing lipase." FEMS Microbiology Lett. **48**, 339-343 (1987).
- Gusek, T. W. y Kinsella, J. E. "Properties and potential applications of a unique heat-stable protease." Food Technol. **42**, 102-107 (1988).
- Gutiérrez, L. C. A., López, A. y Quijano, J. L. "Zonas geotérmicas de interés en México." Geotermia, Rev. Mex. Geoenergía, **5** (3), 283-346 (1989).
- Herbert, R. A. "A perspective on the biotechnological potential of extremophiles" Trends Biotechnol., **10**, 395-402 (1992).
- Horikoshi, K. en Fogarty y Kelly "Microbial enzymes and biotechnology" Capítulo 8: Enzimes of alkalophiles. pp 275-294. Ed. Elsevier Applied Science. Northern Ireland. (1990).
- Hou, C. T. "Screening of microbial esterases for asymmetric hydrolysis of 2-ethylhexil butyrate." J. Indust. Microbiol. **11**, 73-81 (1993).
- Jensen B. F. y Norman, B. E. "*Bacillus acidopullulyticus* pullulanase: application and regulatory aspects for use in the food industry." Process Biochem. **19**, 129-134 (1984).
- Joyet, P., Guérineau, M. y Heslot, H. "Cloning of a thermostable α -amylase gene from *Bacillus licheniformis* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol. Lett. **21**, 353-358 (1984).
- Katz, L. y col. "Screening and selection of a microbial lipase for the stereospecific hydrolysis of verlukast." J. Indust. Microbiol. **11**, 89-94 (1993).

- Kawak, H. S., Jeon, I. L. y Perng, S. K. "Statistical patterns of lipase activities on the release of short-chain fatty acids in Cheddar chesse slurries." *J. Food Sci.* **54** (6), 1559-1564 (1989).
- Kraut, J. "Serine proteases: structure and mechanism of catalysis." *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 331-358 (1977).
- Lacey, J. en Labeda, D. P. "Isolation of biotechnological organisms from nature". Capítulo 6: Isolation of thermophilic microorganisms. pp 141-181. Ed. McGraw-Hill. New York. (1990).
- Langrand, G. y col. "Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases." *Biotechnol. Lett.* **12** (8), 581-586 (1990).
- Levanon, Y. y col. "Microbiological specialisation course in environmental enzyme screening." Curso impartido por Biotechnology Centre, Cranfield Institute of Technology, Bedford, U.K. en el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, U.N.A.M., Cuernavaca, México (1987).
- Lie, E., Persson, A. y Molin, G. "Screening for lipase-producing microorganisms with a continuous cultivation system." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 19-20 (1991).
- Lin, X., Liu, M. y Tang, J. "Heterologous expression of thermopsin, a heat-stable acid proteinase." *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 696-701 (1992).
- March, J. "Advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structure." Capítulo.10: Aliphatic nucleophilic substitution. pp. 377-383. 4ª Edición. Ed. Wiley-Interscience. New York. (1992).
- Matsunaga, A. y Nosoh, Y. "Conformational change with temperature and thermostability of glutamine syntetase from *Bacillus stearothermophilus*." *Biochim. Biophys. Acta* **365**, 208-211 (1974).

-Miller, C. y col. "Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters." J. Amer. Oil. Chem. Soc. **65** (6), 927-931 (1988).

-Morgan, F. J. y Priest, F. G. "Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NICB 6346." J. Appl. Microbiol. **50**, 107-114 (1981).

-Mullis, K. B. y Faloona, F. A. "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol. **155**, 335-350 (1987).

-Nawar, W. W. en Fennema, O. R. "Food Chemistry." Capítulo 4: Lipids. pp 139-244. 2ª Edición. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. (1985).

-O'Connor, K. C. y Bailey, J. E. "Hydrolysis of emulsified tributyrin by porcine pancreatic lipase" Enzyme Microb. Technol., **10**, 352-356 (1988).

-Palmeros, B. y col. "Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83." Proc. Biochem. **29**, 207-212 (1994).

-Petrovic, S. E. y col. "Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis." Biotechnol Lett **12** (4), 299-304 (1990).

-Priest, F. G., Goodfellow, M. y Todd, C. "A numerical classification of the genus *Bacillus*." J. Gen. Microbiol., **134**, 1847-1882 (1988).

-Richardson, T. y Hyslop, D. B. en Fennema, O. R. "Food chemistry." Capítulo 6: Enzymes. pp 371-476. Ed. Marcel Dekker. New York U. S. A. (1985).

- Sakano, Y. y col. "Enzymatic properties and action patterns of *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase." *Agric. Biol. Chem.*, **46** (5), 1121-1129 (1982).
- Segerer, A. H. y col. "Life in hot springs and hydrothermal vents." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, **23**, 77-90 (1993).
- Sidler, W. y Zuber, H. "The production of extracellular thermostable neutral proteinase and α -amylase by *Bacillus stearothermophilus*." *European J. Appl. Microbiol.*, **4**, 255-266 (1977).
- Smeltzer, M. S., Hart, M. E. e Iandolo, J. J. "Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase." *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (9), 2815-2819 (1992).
- Soberón-Chávez, G. y Palmeros, B. "*Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential applications." *Crit. Rev. Microbiol.* **20** (2), 95-105 (1994).
- Steele, D. y Stowers, M. "Techniques for selection of industrially important microorganisms." *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 89-106 (1991).
- Stryer, L. "Biochemistry." Capítulo 2. Protein structure and function. pp 16-42. 3ª Edición. Ed. W.H. Freeman y Co. New York. (1988).
- Tsukagoshi, N. y col. "Cloning and expression of a thermophilic α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*." *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58-63 (1984).
- Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. y Erdmann, H. "Comparison of lipases by different assays." *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 631-639 (1992).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-Watanabe, N., y col.. "Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes." *Agric. Biol. Chem.*, **41** (8), 1353-1358 (1977).

-Zamost, B. L., Nielsen, H. K. y Starnes, R. L. "Thermostable enzymes for industrial applications." *J. Indust. Microbiol.*, **8**, 71-82 (1991).