



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INMOVILIZACIÓN DE LIPASA DE  
*Bacillus pumilus* GMA1**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A:  
**VICTOR HUGO ZÚÑIGA RODRÍGUEZ**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA  
MÉXICO, D.F.**

**2004**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

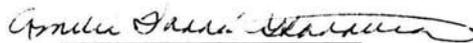
**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Arturo Navarro Ocaña
Vocal	Prof. Ismael Bustos Jaimes
Secretario	Prof. Amelia Farrés González-Saravia
1er. Suplente	Prof. Francisco Ruíz Terán
2° Suplente	Prof. Maricarmen Quirasco Baruch

**Lugar donde se desarrolló el tema:**

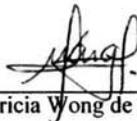
Laboratorio 312. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E .  
Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema



Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Asesor técnico



Patricia Wong de la Mora

Sustentante



Victor Hugo Zúñiga Rodríguez

## AGRADECIMIENTOS

*A mi asesora, la Dra. Amelia Farrés por la confianza depositada en mi. Gracias por brindarme su apoyo y sobre todo, por permitirme trabajar a su lado.*

*Al Dr. Ismael Bustos y Dr. Arturo Navarro por el tiempo empleado en la revisión de esta tesis y sus valiosos comentarios.*

*A la M.en C. Patricia Wong por sus sabios consejos y apoyo en la realización de esta tesis.*

*A la M.en C. Sandra Pérez por brindarme su valiosa ayuda y dedicarme siempre un momento para escucharme.*

*A la M.en C. Idalia Flores por ofrecerme su amistad, tiempo y sobre todo, la transmisión de su conocimiento.*

*A la M.en C. Vanesa Cabra por compartirme su tiempo y sus conocimientos.*

*A la M.en C. Carolina Peña por conseguirme el soporte usado en esta tesis.*

*A todos mis compañeros del laboratorio 312 que hicieron de mi vida en el laboratorio un paraíso y a veces....un tormento. Aprendí mucho de cada uno.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México que desde hace ya... varios años me adopto. Estoy orgulloso de ser uno de los tuyos...*

## DEDICATORIAS

*Al terminar esta etapa de mi vida reflexiono sobre cuantas personas han influido de alguna manera en la culminación de mi carrera, pero... son tantas.*

*Primero quiero dedicar esta tesis a **MIS PADRES** : Constantino y Martha, ya que ustedes son y serán siempre, el estímulo que me da fuerza para hacer las cosas. Esto es el resultado de un gran esfuerzo realizado por parte de ustedes: **GRACIAS**.*

*También a mis hermanos: **Leandro, Marbin, Oscar y Martha Elena** les agradezco todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado, tanto en las buenas y en las malas. Espero nunca decepcionarlos y, al contrario, ser un ejemplo de motivación en sus vidas.*

*Además dedico este trabajo:*

*A **Paola** por todo el empeño, paciencia, tiempo, cariño... que siempre me has brindado. Gracias por enseñarme que no hay realidad que no venga de un sueño.*

*A **Cristina** porque sin saberlo, motivaste mi crecimiento como persona. Gracias por todo el tiempo que me has dedicado. Algún día nuestros ideales se cumplirán...esforcémonos.*

*A **Paty y Claudia**...mis grandes amigas del alma, porque nunca termine nuestra amistad que a sufrido grandes nubarrones.*

*A mis amigos de la Facultad, por tantas vivencias que pasamos juntos...y las que faltan: **Norma, Larissa (Gruñis), Edgar, Marino, Vanesa, Guadalupe, Liliana y Juan Carlos**.*

*A la **H.H.C.R.O.M. and Friends**, porque fueron parte de una etapa en mi vida que nunca olvidaré y que me dejó marcado para siempre... "Hasta la victoria siempre"*

*A mis amigos del CCH: **Alma, Javier, Arlette, Lizeth, Marcos, Paulina, Rodolfo, Noe**.*

*Los obstáculos son necesarios para el éxito, ya que se alcanza la victoria solamente después de muchas luchas e incontables derrotas. Sin embargo cada lucha, cada derrota, incrementa la destreza y la fuerza, el valor y la resistencia, la habilidad y la confianza...*

*Og Mandino*

---

---

# Contenido

ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 LIPASAS.....	3
2.1.1 Características generales.....	3
2.1.2 Estructura.....	4
2.1.3 Clasificación.....	5
2.1.4 Fuentes de obtención.....	10
2.1.5 Aplicación industrial.....	11
2.2 INMOVILIZACIÓN.....	14
2.2.1 Definición y consideraciones generales.....	14
2.2.2 Métodos de inmovilización de enzimas.....	16
2.2.2.1 Clasificación.....	16
2.2.3 Efecto en las propiedades fisicoquímicas de la enzima.....	19
2.2.3.1 Efecto de la inmovilización sobre la actividad lipolítica..	19
2.2.3.2 Efecto de la inmovilización sobre la estabilidad.....	21
2.2.4 Adsorción de lipasas.....	21
2.2.4.1 Características generales.....	22
2.2.4.2 Activación vía adsorción interfacial.....	23
2.2.4.3 Soportes para la inmovilización de lipasas.....	24
2.3 ANTECEDENTES.....	25
2.3.1 Microorganismo de estudio.....	25
2.3.2 Caracterización de la proteína lipolítica.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
4.1 Reactivos.....	28
4.2 Microorganismo y su conservación.....	29
4.3 Activación de la cepa.....	29
4.4 Verificación morfológica del microorganismo.....	29
4.5 Concentración del extracto crudo.....	30
4.6 Determinación de actividad lipolítica.....	30

4.7 Determinación de proteína.....	30
4.8 Inmovilización de la enzima.....	31
4.8.1 Evaluación de parámetros fisicoquímicos en la inmovilización...	31
4.9 Propiedades fisicoquímicas de la enzima libre e inmovilizada.....	33
4.9.1 Efecto del pH.....	33
4.9.2 Efecto de la temperatura .....	33
4.9.3 Estabilidad térmica de la enzima .....	33
4.9.4 Estabilidad en refrigeración .....	34
4.10 Estabilidad operacional del biocatalizador.....	34
4.11 Desorción de la proteína inmovilizada.....	34
4.12 Análisis de proteína con SDS-PAGE.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.1 Verificación morfológica de la cepa.....	36
5.2 Concentración del extracto crudo.....	37
5.3 Inmovilización de la enzima.....	38
5.3.1 Capacidad de adsorción de enzima en el soporte.....	39
5.3.2 Efecto del pH en la adsorción de enzima.....	41
5.3.3 Efecto de la temperatura en la adsorción de enzima .....	43
5.3.4 Efecto de la fuerza iónica del medio de reacción.....	45
5.3.5 Determinación del tiempo óptimo de inmovilización.....	47
5.4 Propiedades fisicoquímicas de la enzima libre e inmovilizada.....	49
5.4.1 Efecto del pH.....	49
5.4.2 Efecto de la temperatura.....	51
5.4.3 Estabilidad térmica de la enzima.....	53
5.4.4 Estabilidad en refrigeración.....	55
5.4.5 Activación de la enzima inmovilizada.....	56
5.5 Estabilidad operacional del biocatalizador.....	58
5.6 Perfil electroforético de la proteína inmovilizada.....	60
6. CONCLUSIONES.....	61
ANEXO	
I. Método utilizado para medir actividad lipolítica.....	62
II. Curva patrón de proteína.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67

**ABREVIATURAS**

ABS	Albúmina Sérica Bovina
BHI	Infusión cerebro corazón
CHES	2-(ciclohexilamino) ácido etanosulfónico
KDa	Kilodaltones
<i>o</i> -NF	<i>o</i> -nitrofenol
<i>o</i> -NFL	<i>o</i> -nitrofenil laurato
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PP	Polipropileno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio

**RESUMEN**

Las lipasas constituyen un grupo de enzimas que tienen un gran potencial biotecnológico, ya que pueden catalizar reacciones de hidrólisis/síntesis dependiendo de las condiciones que presente el medio de reacción. La variedad de aplicaciones industriales generadas en los últimos años es el resultado de la comprensión de su estructura y la forma en como efectúan su catálisis. Por lo tanto, su amplia versatilidad demanda la necesidad de mejorar su estabilidad operacional y la capacidad de reutilización de la misma, por lo que una técnica simple pero efectiva, como la inmovilización, se ha usado para retener su actividad catalítica.

El objetivo del presente trabajo fue inmovilizar la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 y comparar las propiedades catalíticas del biocatalizador obtenido con las de la enzima en forma libre. Esta lipasa fue estudiada anteriormente en el grupo de trabajo y presentó características poco comunes (actividad lipolítica a altos valores de temperatura y pH bajo las condiciones de ensayo). En primera instancia fue necesaria la verificación morfológica de la cepa para producir la enzima en gran cantidad y después, mediante un proceso de semipurificación, se obtuvo la enzima que se usó para todo el estudio, la que se preservó liofilizada. Para realizar la inmovilización se utilizó un soporte denominado Accurel® MP1000 y se variaron condiciones a fin de encontrar las óptimas para la adsorción de proteína. La mejor concentración de carga de proteína en el soporte fue 2 mg/mL, mientras que la temperatura de refrigeración resultó favorable para llevar a cabo de inmovilización. Se estudiaron el efecto del pH y la concentración del amortiguador que contiene el extracto crudo y se obtuvieron valores óptimos de 9.0 y 50 mM, respectivamente. El tiempo óptimo de inmovilización resultó de 5h para tener un biocatalizador eficiente. Por otro lado, se compararon las propiedades catalíticas de la enzima libre con las del biocatalizador, y se determinó inicialmente su perfil de actividad respecto a pH. La actividad del biocatalizador resultó mayor a valores de pH's ácidos, aunque el método para determinar actividad no permitió realizar ensayos a pH's mayores de 10.0. Por su parte, al comparar el perfil de actividad respecto a temperatura, la enzima libre incrementó considerablemente su actividad a valores por arriba de 50 °C, en tanto que el registrado en el caso del biocatalizador fue menor, sin embargo a temperaturas inferiores a 50°C el biocatalizador presenta mayor actividad. También se observó un fenómeno de activación de la enzima inmovilizada, ya que comparando su actividad catalítica con la enzima libre a las mismas condiciones de ensayo, se obtiene

un incremento de actividad del 56%. El biocatalizador permitió mantener la estabilidad térmica, ya que disminuyó sólo 20% de su actividad inicial al incubarlo 30 min a 100°C, mientras que la enzima libre disminuyó 80%. En la estabilidad en almacenamiento no hubo diferencia significativa cuando se mantuvieron a 4°C durante 15 días. El biocatalizador permitió sólo dos ciclos de hidrólisis sucesivas en las condiciones de ensayo, lo que indica que no se logró mantener adecuadamente la estabilidad operacional. El análisis electroforético de la(s) proteína(s) responsables de la actividad lipolítica no permitió distinguir la enzima adsorbida, ya que se observaron las mismas bandas tanto en la muestras desorbidas como en el extracto crudo.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas se encuentran en todo tipo de sistemas biológicos como animales, plantas y microorganismos. En contraste con las de plantas y animales, las lipasas microbianas extracelulares pueden ser producidas en gran cantidad por fermentación [60]. Con el avance de la tecnología enzimática han sido identificadas nuevas aplicaciones biotecnológicas para lipasas en diversas industrias. Particularmente, en la industria alimentaria las lipasas tienen diversos usos, entre los que se encuentran: hidrólisis de grasas, síntesis de aromas, emulsificantes, modificación de grasas y aceites [58, 59].

Las lipasas se usan frecuentemente en forma de extracto crudo de proteína como catalizadores para varias reacciones, por lo que su tiempo de vida y/o selectividad pueden verse afectados debido a la presencia de otras enzimas que se encuentren en el mismo medio, de ahí que se recomienda trabajar con enzimas puras, aunque la purificación implica un mayor costo [21]. Una alternativa para mejorar económica y eficientemente el uso de las lipasas puede ser su inmovilización en un soporte. No obstante, es importante determinar el método de inmovilización más conveniente, ya que éste puede afectar sus propiedades catalíticas [41]. Entre las ventajas de las enzimas inmovilizadas comparadas con las enzimas libres están la posibilidad de reutilización (lo que disminuye el costo del proceso), una mayor recuperación del producto formado y la fácil separación de la enzima del sistema de reacción [7, 20, 59, 49].

En el presente trabajo se pretende inmovilizar la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, microorganismo estudiado en el grupo de trabajo [17, 64], que produce una lipasa con características poco comunes (actividad lipolítica a altos valores de temperatura y pH, bajo las condiciones de ensayo), que la hacen propicia para competir con las lipasas comerciales inmovilizadas.

Existe un gran número de publicaciones que sugieren que los materiales hidrofóbicos son convenientes como soportes para inmovilización de lipasas y que los biocatalizadores obtenidos son eficientes tanto en reacciones de hidrólisis como en síntesis [1,11,19,20,27,39,59]. Particularmente, el método de adsorción es ampliamente utilizado por ser sencillo, barato y generalmente no cambiar la especificidad enzimática, ya que no provoca cambios drásticos en la estructura de la proteína. La eficiencia de la adsorción dependerá de parámetros físicos, como el tamaño de la proteína y la naturaleza y área específica del soporte [2,3,12,63]. Para llevar a cabo la inmovilización se propone la utilización de un polvo microporoso a base de polipropileno, de naturaleza hidrofóbica, llamado Accurel® MP1000. Con el biocatalizador se espera mejorar tanto las características catalíticas de la enzima como su estabilidad térmica y operacional. En la tabla 1 se muestran las propiedades físicas del soporte bajo investigación.

**Tabla 1 Propiedades físicas del soporte ACCUREL® MP1000**

PROPIEDAD	DESCRIPCIÓN
Apariencia	Polvo blanco
Tamaño del polímero	<1500 $\mu\text{m}$
Tamaño de los poros	5-20 $\mu\text{m}$
Porosidad*	75%
Densidad	100-120 kg/m <sup>3</sup> ,
Capacidad máxima de aditivo**	70% (w/w)

\***Porosidad:** La relación entre el volumen del poro total y el volumen de una partícula de polímero en %.

\*\***Capacidad máxima de aditivo:** La relación entre el peso del aditivo adsorbido en el polímero y el peso total del biocatalizador en % (w/w).

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 LIPASAS**

El número de lipasas disponibles se ha incrementado considerablemente desde 1990. Este resultado se debió a las numerosas investigaciones realizadas sobre la elucidación de su estructura y en la clonación y expresión de enzimas de microorganismos, lo que llevó a la comprensión de sus propiedades catalíticas y, con ello, a la demanda de estos biocatalizadores.

Antes de los 90's, el uso de las lipasas era la modificación de triglicéridos y su incorporación en detergentes; sin embargo, las investigaciones originaron diferentes aplicaciones en las industrias de alimentos, papel, farmacéutica y en los últimos años ha tenido gran relevancia en la síntesis de compuestos ópticamente puros, al exhibir muy buena estabilidad en un amplio rango de disolventes orgánicos y además, no necesitar cofactores para su catálisis. Actualmente es posible que más de 1000 diferentes compuestos puros sean sintetizados eficientemente por lipasas [7,13,29].

#### **2.1.1 Definición y características generales.**

Las lipasas (triacilglicerol ester hidrolasas E.C.3.1.1.3) son hidrolasas que en condiciones acuosas actúan sobre el enlace éster carboxílico presente en los triacilgliceroles, para liberar ácidos grasos y glicerol. El sustrato natural de las lipasas son triacilgliceroles de cadena larga, que tienen muy baja solubilidad en agua y su catálisis sucede en una interfase aceite-agua, a diferencia de las carboxil esterases que prefieren sustratos solubles en agua y de cadena corta [14]. En presencia de bajas concentraciones de agua, las lipasas tienen la capacidad de llevar a cabo la reacción

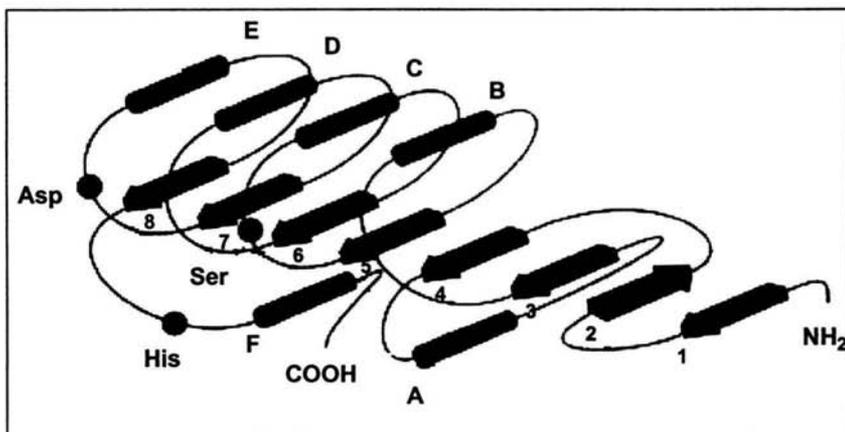
inversa, la síntesis. Además de la actividad lipolítica, poseen actividad esterolítica y por lo tanto, actúan sobre una gran diversidad de sustratos, si bien tienen gran especificidad química-, regio- y enantioselectiva [29,33, 34].

Jaeger y col., (1999) [33] introdujeron dos criterios para considerar a una enzima lipolítica como lipasa “verdadera”:

- a) Ser activada cuando se encuentre en presencia de una interfase, es decir, su actividad debe incrementarse notablemente cuando el sustrato forme una emulsión, fenómeno denominado activación interfacial;
- b) Presentar un oligopéptido cubriendo el sitio activo de la enzima (“lid”), que al contacto con la interfase se retire del mismo y permita la entrada del sustrato para llevar a cabo la catálisis.

### 2.1.2 Estructura

Los estudios realizados a principios de los 90's con cristalografía de rayos X, ayudaron a elucidar la estructura de las lipasas y, con ello, comprender su funcionalidad. El patrón común de plegamiento de todas las lipasas es una estructura  $\alpha/\beta$  hidrolasa (figura 2.1.2), también encontrada en esterasas, proteasas y haloperoxidasas [13]. Consiste en una estructura central  $\beta$  con 8 hojas paralelas, excepto la segunda (antiparalela). Las secciones  $\beta_3$  a  $\beta_8$  están conectadas con  $\alpha$ -hélices, las cuales están unidas a cada lado de la hoja  $\beta$  central [33]. El sitio activo está formado por una tríada catalítica (Ser-Asp/Glu-His), donde el aminoácido principal y nucleofílico (serina), se encuentra localizado en el carboxilo terminal de la hoja  $\beta$ -5. [31]. Generalmente en el residuo serina también se encuentra una secuencia pentapéptídica altamente conservada de Gly-X1-Ser-X2-Gly, excepto en las lipasas de *Bacillus* donde el pentapéptido conservado es Ala-X1-Ser-X2-Gly.



**Fig.2.1.2** Representación esquemática de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Las hojas  $\beta$  (1-8) se muestran como flechas y las  $\alpha$ -hélices (A-F) como cilindros. La posición de los aminoácidos de la triada catalítica se muestra en círculos.

( Fuente: Bornscheuer y col., 2002 )

### 2.1.3 Clasificación

Arpigny y Jaeger (1999) [5] clasificaron más de 50 esterasas y lipasas de bacterias agrupándolas en 8 familias basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos y sus propiedades biológicas, aunque se han hecho varias extensiones a la clasificación original [22,30,34,44,62]. La enzima lipolítica Lip C de *Pseudomonas aeruginosa* se añadió a la subfamilia I.1, mientras que las esterasas de Lip B de *Bacillus subtilis* y la de *Bacillus licheniformis* fueron añadidas a la subfamilia I.4; la subfamilia I.5, que contenía lipasas de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*, ahora contiene exclusivamente lipasas termofílicas de especies de *Bacillus* ahora llamadas *Geobacillus*, mientras que las lipasas de *Staphylococcus* ahora constituyen la subfamilia I.6, quedando *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. epidermidis* y además se han adicionado *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. warneri*. Finalmente las lipasas de *Propionibacterium acnes* y *Streptomyces cinnamomeus* que formaban la subfamilia I.6, ahora constituyen la nueva subfamilia I.7 (Tabla 2.1.3).

**Familia I** Comprende un total de 30 enzimas que a su vez se dividen en 7 subfamilias:

- Subfamilia I.1: su peso molecular aproximado es de 30-32 kDa, además de ser secretadas por la vía tipo II.
- Subfamilia I.2: caracterizadas por tener un peso molecular de aproximadamente 33 kDa debido a una inserción en la secuencia de aminoácidos que forma una doble hoja  $\beta$ -antiparalela en la superficie de la molécula.
- Subfamilia I.3: su peso molecular es grande (*Pseudomonas fluorescens*, 50 kDa; *Serratia marcescens*, 65 kDa), no contienen el péptido señal en el N-terminal ni tampoco residuos de cisteína. La secreción de este tipo de enzimas ocurre en un solo paso a través de la vía tipo I (también llamada exportador ABC).
- Subfamilia I.4: las lipasas conocidas de *Bacillus* tienen en común que el residuo de Ala es reemplazado por la primera glicina en el pentapéptido conservado, quedando: Ala-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly. Son las lipasas “verdaderas” más pequeñas (aproximadamente 19 kDa) conocidas hasta ahora. También se adicionaron a esta subfamilia dos esterasas: *Bacillus subtilis* LipB y *Bacillus licheniformis* [21,44].
- Subfamilia I.5: la similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas lipasas es más de 91%, con masas moleculares de aproximadamente 43 kDa. Poseen 2 residuos de cisteína que participan en la formación de un enlace disulfuro responsable de la estabilidad térmica de la enzima.
- Subfamilia I.6: su peso molecular es de aproximadamente 75 kDa. Las lipasas de *Staphylococcus* presentan gran similitud en su secuencia de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas, además de ser secretadas como precursores. Entre las lipasas verdaderas, la de *Staphylococcus hyicus* es la única que presenta una actividad fosfolipídica considerable.

- Subfamilia I.7: su región central es aproximadamente 50% similar comparándolas con las lipasas de *Bacillus subtilis* y las de la subfamilia I.2. Sin embargo no hay similitud entre la lipasa de *Streptomyces cinnamoneus* y otras de *Streptomyces* conocidas hasta ahora.

**Familia II (GDSL)** No presentan el pentapéptido general sobre el residuo de la serina, sino que presentan un motivo secuencia Asp-Ser-(Leu)[GDS(L)]. En estas proteínas es importante que los aminoácidos tiendan a estar más cerrados para el N-terminal que en otras enzimas lipolíticas.

**Familia III** Exhiben un plegamiento ortodoxo de  $\alpha/\beta$  hidrolasa y contienen una típica triada catalítica. También muestran aproximadamente 20% de similitud en su secuencia de aminoácidos con isoformas intracelulares y plasmáticas del PAF-AH humano (proteínas monoméricas).

**Familia IV (HSL)** Exhiben una considerable similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a la HSL de mamíferos (lipasas sensibles a hormonas). La propiedad que originó la clasificación de esta familia fue la actividad relativamente alta a temperaturas bajas (menos de 15°C) retenida por la HSL y la lipasa de *Moraxella sp.*

**Familia V** Proceden de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*), así como psicrófilas (*Moraxella sp.*, *Psychrobacter immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Estas bacterias con enzimas no lipolíticas comparten una considerable similitud en su secuencia de

aminoácidos (20-25%). Poseen la estructura  $\alpha/\beta$  hidrolasa así como la triada catalítica y son llamadas epoxi hidrolasas, dehalogenasas y haloperoxidasas.

**Familia VI** Con un peso molecular de aproximadamente 23-26 kDa, las enzimas de esta familia son las esterasas más pequeñas conocidas actualmente. Tienen gran especificidad con sustratos pequeños y no presentan actividad con triglicéridos de cadena larga. Exhiben aproximadamente 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos comparadas con lisofosfolipasas eucarióticas (fosfolipasas independientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

**Familia VII** Tienen un peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Comparten un 40% de similitud con las eucarióticas acetilcolin esterasa y la carboxilesterasa del hígado/intestino. Estas proteínas no han sido bien caracterizadas.

**Familia VIII** Exhiben una similitud considerable con varias  $\beta$ -lactamasas clase C. Estas esterasas han sido identificadas con un motivo consenso Gly-X1-X2-Leu. Es necesaria más información estructural para describir claramente esta familia de esterasas.

**Tabla 2.1.3 Clasificación bacteriana de enzimas lipolíticas**  
( Fuente: Jaeger y Arpigny, 1999; Jaeger y Eggert, 2002 )

Familia	Sub-familia	Especie productora	No. de acceso	Similitud* (%)		Propiedades
				Familia	Sub-familia	
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipA)	U50587	100		Lipasa verdadera
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95		Lipasa verdadera
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57		Lipasa verdadera
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LipC)	U75975	51		Lipasa verdadera
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43		Lipasa verdadera
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40		Lipasa verdadera
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U89907	39		Lipasa verdadera
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38		Lipasa verdadera
		2	<i>Burkholderia glumae</i>	X70354	35	100
	<i>Chromobacterium viscosum</i>		Q05489	35	100	Lipasa verdadera
	<i>Burkholderia capacia</i>		M58494	33	78	Lipasa verdadera
	<i>Pseudomonas luteola</i>		AF050153	33	77	Lipasa verdadera
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIKW1	D11455	14	100	Lipasa verdadera
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	51	Lipasa verdadera
	4	<i>Bacillus subtilis</i> (LipA)	M74010	16	100	Lipasa verdadera
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80	Lipasa verdadera
		<i>Bacillus licheniformis</i>	U35855	13	80	Esterasa
		<i>Bacillus subtilis</i> (LipB)	C69652	17	74	Esterasa
	5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> L1	U78785	15	100	Lipasa verdadera
		<i>Geobacillus stearothermophilus</i> P2	AF237623	15	94	Lipasa verdadera
		<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94	Lipasa verdadera
		<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	AF134840	14	92	Lipasa verdadera
	6	<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	100	Lipasa verdadera
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	AF096928	15	45	Lipasa verdadera
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	44	Lipasa verdadera
		<i>Staphylococcus hyicus</i> **	X02844	15	36	Lipasa verdadera
		<i>Staphylococcus xylosus</i>	AF208229	14	36	Lipasa verdadera
		<i>Staphylococcus warneri</i>	AF208033	12	36	Lipasa verdadera
7	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100	Lipasa verdadera	
	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	U80063	14	50	Lipasa verdadera	
II (GDLSL)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	100		Aciltransferasa secretada	
	<i>Streptomyces scabies</i>	M57297	36		Esterasa secretada	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	35		Esterasa unida a membranas externas	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	28		Esterasa unida a membranas externas	
	<i>Photobacterium luminescens</i>	X66379	28		Esterasa secretada	
III	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	M86351	100		Lipasa extracelular	
	<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82		Lipasa extracelular	
	<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33		Esterasa extracelular 1	
IV (HSL)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	100		Esterasa	
	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	54		Lipasa	
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	48		Carboxilesterasa	
	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	40		Lipasa putativa	
	<i>Escherichia coli</i>	AE000153	36		Carboxilesterasa	
	<i>Moraxella</i> sp.	X53868	25		Lipasa extracelular 2	
V	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	100		PHA-depolimerasa	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	41		Esterasa putativa	
	<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	34		Esterasa extracelular	
	<i>Moraxella</i> sp.	X53869	34		Esterasa extracelular 3	
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	32		Esterasa	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	20		Esterasa		
VI	<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	100		Carboxilesterasa	
	<i>Spirulina platensis</i>	S70419	50		Carboxilesterasa	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S79600	24		Carboxilesterasa	
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	20		Carboxilesterasa	
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	16		Carboxilesterasa	
VII	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Q01470	100		Hydrolasa carbamate	
	<i>Bacillus subtilis</i>	P37967	48		p-Nitrofenil esterasa	
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAA22794	45		Carboxilesterasa putativa	
VIII	<i>Arthrobacter globiformis</i>	AA099492	100		Esterasa estereoselectiva	
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	CAA78842	43		Esterasa unida a célula	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	AAC60471	40		Esterasa III	

\*Similitud en la secuencia de aminoácidos determinadas con el programa Megalign (DNASTar). La primer enzima lipolítica de cada familia se tomo arbitrariamente como 100%.

\*\*S. *hyicus* también exhibe una importante actividad fosfolipídica.

#### 2.1.4 Fuentes de obtención

Las lipasas se encuentran distribuidas en la naturaleza y son producidas por plantas, animales y microorganismos. Las lipasas de origen microbiano, principalmente bacterianas y fúngicas, son las más usadas en aplicaciones biotecnológicas. Una lista de lipasas producidas por bacterias se muestra en la tabla 2.1.4. Aunque existe un amplio número de lipasas bacterianas, sólo unas pocas son explotadas comercialmente. Entre los géneros de mayor importancia se encuentran *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Pseudomonas*. Esta última es ampliamente usada para una variedad de aplicaciones industriales [29, 48].

**Tabla 2.1.4 Bacterias productoras de lipasas**  
( Fuente: Gupta y col., 2004 )

Microorganismo productor	
<i>Achromobacter sp.</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>A. lipolyticum</i>	<i>Microthrix parvicella</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Moraxella sp.</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>A. radioresistens</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>A. denitrificans</i>	<i>P. avidium</i>
<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>P. granulosum</i>
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
<i>B. alcalophilus</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>B. atrophaeus</i>	<i>P. fragi</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>P. luteola</i>
<i>B. laterosporus</i>	<i>P. mendocina</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>P. nitroreducens var. thermotolerans</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>P. pseudomallei</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>P. wisconsinensis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Psychrobacter immobilis</i>
<i>B. thaiminolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. thermocatenulatus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>Burkholderia glumae</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>S. warneri</i>
<i>C. viscosum</i>	<i>S. xylosum</i>
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Streptomyces exfoliatus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

### 2.1.5 Aplicación industrial

Las lipasas microbianas atraen la atención debido a su potencial catalítico, que incluye diversas aplicaciones industriales. En los últimos años se han visto un incremento en el uso de lipasas en biotecnología en comparación con otras enzimas, resultado de la enorme investigación que se realiza, particularmente en la obtención de compuestos puros que, difícilmente son sintetizados por métodos tradicionales de catálisis.

Algunas de las aplicaciones de lipasas en diferentes industrias se describen a continuación:

**Industria de los detergentes:** La aplicación más importante para lipasas hidrolíticas es su adición en detergentes, los cuales son utilizados principalmente en hogares y lavanderías industriales. En 1994, *Novo Nordisk* introdujo la primera lipasa recombinante, Lipolase proveniente del del hongo *Thermomyces lanuginosus* y que fue expresada en *Aspergillus oryzae*. En 1995, dos lipasas bacterianas fueron introducidas al mercado, Lumafast proveniente de *Pseudomonas mendocina* y Lipomax procedente de *Pseudomonas alcaligenes*, ambas producidas por *Genecor Internacional* [32,59].

**Industria alimentaria:** Las lipasas son importantes para esta industria porque las grasas y aceites son componentes muy comunes en varios alimentos y por tanto, los ácidos grasos producidos debida a la acción hidrolítica de triglicéridos, pueden determinar la aparición de sabores y olores deseables o desagradables. Además, la posición, longitud y grado de insaturación de los triglicéridos influyen fuertemente no sólo en las propiedades físicas, sino también en el valor nutrimental de los alimentos. Por ejemplo, en la industria láctea se usan lipasas para la hidrólisis de la grasa de leche, la aceleración en la maduración de algunos quesos y la modificación de grasa en crema y mantequilla. Particularmente en la maduración de quesos la adición de lipasas que inicialmente liberan ácidos grasos de cadenas cortas (principalmente C4 y C6)

proporcionan un sabor suave, penetrante, mientras la liberación de ácidos grasos de cadenas medias (C12 y C14) tienden a impartir un sabor jabonoso en el producto [10].

**Industria farmacéutica:** La industria farmacéutica ha utilizado las lipasas para la síntesis de intermediarios por ejemplo, el alcohol endo-2-norborn-2-ol es un importante intermediario quiral para la preparación de algunas prostaglandinas, esteroides y nucleósidos carbocíclicos análogos. También la síntesis estereoespecífica de ésteres como el Naproxen, Ketoprofen y varios intermediarios son eficientemente llevados a cabo por lipasas [48,58,59].

**Industria química:** El control y la optimización de la estereoselectividad, las transformaciones sintéticas y resoluciones quirales, han destacado en esta área de biocatálisis. El resultado de la ineficiencia de los métodos tradicionales de control estereoquímico ha contribuido a que varios biocatalizadores sean utilizados en la actualidad a escala industrial (tabla 2.1.5). La estereoselectividad de lipasas ha sido usada para solucionar mezclas racémicas por ejemplo, el profeno, un medicamento antiinflamatorio es farmacológicamente activo en la forma enantiomérica (S) [58].

**Tabla 2.1.5.A Procesos estereoselectivos usados a escala industrial**

PROCESO	SUSTRATO	PRODUCTO	ENZIMA	ESCALA (Ton/año)	COMPAÑÍA
Resolución	Alcoholes racémicos	Alcoholes enantioméricos	Lipasa	1000	BASF
Resolución	Aminas racémicas	R y S-amidas	Lipasa	100	BASF
Resolución cinética	Aminoácidos racémicos	L-aminoácidos	Amidasa	100	DSM
Aminación	Ácido fumárico	L-ácido aspártico	Liasa	100	DSM

**Industria del papel:** El “pitch” es una resina de la madera compuesta de triglicéridos y ceras que causa pegajosidad en el proceso de obtención de papel, dando como resultados un papel disparejo y con huecos. Para evitar *Nipoon Paper Industries* en Japón, desarrolló un método que controla esta resina utilizando la lipasa de *Candida rugosa* que hidroliza más del 90% de los triglicéridos presentes [32].

**Industria cosmética:** Otro campo de importante aplicación, es el uso de lipasas en la industria cosmética. Esencialmente se debe a su actividad como surfactantes y la producción de aromas, los cuales son los principales ingredientes en cosméticos y perfumes. *Asahi-Electrochem* patentó dos ésteres de ácidos grasos que tienen numerosas aplicaciones en cosméticos, alimentos y medicinas [48].

Varios biocatalizadores de lipasas bacterianas han sido lanzados exitosamente al mercado en los últimos años. En la tabla 2.1.5 se enlistan algunas lipasas que se encuentran actualmente en el mercado.

**Tabla 2.1.5.B Lipasas comerciales de bacterias**  
( Fuente: Gupta y col., 2004 )

Nombre comercial	Microorganismo productor	Proveedor	Aplicación
Lumafast	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genecor International, USA	Detergentes
Lipomax	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Gist-Brocades, The Netherlands; Genecor International USA	Detergentes
N.E.	<i>Pseudomonas glumae</i>	Unilever, The Netherlands	Detergentes
N.E.	<i>Bacillus pumilus</i>	Solvay, Belgium	Detergentes
Chiro CLEC-PC, Chyrazyme L-1	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Altus Biologics, Manheim	Síntesis orgánica
Amano P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Síntesis orgánica
Lipase AH	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Síntesis orgánica
Lipase AK, YS	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Síntesis orgánica
Lipase 56P	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biocatalysts, UK	Biotransformaciones, Químicos
Lipase K-10	<i>Pseudomonas sp.</i>	Amano Pharmaceuticals, Japan	Síntesis orgánica
<i>Chromobacterium viscosum</i> lipase	<i>C. viscosum</i>	Asahi Chemical Biocatalysts	Síntesis orgánica
Lipase 50P	<i>C. viscosum</i>	Biocatalysts, UK	Biotransformaciones, Químicos
Lipase QL	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Síntesis orgánica
Lipoprotein lipase	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Investigación
Lipase PL, QU/QLL, PLC/PLG, QLC/QLG	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Grado técnico
Alkaline lipase	<i>Achromobacter sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Investigación
Lipase AL, ALC/ALG	<i>Achromobacter sp.</i>	Meito Sankyo Co., Japan	Grado técnico
Combizyme 23P (proteinase/lipase mix)	N.E.	Biocatalysts, UK	Tratamiento de residuos
Combizyme 61P (proteinase/lipase mix)	N.E.	Biocatalysts, UK	Tratamiento de residuos
Combizyme 209P (amylase/lipase/proteinase mix)	N.E.	Biocatalysts, UK	Tratamiento de residuos
Greasex (lipase)	N.E.	Novo Nordisk	Industria de Pieles

N.E. No especificada

## 2.2 INMOVILIZACIÓN

Los últimos años han visto el desarrollo de diferentes tecnologías que implican la utilización de enzimas de muy diversas maneras, la inmovilización de células y enzimas es una de ellas. La técnica de inmovilización no es un proceso nuevo, ya que se ha estudiado durante los últimos 30 años. La expansión de la biotecnología y el desarrollo de los avances en tecnología genética y biocatálisis, han revitalizado el entusiasmo para la inmovilización de enzimas.

Los biocatalizadores obtenidos tienen una gran variedad de usos ya que pueden ser añadidos o extraídos de la mezcla de reacción sin mayor dificultad, lo que permite un mejor control de la reacción así como su automatización [27].

### 2.2.1 Definición y consideraciones generales

La definición de inmovilización incluye todo aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, organelos, células, etc., por su unión a un soporte (Taylor, R. 1991). La inmovilización de enzimas pretende cumplir dos objetivos principales: 1) mejorar su estabilidad térmica y operacional y, 2) reutilizar la enzima para nuevas reacciones [1,7,12,41]. Si cumplen estos objetivos es fácil deducir las ventajas de las enzimas inmovilizadas comparadas con la enzima libre: a) la recuperación de la enzima y por lo tanto la reutilidad de la misma (aspecto muy importante desde el punto de vista económico); b) la separación fácil del biocatalizador de los reactivos y productos; c) la posibilidad de purificar la lipasa del extracto crudo; d) la posibilidad de hacer el proceso continuo (mediante reactores agitados o columnas empacadas). No obstante, como cualquier proceso, también tiene inconvenientes, entre los que están: a) la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo y por lo tanto la posible pérdida de actividad

enzimática; b) la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte [42]. Estos inconvenientes pueden minimizarse si se conocen las propiedades de la enzima y se elige el método y soporte adecuado antes de llevar a cabo la inmovilización. Bickerstaff, (1997) [12] sugirió algunos puntos fundamentales a considerar antes de realizar cualquier inmovilización (tabla 2.2.1).

**Tabla 2.2.1. Consideraciones para seleccionar el soporte y método de inmovilización ( Fuente: Bickerstaff, 1997 )**

PROPIEDAD	CONSIDERACIONES
<b>Física</b>	Fuerza, sin compresión de partículas, disponibilidad y extensa área superficial consecuencia del alto grado de porosidad, forma/figura del soporte (fibras/aguja/esferas), razonable distribución del poro, permeabilidad, densidad, espacio para incrementar la biomasa, flujo rápido y tolerancia de presión.
<b>Química</b>	Hidrofilicidad (enlace del agua-soporte), inerte a la enzima, disponibilidad de grupos funcionales para modificación y regeneración y/o reutilidad del soporte.
<b>Estabilidad</b>	Almacenamiento, actividad residual de la enzima, reutilidad al medir actividad enzimática, mantenimiento de la viabilidad de la enzima y estabilidad mecánica del soporte.
<b>Resistencia</b>	Al ataque de microorganismos, a la alteración por compuestos químicos, pH, temperatura, disolventes orgánicos, proteasas.
<b>Seguridad</b>	Biocompatibilidad, toxicidad del reactivo que lo compone, salud y seguridad para el producto final, especificación de la preparación inmovilizada (aprobado como GRAS) para alimentos y aplicación farmacéutica y médica.
<b>Económica</b>	Disponibilidad y costo del soporte, equipo especial, reactivos, técnica utilizada, impacto en el medio ambiente, facilidad de operarlo a escala industrial, procesamiento continuo, vida media del biocatalizador eficiente, poca o nula contaminación (enzima libre-biocatalizador-producto).
<b>Reacción</b>	Flujo rápido, capacidad de enlazamiento enzima-soporte, productividad catalítica, sistemas múltiples (con diferentes tipos de reactores) y cuidado en los efectos difusionales o transferencia de masa de cofactores, sustratos y productos.

## 2.2.2 Métodos de inmovilización de enzimas

La proliferación de la metodología de inmovilización de enzimas condujo a la clasificación de métodos de inmovilización, los cuales involucran un diferente grado de complejidad y eficiencia. Estas estrategias actualmente están bien establecidas y se cuenta con una extensa literatura que describe el tema [6,12,37,39,59].

En este trabajo solamente se presenta una breve descripción de los principales métodos de inmovilización (con excepción del método de adsorción). Malcata y col., (1990) [39] y más recientemente Villeneuve y col., (2000) [63], proveen un análisis más detallado sobre el tema.

### 2.2.2.1 Clasificación

Diversos autores han propuesto de manera muy general la clasificación de los métodos de inmovilización; una muy razonable es la propuesta por Kourkoutas y col., (2004) [37] que divide en cuatro categorías el mecanismo y/o interacción física entre la enzima-soporte: a) unión sobre una superficie sólida; b) atrapamiento en una matriz porosa; c) agregación por floculación (natural) o con agentes entrecruzantes (inducido); d) inclusión en membranas (figura 2.2.2.1).

- **Inmovilización sobre una superficie sólida.** Estos métodos son llevados a cabo por la adsorción física debida principalmente a interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y covalentes de la enzima sobre el soporte. Estas técnicas son muy populares ya que son fáciles de realizar. No obstante, la elección del soporte y tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Por lo tanto la fuerza con la cual la enzima se une al soporte dependerá del tipo y número de enlaces.

- **Atrapamiento en una matriz porosa.** Este método se basa en la inclusión de la enzima en una red rígida, impidiendo su difusión a la mezcla de reacción, aunque permite la transferencia de masa de reactivos y productos. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Posteriormente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. Desde el punto de vista experimental es muy sencillo y, como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración estructural. La transferencia de masa es el punto crítico importante que se deberá tomar en cuenta para obtener resultados eficientes.
- **Floculación (agregación).** La floculación ha sido definida como la agregación de enzimas para formar una unidad grande o bien, la propiedad que tiene una enzima en suspensión para adherirse en grupos y sedimentar rápidamente [37]. La capacidad de formar agregados es frecuente en lipasas. En la floculación artificial (inducida), también llamada entrecruzamiento, se utilizan reactivos bifuncionales que originan uniones entre las moléculas de la enzima con la consecuente agregación. Como resultado se tienen enzimas con enlaces intermoleculares capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura [7].
- **Inclusión en membranas.** En esta técnica las enzimas están rodeadas por una membrana semipermeable que permite el paso de reactivos y productos pero no de enzima. La inmovilización se puede lograr por el uso de membranas microporosas, por atrapamiento de la enzima en una microcápsula (1-100  $\mu\text{m}$  de diámetro) o bien, por la interacción de la superficie de dos líquidos inmiscibles. Este tipo de inmovilización es ideal cuando la transferencia de masa es mínima.

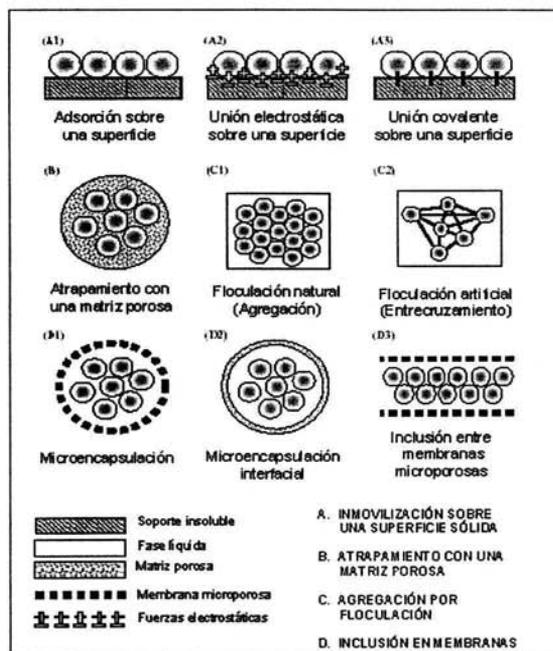


Fig. 2.2.2.1. Métodos básicos de inmovilización de enzimas  
( Fuente: Kourkoutas y col., 2004 )

### 2.2.3 Efecto en las propiedades fisicoquímicas de la enzima

Cuando una enzima es inmovilizada, su actividad catalítica es diferente a la de la enzima libre, por lo que la principal preocupación es obtener un biocatalizador con una estabilidad y actividad que no afecte el proceso de catálisis [43].

#### 2.2.3.1 Efecto de la inmovilización sobre la actividad lipolítica

La inmovilización está dirigida a inducir cambios en el microentorno de la enzima provocando cambios en sus propiedades fisicoquímicas, que finalmente puede trascender en su actividad catalítica. Las causas del cambio en la actividad de la enzima son muchas, pero es posible identificar tres principales: efectos conformacionales, transferencia de masa y efectos electrostáticos [7,41].

**Efectos conformacionales.** Durante la inmovilización la estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez, consiguiendo a su vez mejor resistencia a la inactivación térmica o química. La estabilidad de la enzima mejora cuando intervienen enlaces covalentes.

**Efecto de transferencia de masa o difusionales.** La reacción que catalizan las lipasas puede ser afectada por restricciones en la transferencia de masa. El sustrato debe difundirse dentro de la estructura del soporte, a través de su capa superficial y además, reaccionar con la proteína. Una vez que los productos han sido liberados por la enzima, deben difundirse a través del poro y alejarse de la superficie del soporte [41]. Los efectos difusionales pueden clasificarse en dos tipos:

*Los efectos difusionales internos.* Se denomina así al transporte del sustrato y producto liberados dentro de la matriz porosa del soporte y se afectan por el tamaño, profundidad y topografía del mismo. Cuando la velocidad de difusión interna es más baja que la velocidad de conversión de sustrato a producto la reacción se limita, es decir, el sustrato no está lo suficientemente disponible para la cantidad de enzima presente. Estos problemas se pueden reconocer cuando al comprimir el soporte se incrementa la actividad catalítica, ya que tal compresión disminuirá el camino que el sustrato tendrá que recorrer para llegar a la enzima. Los efectos de difusión internos pueden ser reducidos por la disminución del tamaño de partícula del soporte, el incremento del tamaño del poro, utilizando sustratos con pesos moleculares bajos y aumentando la concentración del sustrato.

*Los efectos difusionales externos.* Se deben a la presencia de una capa de líquido inmóvil alrededor de la partícula de enzima inmovilizada (capa de Nernst). En el caso de lipasas que se inmovilizan en soportes hidrofóbicos y usan sustratos hidrofóbicos como triacilgliceroles, la concentración del sustrato en la capa de Nernst es más concentrada que en el resto de la solución, debido a que el sustrato hidrofóbico tiende a la partición interna del soporte. Si la velocidad de conversión catalítica sobrepasa la velocidad de difusión de reactivo en esta capa, la concentración de reactivo en la superficie será más bajo que en la solución. El espesor de esta capa se correlaciona con las propiedades de flujo de la solución alrededor de la partícula. Por lo tanto, para reducir los efectos difusionales externos se tiene que reducir el grosor de la capa de Nernst mediante el incremento en la agitación o flujo en el reactor.

**Efectos electrostáticos.** Si el soporte y el sustrato poseen la misma carga, entonces experimentarán repulsión, mientras que si presentan cargas opuestas, serán atraídas.

Este factor puede tener un efecto sobre la  $K_m$ . También las cargas pueden tener un impacto sobre otros componentes en la reacción aunque evidentemente, estos efectos sólo tienen importancia cuando se usan soportes cargados electrostáticamente.

### **2.2.3.2 Efecto de la inmovilización sobre la estabilidad**

El aumento en la estabilidad es citado comúnmente como una ventaja en la inmovilización enzimática. Generalmente la estabilidad de una enzima inmovilizada dependerá de la fuerza del método de inmovilización y la susceptibilidad a inactivación de la enzima, la que puede ser causada por contaminantes en la mezcla de reacción, cambios en la temperatura, pH, fuerza iónica, daños de ruptura como consecuencia de la fuerza mecánica [41].

Se ha observado que las enzimas inmovilizadas son menos sensibles al efecto negativo de la temperatura debido a que su estructura es más rígida después de la inmovilización [19,40,43,46,47,]. Por consiguiente, para usar un biocatalizador en una aplicación industrial, será necesario evaluar la vida media del mismo, en las condiciones de reacción .

### **2.2.3 Adsorción de lipasas**

La adsorción de lipasas sobre soportes hidrofóbicos es un método de inmovilización usado desde los años 70's, sin embargo, fue a mediados de los 90's cuando vuelve a resurgir con ímpetu, debido al aumento en el número de aplicaciones comerciales que demandan un biocatalizador más eficiente y tener un proceso más rentable.

### 2.2.3.1 Características generales

La adsorción es un método económico y simple para inmovilización de lipasas e involucra la interacción entre la superficie de un soporte y la enzima. Entre las fuerzas involucradas en la adsorción están las interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, sin embargo, estas últimas son las responsables de que la inmovilización se lleve a cabo [12]. El número y naturaleza de estos enlaces y, por lo tanto, la carga de la superficie, es controlado por el punto isoeléctrico de la proteína y el pH al cual ocurre la inmovilización. La principal fuente de grupos cargados sobre la superficie de la proteína son lisina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico, que están cargados a pH neutro.

El procedimiento de inmovilización consiste básicamente en mezclar el componente biológico (extracto crudo) y el soporte (con propiedades para adsorber la lipasa), bajo las condiciones convenientes de pH, temperatura, fuerza iónica y sobre todo, un periodo de incubación, seguido por la recolección del material inmovilizado (biocatalizador) y, finalmente un lavado para remover los componentes biológicos no enlazados. [23,39,41].

El grado de inmovilización depende de varias condiciones que incluyen pH, temperatura, tipo de disolvente, fuerza iónica y concentración de proteína en la mezcla de reacción. Además de las ventajas de la inmovilización, el método de adsorción presenta las siguientes características: a) el daño que sufre la enzima es pequeño; b) el proceso es simple, económico y rápido para realizar la inmovilización; c) no hay cambios químicos en el soporte y/o enzima; d) reversible para permitir la regeneración con enzima fresca. Sin embargo, presenta los siguientes inconvenientes: a) la unión al soporte es débil; b) el enlace no es específico; c) si excede la concentración de proteína

a inmovilizar, se origina una sobrecarga en el soporte y con ello la disminución de la actividad catalítica. La mayor desventaja asociada con la adsorción es la fuerza de la interacción, que es débil y origina la desorción de la enzima al manejar el biocatalizador y como consecuencia la pérdida de actividad y la contaminación del producto [9]. Por lo tanto, factores físicos como velocidad de flujo, agitación y abrasión de partícula-partícula, son determinantes para que se presente la desorción.

### **2.2.3.2 Activación de lipasas vía adsorción interfacial**

En medio acuoso, las lipasas se encuentran principalmente en una conformación cerrada o inactiva, en donde el sitio activo se encuentra aislado del medio de reacción por una cadena oligopeptídica. Sarda y Desnuelle (1958) [57], fueron los primeros en identificar que la actividad enzimática de las lipasas se incrementa en una interfase aceite-agua. Aunque las lipasas son hidrofílicas (se disuelven en medio acuoso), pueden modificar su conformación y con facilidad unirse al sustrato hidrofóbico. Cuando una lipasa es incubada en un sistema que contiene una interfase sólida, se observa un aumento en su actividad lipolítica. Este comportamiento fue atribuido al aumento en la concentración de sustrato localizado en la vecindad de la enzima. Fernandez-Lafuente y col., (1998) [23], postularon que la causa principal de la hiperactivación de una enzima es la interacción del oligopéptido que cubre su sitio activo con el sustrato hidrofóbico.

### 2.2.3.3 Soportes para inmovilización de lipasas

La efectividad del proceso de inmovilización depende de la estructura interna del soporte. Si se usa uno con poros pequeños, la mayoría de las lipasas serán inmovilizadas sobre la superficie del soporte, lo cual evita limitaciones en la transferencia de masa interna. Por el contrario, si se utiliza un soporte con poros grandes, algunas lipasas serán inmovilizadas en el interior del poro, lo cual puede evitar el acceso del sustrato para otras lipasas. Se encontró que para el caso de las lipasas se han utilizado vidrios, membranas y fibras, tal y como lo reportan Malcata y col., (1990) [39], quienes sugieren que los materiales hidrofóbicos son convenientes como soportes para inmovilización de lipasas. En general, los procedimientos experimentales para la adsorción de lipasas utilizan soportes hidrofóbicos que tienen que activarse mediante un pretratamiento antes llevar a cabo la adsorción; por ejemplo, los polvos de polipropileno tienen que ser prehumedecidos con disolventes polares como etanol, isopropanol, metanol, acetona o tetrahidrofurano antes del proceso de adsorción [15,27,39]. Foresti y Luján (2004) [25], han estudiado detalladamente la influencia del etanol sobre la actividad del biocatalizador. En su publicación concluyen que, además de disminuir la naturaleza hidrofóbica del polipropileno, el pretratamiento con etanol origina un biocatalizador más uniforme, mayor eficiencia de adsorción y mayor recuperación del sólido; sin embargo un periodo largo de pretratamiento produce partículas con poca cantidad de lipasa adsorbida. Además, el tamaño y/o homogeneidad del soporte es importante tanto al inicio como al final de la inmovilización. Existen otros estudios de inmovilización de lipasas con diferentes soportes, entre los que se encuentran: Celite, Duolite, Cellulose, Avicel, Clay, Kaolín, Titania, Nylon, Sepharose, Sephadex, Estireno-divinilbenzeno, Polietilenglicol, Xerogels, Sepa Beads, carbón activado, vidrios porosos, sílica gel, polvos de polipropileno, poli-vinilalcohol, [8,20,23,27,36,39,45,63].

## 2.3 ANTECEDENTES

### 2.3.1 Microorganismo de estudio

En 1995 Bustos-Jaimes [17] llevó a cabo el aislamiento de un microorganismo lipolítico, en las aguas termales de Los Azufres, Michoacán. El microorganismo encontrado fue identificado como *Bacillus pumilus* y la cepa se denominó GMA1. En la tabla 2.3.1 se observa el patrón de fermentación de carbohidratos y algunas pruebas bioquímicas, en donde es importante resaltar su actividad hidrolítica (xilanolítica y proteolítica). Además, se encontró que el microorganismo produce una lipasa con características interesantes respecto a su pH y temperatura, ya que sus óptimos son 10.5 y 50 °C, respectivamente.

**Tabla 2.3.1 Caracterización bioquímica de *Bacillus pumilus* GMA1 (Fuente: Bustos-Jaimes, 1995)**

Carbohidrato	Resultado	Carbohidrato	Resultado
Glicerol	(+)	Hidrólisis de xilano	(+)
Ribosa	(+)	D-arabinosa	(-)
$\beta$ -metil-D-Xilósido	(-)	L-Xilosa	(+)
Mannosa	(+)	Glucosa	(+)
Inositol	(+)	Rhamnosa	(-)
$\alpha$ -Metil-D-Glucósido	(+)	Sorbitol	(-)
Esculina	(+)	Amigdalina	(+)
Lactosa	(+)	Celobiosa	(+)
Inulina	(-)	Sacarosa	(+)
Glicógeno	(-)	Rafinosa	(-)
D-Lixosa	(-)	Gentiobiosa	(+)
D-Arabitol	(-)	D-Fucosa	(-)
5-Ceto-gluconato	(-)	Gluconato	(-)
Arginina dihidrolasa	(-)	Catalasa	(+)
Producción de H <sub>2</sub> S	(-)	Ornitina descarboxilasa	(-)
Producción de acetoina	(+)	Triptofano desamidasa	(+)
Lipasa	(+)	Reducción de nitratos	(-)
Eritritol	(-)	L-Arabinosa	(+)
D-Xilosa	(+)	Adonitol	(-)
Galactosa	(-)	Fructosa	(+)
Sorbosa	(-)	Dulcitol	(-)
Manitol	(+)	$\alpha$ -Metil-D-Mannósido	(-)
N-Acetil-glucosamina	(-)	Arbutina	(+)
Salicina	(+)	Maltosa	(+)
Melibiosa	(-)	Trehalosa	(+)
Melezitosa	(-)	Almidón	(-)
Xilitol	(-)	D-Turanosa	(-)
D-Tagatosa	(+)	L-Fucosa	(-)
L-Arabitol	(-)	2-Ceto-gluconato	(-)
Tinción de gram	(+)	$\beta$ -Galactosidasa	(+)
Lisina descarboxilasa	(-)	Uso de citrato	(-)
Ureasa	(-)	Producción de indol	(-)
Hidrólisis de gelatina	(+)	Hidrólisis de caseína	(+)

### 2.3.2 Caracterización de la proteína lipolítica

En 2001 Wong, [64] realizó la caracterización de un extracto de enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 y su purificación mediante cromatografía en columna de filtración (Superosa 12 de Pharmacia ). El perfil electroforético reveló la presencia de un triplete con actividad lipolítica en la región correspondiente a 21 kDa. Así mismo, el punto isoeléctrico se localizó en la región correspondiente al intervalo de 8.65 - 9.3 de pH.

En la tabla 2.3.2 se muestran algunas propiedades bioquímicas de las lipasas del género *Bacillus* que han sido caracterizadas molecularmente. Es preciso mencionar que los primeros cuatro miembros pertenecen a la subfamilia I.4.

**Tabla 2.3.2 Propiedades bioquímicas de lipasas de *Bacillus* de la subfamilia I.4**

Propiedad	Microorganismo productor	PM (kDa)	pI	pH óptimo	T óptima (°C)	Referencia
Lipasa	<i>B. subtilis</i> LipA	19.3	9.25	10	37	Eggert y col., 2001
Esterasa	<i>B. subtilis</i> LipB	N.E.	N.E.	11	N.E.	Nthangeri y col., 2001
Lipasa	<i>B. pumilus</i> DSM5776	19.3	9.43	9.5-10	30	Nthangeri y col., 2001
Esterasa	<i>B. licheniformis</i>	19.2	9.46	10-11.5	N.E.	Nthangeri y col., 2001
Lipasa	<i>B. pumilus</i> B26 *	19.23	N.E.	8.5	35	Hwoun y col., 2002
Lipasa	<i>B. pumilus</i> GMA1**	21	8.65 - 9.3	10.5	50	Wong, 2001

\* Tiene 90.7% de identidad con respecto a *B. pumilus* DSM5776

\*\* Tiene 98.34% de identidad con respecto a *B. pumilus* DSM5776

N.E. No Especificado

Se observa que son enzimas alcalófilas, aunque el parámetro que llama la atención es la temperatura óptima, debido a que la lipasa en estudio presenta su temperatura óptima mayor a 50°C, que es muy alta comparándola con otros miembros de la subfamilia I.4.

El comportamiento que tiene la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 con respecto a los fenómenos de termofilia y alcalofilia y, aunado a la posible estabilidad operacional que ofrece el método de inmovilización, sugieren un buen modelo para el estudio de las propiedades catalíticas de la enzima tanto en su forma libre como la inmovilizada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General:

- Realizar la inmovilización de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, mediante adsorción interfacial y comparar las propiedades catalíticas de la enzima libre e inmovilizada.

#### 3.2 Particulares:

- Determinar las condiciones de la inmovilización
- Obtener un biocatalizador con lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 y comparar sus propiedades catalíticas con las de la forma libre.
- Caracterizar parámetros fisicoquímicos de la enzima libre e inmovilizada
- Establecer la vida media del biocatalizador en términos de estabilidad operacional.
- Evaluar la eficacia de adsorción mediante el perfil electroforético de la proteína inmovilizada.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos

<b>REACTIVO</b>	<b>PROVEEDOR</b>
Aceite de olivo	Baker
Accurel® MP1000	Membrana GmbH / Accurel Systems
Agar bacteriológico	Oxoid
Albúmina Sérica Bovina	Sigma
Alcohol etílico	Baker
BHI	Bioxon
Caldo nutritivo	Bioxon
CHES	Sigma
Éter etílico	Baker
Fosfato monobásico de sodio	Baker
Fosfato dibásico de sodio	Baker
Fosfato tribásico de sodio	Baker
Fenol Folin-Ciocalteu	Sigma
Glicerol	Baker
Hidróxido de sodio	Baker
Marcadores de peso molecular(bajo rango)	BioRad
<i>o</i> -nitrofenol	Sigma
<i>o</i> -nitrofenil laurato	BioRad
Reactivos para electroforesis	BioRad
Tributirina	Sigma
Tritón X-100	Research Organics

#### 4.2 Microorganismo y su conservación

El microorganismo de investigación es *Bacillus pumilus* GMA1, cepa previamente aislada de Los Azufres Michoacán y caracterizado anteriormente como un bacilo largo, Gram (+), cuyas dimensiones corresponden aproximadamente de 4-5  $\mu\text{m}$  de largo y 1-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho. La cepa se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en caldo nutritivo con glicerol al 15%.

#### 4.3 Activación de la cepa

El microorganismo se inoculó en caldo BHI y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación de 100 r.p.m. durante aproximadamente 24 h (preinóculo). Para confirmar de que se trata de *Bacillus pumilus* GMA1, se realizó la verificación morfológica del microorganismo como se describe más adelante. Posteriormente, se realizó la fermentación en una incubadora orbital (Lab-Line Instruments Inc.), para ello se tomaron 8.33 mL del preinóculo por cada litro de fermentador.

#### 4.4 Verificación morfológica del microorganismo

Para confirmar las características macroscópicas del microorganismo, se usaron medios sólido y líquido. Para el medio líquido se utilizó caldo BHI, adicionado con aceite de olivo al 1%, incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ , a 120 r.p.m. Respecto al medio sólido, se preparan placas con agar nutritivo, adicionado con tributirina al 0.5%, incubando a la misma temperatura. Antes de esterilizar los medios se redujo el tamaño del glóbulo de grasa mediante un sonicador (Fisher Scientific 550 Sonic Dismembrator) durante 30 segundos y 15 KHZ para hacer la interfase más homogénea y disponible al microorganismo. El tiempo de incubación fue de 24 h para ambos medios.

#### 4.5 Concentración del extracto crudo

Las células provenientes del medio de cultivo se concentraron por centrifugación durante 30 min. a 8500 r.p.m y 4°C en el rotor JA20, centrifuga (Beckman J2-MC). Al extracto crudo obtenido se le sometió a una extracción con eter 1:3 con respecto al volumen de la muestra. Se eliminó la fase etérea y se colectó la fase acuosa, que se refrigeró durante toda la noche a 4°C. Finalmente se congeló a -20°C y se secó durante 30 h en una liofilizadora (Labconco Freezer Dry System) hasta obtener un polvo café claro. El liofilizado obtenido se guardó en refrigeración y para las determinaciones de proteína y actividad, se pesaron 100 mg y se resuspendieron en 1mL de amortiguador de fosfatos pH 7.2, 100 mM.

#### 4.6 Determinación de la actividad lipolítica

Método espectrofotométrico con *o*-NFL [31]: La lipasa reconoce y cataliza la reacción de hidrólisis del *o*-NFL generando un compuesto colorido, el *o*-nitrofenol (*o*-NF) que en medio alcalino absorbe en la región visible a 410nm. La absorbancia se midió con un espectrofotómetro (Spectronic 21D Milton Roy) registrando las lecturas inicial y final de incubación (50°C, 20min) y se utilizó 100 µL de extracto enzimático. La curva patrón se realizó con *o*-NF (ver procedimiento completo en el anexo I).

#### 4.7 Determinación de proteína

Método de Lowry-modificado (Peterson, L.G. 1977): La medición espectrofotométrica se realizó a 750 nm. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina de Sigma (anexo II).

#### 4.8 Inmovilización de la enzima

El procedimiento de inmovilización se hizo según el método propuesto por Bosley y Peilow [15]. El Accurel® MP1000 (1 g) fue humedecido sucesivamente con etanol absoluto, posteriormente con 50 % etanol:agua desionizada y, finalmente con agua desionizada. Cada etapa tardó 30 min. Transcurrido el tiempo, el agua se removió y el soporte quedó listo para la adsorción. Dependiendo de la cantidad de proteína, se resuspendió el extracto crudo en amortiguador de fosfatos, pH 7.2, 100 mM. Para iniciar la inmovilización, el soporte (previamente tratado) se puso en contacto con el extracto crudo y 50 mL del mismo amortiguador de fosfatos. El matraz se incubó durante 24 h a 150 r.p.m. y temperatura de refrigeración en una placa con agitación orbital (Lab-Line 3518 Instruments Inc.). El monitoreo de la adsorción se hizo midiendo la cantidad de proteína en el sobrenadante. Al finalizar el tiempo de incubación, el biocatalizador se filtró y lavó con 1) 100 mL de buffer de fosfatos (pH 7.2, 50 mM) y, 2) 100 mL de agua desionizada. Finalmente, el biocatalizador se secó al vacío a temperatura ambiente y se almacenó a temperatura de refrigeración, listo para su uso.

##### 4.8.1 Evaluación de las condiciones durante la inmovilización

El proceso de inmovilización descrito anteriormente se optimizó evaluando diferentes condiciones en el medio de adsorción: a) capacidad del soporte; b) pH; c) temperatura; d) fuerza iónica; e) tiempo óptimo de inmovilización.

a) **Capacidad del soporte:** se realizó el proceso de adsorción a temperatura ambiente, agitación orbital de 150 r.p.m., buffer de amortiguador 100 mM, pH 7.2, como medio de reacción y se usaron dos concentraciones de extracto crudo: 2 y 6 mg / mL.

- b) **pH:** se realizó el proceso de adsorción con 2 mg/mL de concentración de extracto crudo, agitación orbital de 150 r.p.m., y se varió el pH del amortiguador de reacción: 6.0, 7.2, 9.0, 10.0, 11.0 y 12.0. El amortiguador utilizado fue fosfatos con una concentración de 100 mM.
- c) **Temperatura:** se realizó el proceso de adsorción con 2 mg/mL de concentración de extracto crudo, agitación orbital de 150 r.p.m., amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 9.0 para el medio de reacción y se usaron dos temperaturas: temperatura ambiente (28°C) y de refrigeración (4°C).
- d) **Fuerza iónica:** se realizó el proceso de adsorción con 2 mg/mL de concentración de extracto crudo, agitación orbital de 150 r.p.m., amortiguador de fosfatos pH 9.0 para el medio de reacción, temperatura de refrigeración y a diferentes concentraciones de fosfato de sodio: 5, 10, 20, 50 y 100 mM.
- e) **Tiempo de adsorción:** se realizó el proceso de adsorción con 2 mg/mL de concentración de extracto crudo, agitación orbital de 150 r.p.m., temperatura de refrigeración, amortiguador de fosfatos pH 9, 50 mM y se varió el tiempo de adsorción: 0.5, 2, 5 y 24 h. Se realizaron dos tipos de muestreo: en un caso se tomaron alícuotas para su análisis posterior sin detener el proceso de adsorción, mientras que en el segundo, se interrumpió el proceso de adsorción a intervalos determinados y se tomó todo el matraz para su análisis posterior.

## **4.9 Propiedades fisicoquímicas de la enzima libre e inmovilizada**

### **4.9.1 Efecto del pH**

El efecto del pH en la actividad lipolítica de la enzima libre e inmovilizada se estudió en un rango de pH de 6.0– 11.0, usando diferentes amortiguadores a una concentración de 100 mM. Se empleó amortiguador de fosfatos (pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0), CHES (pH 9.0 y 10.0) y fosfatos (pH 11.0). El método utilizado fue el espectrofotométrico mediante la hidrólisis de o-NFL.

### **4.9.2 Efecto de la temperatura**

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada se estudió incubando la mezcla de reacción a diferentes temperaturas en un agitador térmico (Thermomixer Eppendorf) en un rango de 25-100°C pH 10, usando amortiguador CHES 100 mM. El método utilizado fue el espectrofotométrico mediante la hidrólisis de o-NFL.

### **4.9.3 Estabilidad térmica de la enzima**

La estabilidad térmica de la enzima libre e inmovilizada se estudió incubando 30min el extracto crudo y/o biocatalizador sin sustrato en amortiguador de fosfatos pH 7.2, 50 mM, desde 25°C hasta 100°C. Al finalizar la incubación se tomaron 100 uL y 37 mg de extracto crudo y soporte, respectivamente, y se determinó la actividad residual mediante el método espectrofotométrico con o-NFL. Se consideró como 100% la actividad inicial de la enzima.

#### **4.9.4 Estabilidad en refrigeración**

La estabilidad en refrigeración de la enzima libre e inmovilizada se estudió sometiendo a 4°C el extracto crudo y/o biocatalizador sin sustrato durante 30 días. Cada 5 días se tomaban muestras de 100 uL y 37 mg de extracto crudo y soporte, respectivamente, y se determinó la actividad residual mediante el método de o-NFL. Se tomó como 100% la actividad inicial de la enzima (antes de colocar en refrigeración las muestras).

#### **4.10 Estabilidad operacional del biocatalizador**

La enzima inmovilizada se ensayó durante varios ciclos continuos. Para cada ciclo se utilizaron 37 mg de biocatalizador y se determinó actividad mediante el método de o-NFL. Al finalizar el ensayo de actividad, el biocatalizador se lavó con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.2. Posteriormente se secó al vacío a temperatura ambiente y se usó para el próximo ciclo de manera similar.

#### **4.11 Desorción de la proteína inmovilizada**

La desorción de la enzima se indujo usando Tritón X-100 al 1% en amortiguador de fosfatos 5 mM. El tratamiento de desorción se llevó a cabo con agitación orbital a 1200 r.p.m., 4°C durante 24 h. Para ello se mezclaron 50 mg de biocatalizador y 0.8 mL del agente desnaturizante. Al final de la incubación se filtró y al sobrenadante se determinó proteína soluble para usarlo en el análisis con electroforesis.

#### **4.12 Análisis de proteína con SDS-PAGE**

Para analizar la proteína contenida en el extracto crudo y la adsorbida sobre el soporte se realizaron geles de electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE según el método propuesto por Laemmli [38]. Para ello se usó un gel concentrador al 4% y un

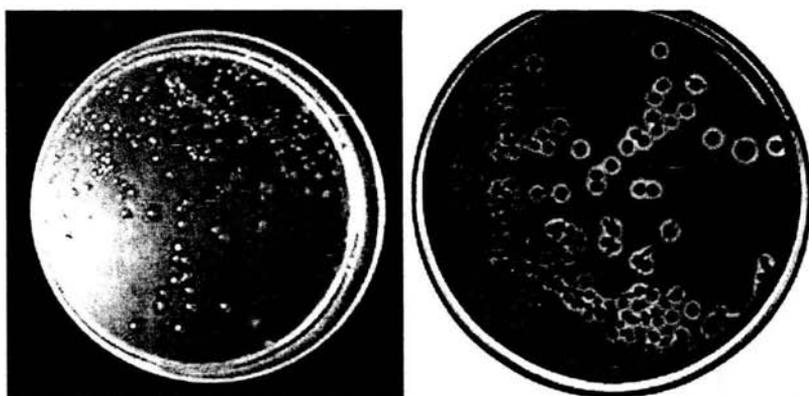
gel separador al 10%. Las muestras se calentaron a ebullición 5 min. y se aplicaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína por carril, se usaron marcadores de peso molecular de bajo rango de BioRad. La electroforesis se corrió a 90 volts durante 2 h en una cámara Miniprotean III de BioRad. El gel se tiñó con azul de Coomasie.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Verificación morfológica de la cepa

De acuerdo a resultados obtenidos anteriormente en el grupo de trabajo [64] respecto a la optimización de las condiciones de fermentación, se llevó a cabo el cultivo del microorganismo como se indicó en materiales y métodos. Al término de la incubación se inoculó al microorganismo en placas de agar nutritivo con la finalidad de corroborar las características coloniales del mismo.

En la figura 5.1 se observan colonias amarillas, de forma redonda, aspecto cremoso, característicos de *Bacillus pumilus* GMA1; además, se aprecia la formación de halos, indicativo de la presencia de actividad lipolítica.



**Figura 5.1** *Bacillus pumilus* GMA1 a las 24 h de incubación en agar nutritivo adicionado con 0.5% de tributirina

De las colonias descritas anteriormente se realizó la tinción de Gram, dando como resultado las características microscópicas esperadas: bacilo largo Gram (+) con formación de endosporas terminales y subterminales.

## 5.2 Concentración del extracto crudo

Se llevó a cabo un proceso de semipurificación de la enzima que consistió, primero en limpiar el medio de cultivo concentrando las células y, a continuación separar el aceite de olivo. Además, con el objeto de prevenir la autólisis se sometió a liofilización y finalmente se almacenó a temperatura de refrigeración. En las barras blancas de la figura 5.2 se observa el contenido de proteína de cada muestra, diluida de tal forma que fueran similares y comparar su actividad específica. En las barras oscuras se observa que a medida que se limpia el extracto crudo durante el proceso parcial de purificación, la actividad lipolítica se incrementa.

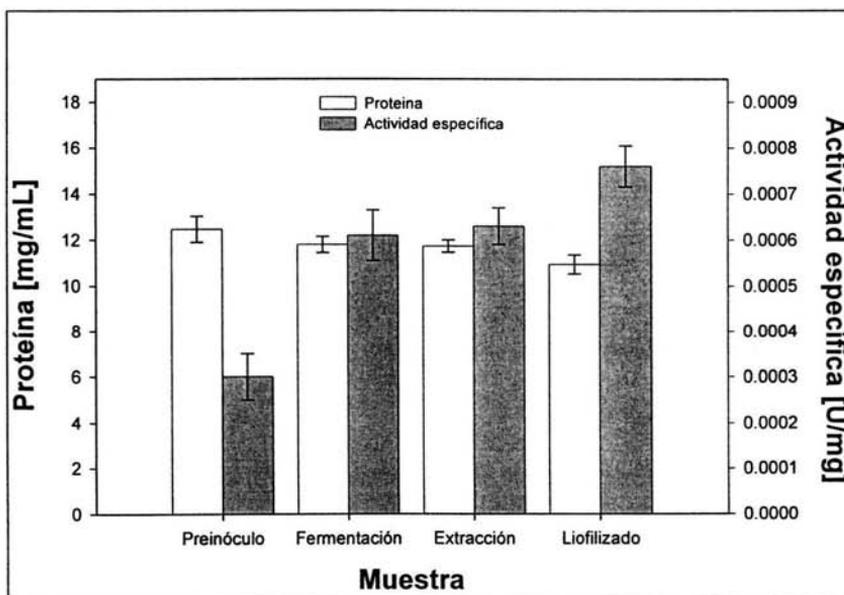


Figura 5.2 Purificación parcial de la enzima. La actividad está expresada en unidades por mg de proteína.

### 5.3 Inmovilización de la enzima

Para llevar a cabo la inmovilización fue necesario preparar el soporte para asegurar un tamaño de partícula homogéneo. Además, las partículas de menor tamaño impiden la determinación eficiente de la actividad lipolítica debido a que su separación del medio de reacción es complicada; por lo tanto se resolvió eliminar esas partículas filtrando el soporte por el tamiz número 30 (600  $\mu\text{m}$ ). Por lo anterior, y analizando las propiedades físicas del soporte, se decidió que los ensayos de inmovilización se realizaran con partículas de Accurel® de tamaño 600  $\mu\text{m}$  -1500  $\mu\text{m}$ .

Según el protocolo seguido por Bosley y Peilow [15], además de otras investigaciones, [2,3,9,27,55,63] el soporte se somete a pretratamiento con etanol con el objeto de facilitar el contacto entre el soporte hidrofóbico y la mezcla de reacción (minimizando la hidrofobicidad del polipropileno). Sin embargo, dan poca atención a la severidad del etanol y su influencia sobre el contenido de lipasa en el biocatalizador. Una investigación más reciente y detallada es la de Foresti y Luján (2004) [25], en su estudio realizan un tratamiento previo al soporte con etanol: varían el tiempo de contacto, velocidad de agitación y tamaño del soporte y exploran su influencia sobre la actividad de la lipasa de *Candida rugosa*. Concluyen que la adsorción de lipasa sobre el polipropileno se favorece principalmente en el rango de tamaño del polímero de 590  $\mu\text{m}$  – 1180  $\mu\text{m}$ . Además, en el pretratamiento con etanol la mayor eficiencia de inmovilización se observó a tiempos pequeños y a velocidades ligeras de agitación.

En el presente trabajo el pretratamiento (Et-OH absoluto / EtOH-H<sub>2</sub>O al 50% / H<sub>2</sub>O) tomó 1.5 h, pero cada media hora se diluía el etanol, hasta que finalmente el soporte mostraba miscibilidad con el agua, característica deseable para lograr el contacto con el medio de reacción.

### 5.3.1 Capacidad de adsorción de enzima en el soporte

Una inmovilización eficiente dependerá de la concentración de enzima adsorbida, la que aumentará con la concentración de enzima siempre y cuando no se llegue a la saturación del soporte [63]. Se estudió el efecto de la capacidad/eficiencia de adsorción de enzima en el Accurel® MP1000 usando dos concentraciones de proteína en el extracto crudo. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C. En la figura 5.3.1 A) se observa el nivel de proteína en el medio de reacción: en la inmovilización con mayor concentración de proteína no hay una disminución apreciable, lo que sugiere que se encuentra presente proteína en exceso en el medio de reacción y no permite su medición correcta (reflejado en la alta desviación estándar); cuando se emplea menor concentración de proteína se observa una disminución más pronunciada. Lo anterior se aprecia mejor en la figura 5.3.1 B. En las barras blancas se compara la cantidad de enzima adsorbida variando la concentración del extracto crudo. Para la inmovilización con mayor concentración de proteína se adsorbe el 28.02 %, mientras que en la de menor concentración adsorbe 67.4%, lo que sugiere que en la primera el soporte se satura de proteína lo que se manifiesta en menor adsorción, por lo tanto al usar un extracto crudo menos concentrado la adsorción aumenta. En las barras oscuras se compara la actividad de los biocatalizadores obtenidos, obteniendo menor actividad el que contiene menos proteína, no obstante, se resolvió utilizar ésta concentración en el extracto crudo para los próximos ensayos ya que previene sobrecapas, agregación y/o saturación de la superficie del soporte. Aunque no se esperaba una adsorción del 100 % debido a que no toda la proteína contenida en el liofilizado es lipasa, en las condiciones de inmovilización en que se utilizó el extracto crudo con 2 mg proteína / mL se presentó mejor tendencia de adsorción, por lo que se utilizó esa concentración para los siguientes ensayos de inmovilización.

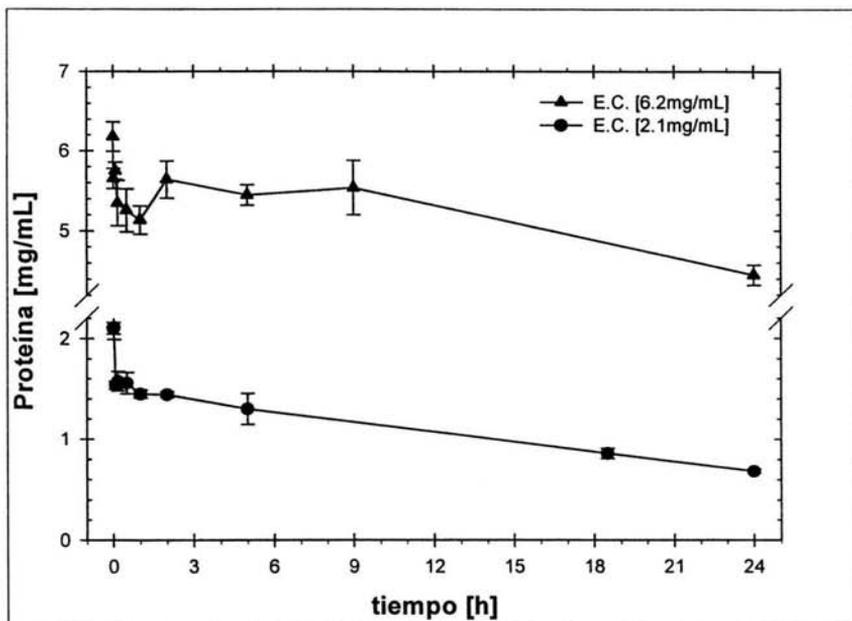


Figura 5.3.1 A. Contenido de proteína en el medio de reacción durante la inmovilización

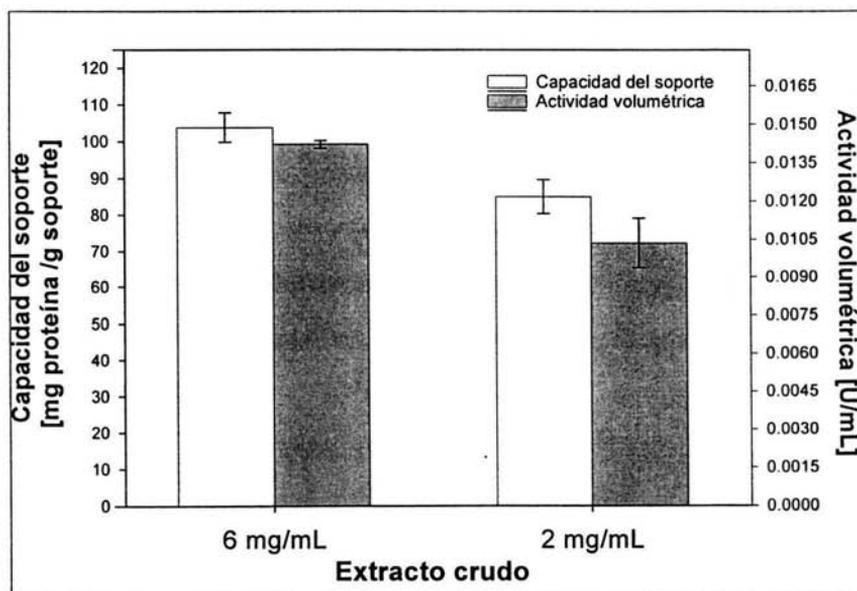


Figura 5.3.1 B. Efecto de la capacidad/eficiencia de la enzima durante la inmovilización

### 5.3.2 Efecto del pH en la adsorción de la enzima

La naturaleza hidrofóbica y no iónica del soporte de polipropileno sugiere que la adsorción de proteínas está gobernada por interacciones hidrofóbicas [27]. Además el pH al cual ocurre la inmovilización es igualmente importante, ya que la adsorción máxima generalmente se observa a pH's cercanos al punto isoeléctrico de la proteína [63].

En la figura 5.3.2 se observa en las barras blancas que después de la neutralidad, la adsorción de proteína aumenta a medida que se alcaliniza el medio. Este comportamiento sugiere que no sólo se adsorbe la lipasa de estudio, sino que en el extracto crudo se encuentran otras proteínas que, al alcalinizarse el medio, se adsorben debido a la interacción de sus aminoácidos con el soporte y/o entre las proteínas que están unidas al soporte. Esta hipótesis se refuerza porque existe una disminución de proteína en el medio de reacción (por tanto mayor adsorción) y, porque a pH's alcalinos la actividad del biocatalizador disminuye, quizá a que se forman sobrecapas y/o agregados en la superficie del soporte impidiendo la difusión del sustrato y/o producto o tal vez porque la estabilidad de la enzima a esos pH's es menor. En la misma figura se observa que la actividad lipolítica a pH 9.0, es decir, cerca al punto isoeléctrico de la enzima de interés (aproximadamente 8.65 - 9.3) [64] el biocatalizador presenta mayor actividad, comportamiento debido a que en este pH la proteína tiene carga neta cero y, aunado a que la interacción predominante es la hidrofóbica, se adsorben en mayor proporción. Por lo tanto, es posible que cuando se mide la actividad del biocatalizador a pH 9.0, la proteína inmovilizada sea la de interés.

Por lo anterior se decidió usar amortiguador de fosfatos pH 9.0 para los siguientes ensayos de inmovilización.

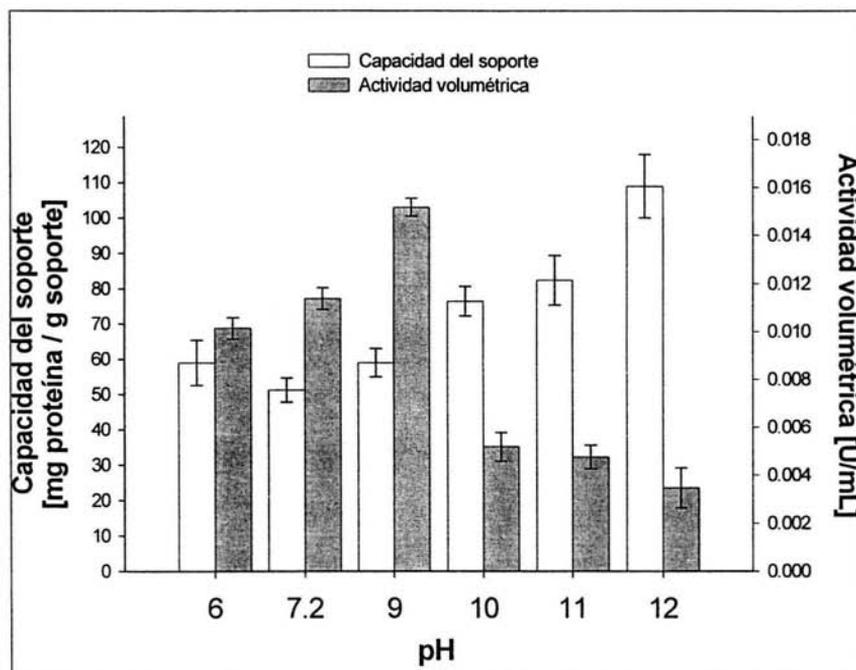


Figura 5.3.2 Efecto del pH en la adsorción de la enzima. Los buffers usados fueron fosfatos ( pH 6, 7.2, 9.0, 11.0 y 12.0) y CHES ( pH 10.0 ). La inmovilización se realizó durante 24h y la actividad se midió mediante la hidrólisis del *o*-NFL.

### 5.3.3 Efecto de la temperatura en la adsorción de enzima

Al realizar el proceso de adsorción a temperatura ambiente se presentó una ligera turbidez del medio de reacción, debida a la facilidad de contaminación que sufría el reactor. En la mayoría de las investigaciones y en el protocolo de Bosley y Peilow, (1997) [15 ] han realizado la inmovilización a temperatura ambiente, como también lo recomienda el proveedor del Accurel® MP1000. Sin embargo, Chen y col., (2000) [6 ] y Bastida y col., (1997) [11 ] obtuvieron biocatalizadores eficientes al realizar la inmovilización a temperatura de 4 °C usando como soportes Accurel MP1000 y octil-agarosa, respectivamente.

Se decidió comparar el efecto que tenía la temperatura sobre la inmovilización. En la figura 5.3.3A. se observa que hasta las primeras 5h la adsorción es prácticamente la misma, sin embargo pasando este tiempo el medio de reacción a temperatura ambiente se contamina impidiendo una lectura correcta de proteína que se traduce en mayor adsorción, es decir, mayor contenido de proteína en el biocatalizador. En la figura 5.3.3B, se observa que la actividad de los biocatalizadores es la misma, resultado que sugiere que ambos contienen el mismo contenido de proteína aproximadamente y, por tanto, posiblemente en la inmovilización a temperatura ambiente se está sobreestimando su valor real. Es preciso mencionar que cuando la adsorción se hace a 4 °C el medio de reacción no presentó contaminación.

En varios ensayos realizados a ambas temperaturas (no se muestran), se corroboró que la contaminación microbiana del medio de reacción a temperatura ambiente enmascaraba la medición de proteína, lo que se traducía en mayor adsorción aparente. Por lo anterior, se eligió hacer los siguientes ensayos a temperatura de refrigeración.

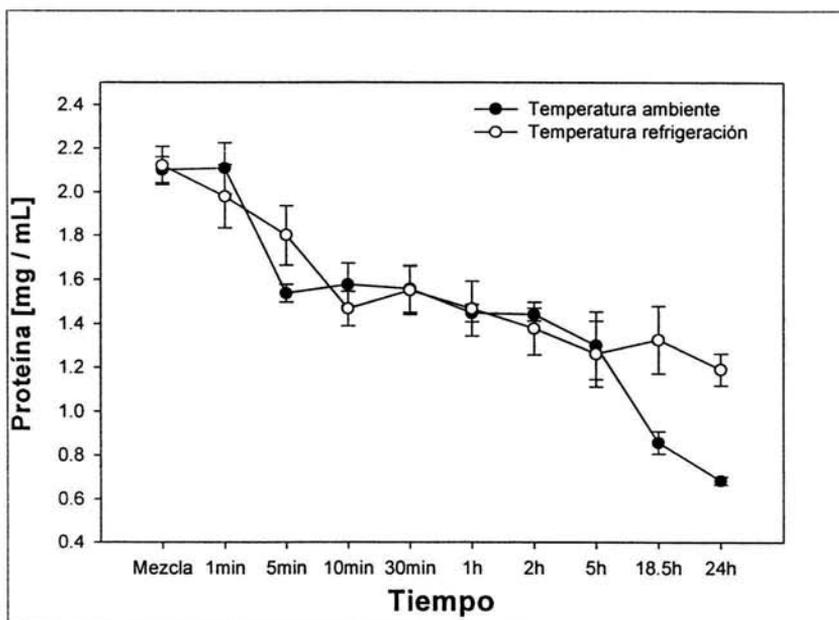


Figura 5.3.3 A Contenido de proteína en el medio de reacción durante la inmovilización a diferente temperatura

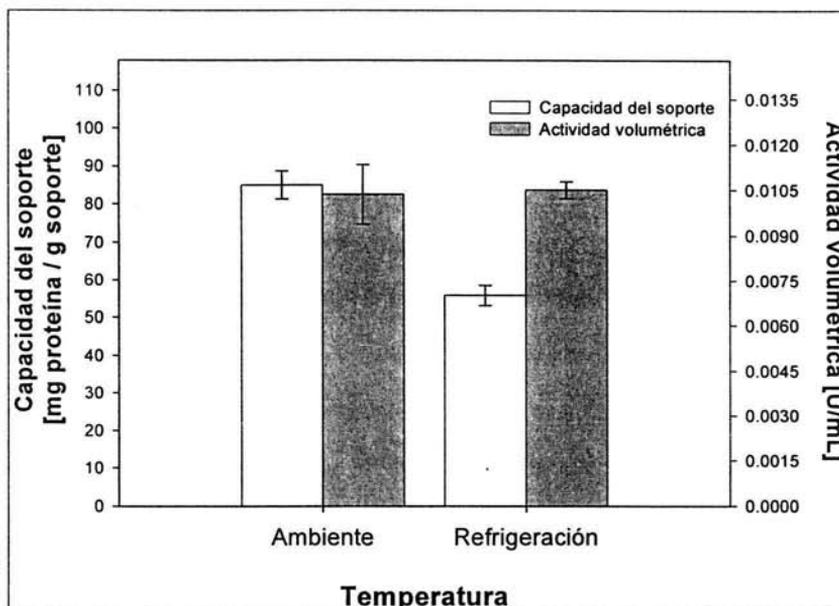


Figura 5.3.3 B. Efecto de la temperatura de inmovilización en la capacidad/eficiencia de enzima

### 5.3.4 Efecto de la fuerza iónica del medio de reacción

El grado de inmovilización depende de varios parámetros, entre ellos, la fuerza iónica del medio de reacción. Fernández-Lafuente y col. (1997) [23] observaron en su investigación que la adsorción de proteínas generalmente es más fuerte y rápida cuando se aumenta la fuerza iónica. Sin embargo, en el estudio realizado por Bastida y col. (1997) [11] observaron que la adsorción de lipasas es más baja a medida que se aumentaba la fuerza iónica, es decir, exactamente lo contrario. La máxima adsorción encontrada fue de 5-10 mM de concentración de fosfato de sodio.

El efecto de la fuerza iónica se evaluó en un intervalo de concentración de 5 - 100 mM de fosfatos. Aunque en la figura 5.3.4.A se tiene prácticamente la misma tendencia en la pérdida de proteína del medio de reacción, en la figura 5.3.4.B se observa que la inmovilización realizada a 5mM presenta mayor cantidad de proteína adsorbida en comparación con las demás. El comportamiento de la inmovilización fue el mismo que obtuvieron Bastida y col., 1997, es decir, que a menor concentración de fosfatos la proteína es adsorbida en mayor proporción, tal vez a que no hay interferencias en el medio de reacción por la fuerza iónica y, dado que la interacción responsable de este método de inmovilización son las fuerzas hidrofóbicas, se obtiene mejor adsorción. Al observar la desviación estándar de las 5 inmovilizaciones, se concluye que la adsorción de enzima es prácticamente la misma. Respecto a la actividad del biocatalizador, se aprecia en las barras oscuras la tendencia que sigue a medida que aumenta la concentración de fosfatos, siendo la inmovilización a 50 mM, la que presenta mayor actividad. A raíz de este resultado se decidió utilizar para los siguientes ensayos el amortiguador de fosfatos con una concentración de 50 mM.

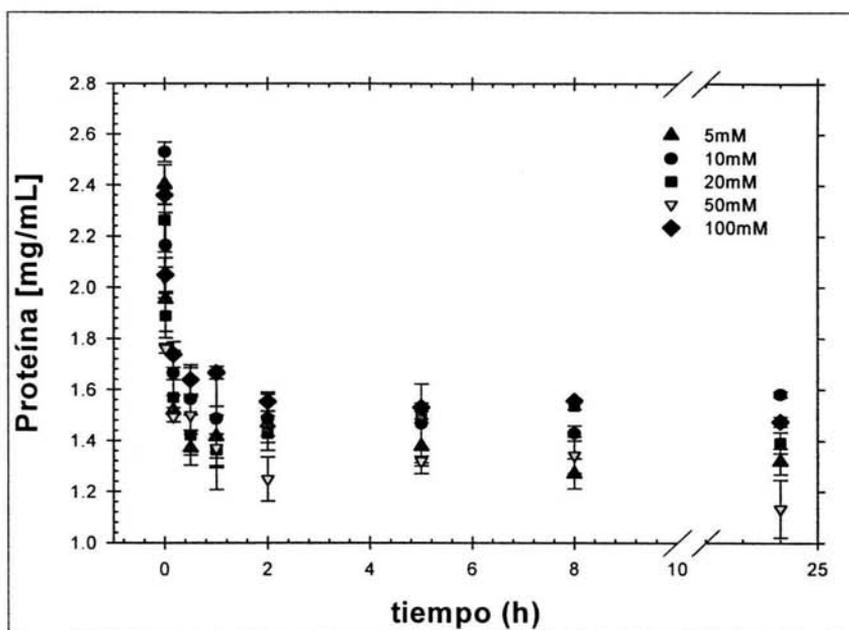


Figura 5.3.4 A Contenido de proteína en el medio de reacción durante la inmovilización a diferente fuerza iónica

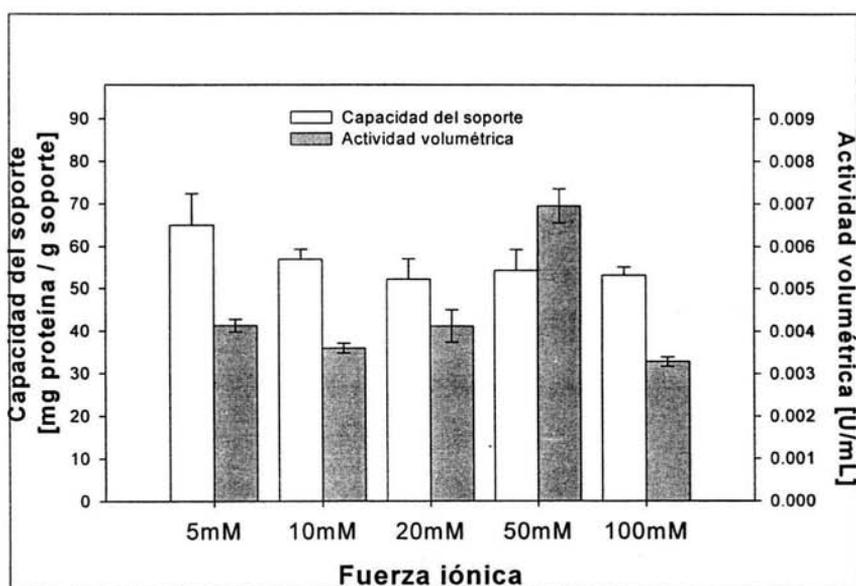


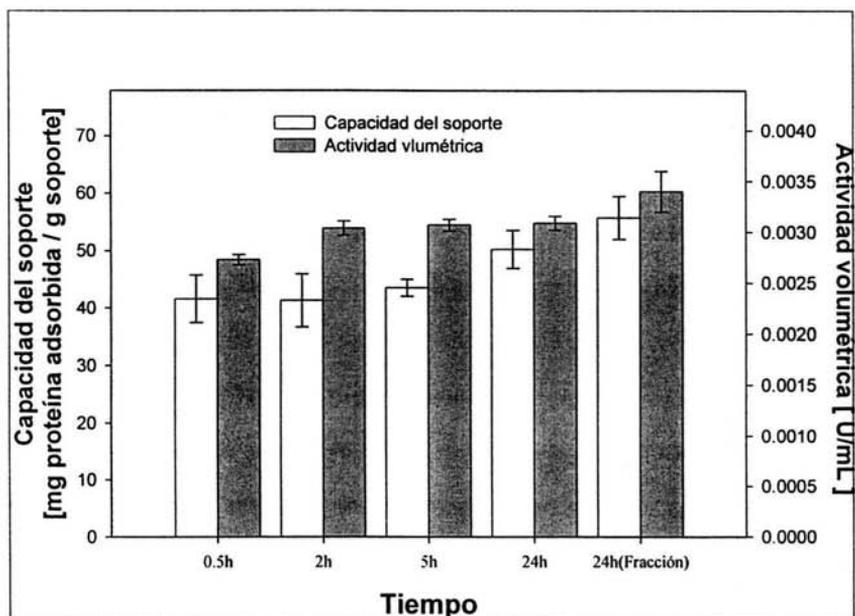
Figura 5.3.4 B. Efecto de la fuerza iónica del medio de reacción sobre la capacidad de enzima adsorbida/eficiencia. Se utilizó buffer de fosfatos a pH 9.0

### 5.3.5 Determinación del tiempo óptimo de inmovilización

El tiempo que tome la inmovilización es un parámetro muy importante a nivel de investigación y aún más a nivel industrial. En el ámbito científico los tiempos de adsorción son muy variados: desde algunos minutos hasta horas, durante la noche, 24 h ó 48 h. El proveedor del Accurel MP1000 sugiere para la inmovilización un intervalo de 10 min hasta 48 h. A pesar de esta variabilidad, el tiempo dependerá de diversos factores, por ejemplo, trabajar con extractos crudos o purificados, la fuente de la lipasa y, parámetros como los previamente analizados en esta investigación.

La determinación del tiempo óptimo de adsorción se evaluó con dos sistemas diferentes de muestreo como se indicó en materiales y métodos. En la figura 5.3.5 se compara la proteína adsorbida y la actividad lipolítica de los biocatalizadores para ambos sistemas de muestreo. En el tiempo que corresponde a 24 h se observa ligeramente mayor la proteína adsorbida en el muestreo por fracción y por tanto, mayor actividad (aunque se tiene mayor dispersión en los datos de actividad). Al tiempo de 30 min se tiene un 83 % de la proteína que se adsorberá al término de 24h y la actividad que tiene este biocatalizador ( 88 % de la actividad final ) es ligeramente menor comparándola con la de 2h (98.4 %) y 5h (99.3 %) que tienen prácticamente la misma proteína.

Un nuevo análisis de actividad (no se muestra) sobre los biocatalizadores a diferentes tiempos arrojó resultados más reproducibles a tiempo de 5 h y, aunque a tiempo de 2 h ya se tiene la actividad considerable (98.4 %), se decidió usar el tiempo de 5h (99.3 %) para asegurar una mayor adsorción y actividad lipolítica para los siguientes ensayos sin tener que llegar a las 24 h de inmovilización.



**Figura 5.3.5 Determinación del tiempo óptimo de adsorción evaluando los sistemas de muestreo por fracción y unidad en función de la capacidad/eficiencia de la enzima**

En la tabla 5.3.2 se resumen las condiciones evaluadas para la adsorción del extracto crudo. Con estas condiciones, se estudió el comportamiento del biocatalizador y comparó con el de la enzima libre.

**Tabla 5.3.2 Parámetros determinados para la inmovilización de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 sobre Accurel® MP1000.**

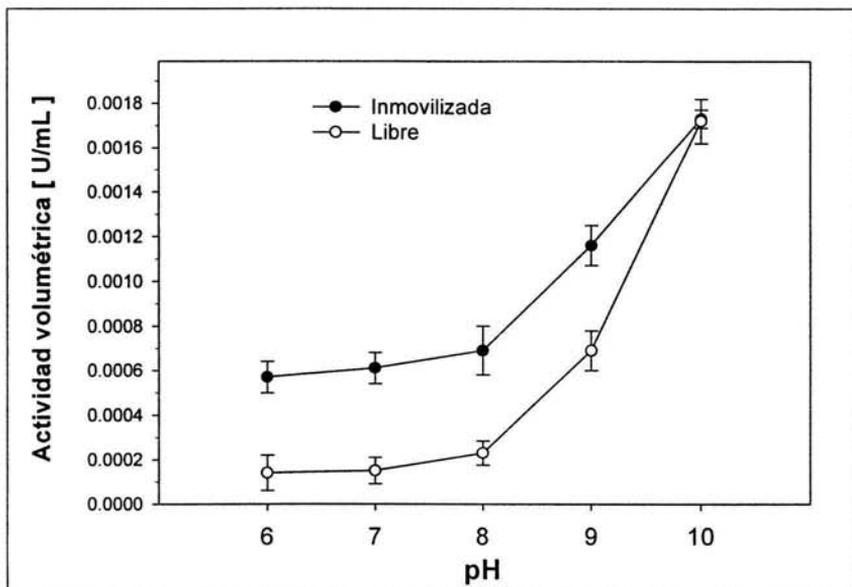
PARÁMETRO EVALUADO	VALOR OBTENIDO
Capacidad de adsorción de enzima en el soporte	2 mg proteína/mL
Efecto del pH en la adsorción de enzima	pH 9.0
Efecto de la temperatura en la adsorción de enzima	4 °C
Efecto de la fuerza iónica en el medio de reacción	50 mM
Tiempo óptimo de inmovilización.	5 h

## 5.4 Propiedades fisicoquímicas de la enzima libre e inmovilizada

### 5.4.1 Efecto del pH

El pH es un factor que influye considerablemente en la actividad de una lipasa libre o inmovilizada. Evidencias experimentales [49] han demostrado que los aminoácidos de histidina localizados en el sitio activo deben presentar la forma iónica apropiada para ser capaces de atrapar un protón del grupo hidroxilo de la serina (paso preliminar necesario para que un par de electrones estén disponibles para el ataque nucleofílico); un aminoácido que contiene un ácido carboxílico como grupo funcional (ácido aspártico o glutámico) muy cercano al sitio de catálisis ha sido implicado en la formación de una estructura, en donde el sustrato puede unirse antes de que su enlace ester pueda ser atacado por la lipasa y no directamente en la misma reacción. Es de esperarse que el efecto del pH en la actividad catalítica de la lipasa, muestre un comportamiento similar a una curva en forma de Gauss, en donde a valores muy bajos o altos de pH, el sustrato y el producto no puedan unirse a la lipasa y si es que se unen, no lleven a cabo transformaciones químicas.

En la figura 5.4.1 se observa que en el intervalo de pH de 6.0 a 9.0 siempre es mayor la actividad lipolítica de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima libre, partiendo de una cantidad de enzima libre e inmovilizada que daba la misma actividad a pH 10. Sin embargo, es de hacerse notar que mientras mas alcalino sea el pH, el protocolo para cuantificar la actividad lipolítica presenta dificultades, ya que a valores muy alcalinos la reacción química es mayor que la reacción enzimática, es decir, que el *o*-NFL se hidroliza mayoritariamente por efecto del amortiguador de reacción y no por la lipasa misma. Experimentalmente, los blancos (sin enzima) presentan mayor hidrólisis que se refleja en un color amarillo mas intenso. El pH óptimo reportado para esta lipasa en forma libre es de 10.5, por Bustos-Jaimes (1995) [17].



**Figura 5.4.1** Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada. El ensayo se realizó con amortiguadores de fosfatos ( pH 6.0, 7.0 y 8.0) y CHES (pH 9.0 y 10.0), ambos a una concentración de 100 mM. El método usado fue el espectrofotométrico mediante la hidrólisis de *o*-NFL.

#### 5.4.2 Efecto de la temperatura

Uno de los factores más importantes que afectan la actividad de cualquier enzima es la temperatura. En muchos modelos de inactivación térmica, una lipasa activa promueve un cambio estructural reversible o irreversible para producir una forma catalíticamente inactiva; debido a que tal proceso es esencialmente unimolecular frecuentemente es caracterizado por cinéticas de primer orden [49]. La disminución o inactivación de una lipasa por incubación a una temperatura dada, es atribuido a cambios conformacionales debidos a la temperatura [54,63].

En la figura 5.4.2 se compara el perfil de actividad con respecto a temperatura de la enzima libre y biocatalizador partiendo de que a 50 °C la actividad era la misma. Se observa que a temperaturas menores a 50 °C la actividad del biocatalizador es mayor que el de la enzima libre, pero cuando se aumenta la temperatura pasa exactamente lo contrario: la enzima libre incrementa considerablemente su actividad hasta valores de 80 °C y, aunque el biocatalizador también incrementa su actividad, es más moderada. No obstante, el intervalo de temperatura no permite observar una caída de actividad de ninguna de las muestras, por lo que no se puede definir la temperatura óptima de la enzima ya sea libre o inmovilizada.

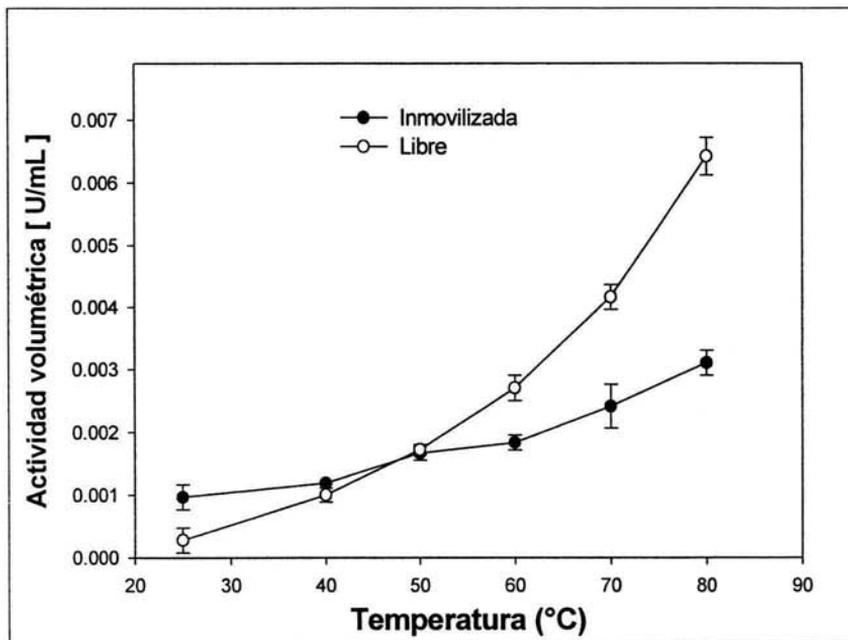
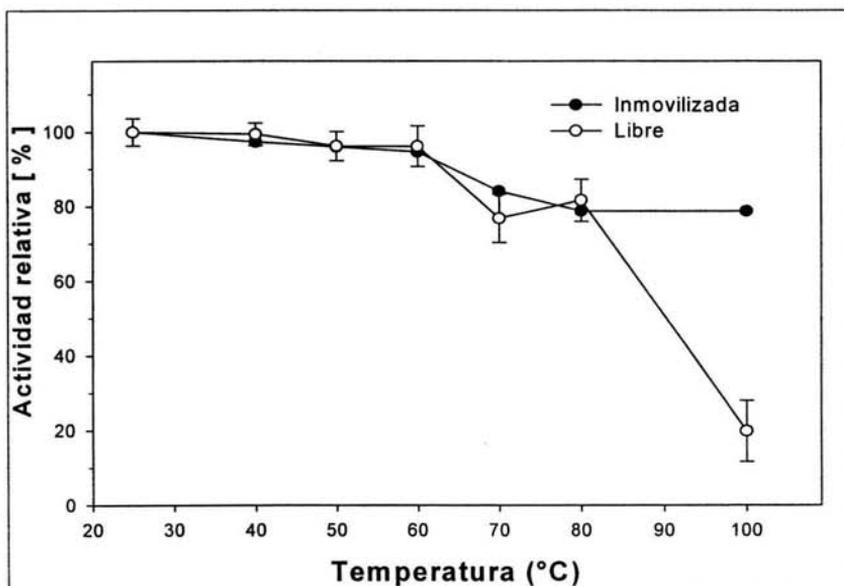


Figura 5.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada. El ensayo se realizó con amortiguador CHES pH 10.0, 100 mM durante 20 min mediante la hidrólisis de *o*-NFL.

### 5.4.3 Estabilidad térmica de la enzima

La estabilidad de una enzima inmovilizada depende del método de inmovilización y la susceptibilidad de la enzima para inactivarse, aunque casi siempre, en las investigaciones reportan un aumento en la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada. La estabilidad térmica de los biocatalizadores está en función del arreglo conformacional que adquiere la enzima, consecuencia del número y naturaleza de los enlaces involucrados entre los aminoácidos externos de la enzima y la superficie del soporte [40,49]. Como se ha mencionado anteriormente, la principal interacción en la adsorción es la hidrofóbica y, por lo tanto será la responsable de conservar rígida la enzima y por consecuencia, mantener la actividad catalítica de la misma. En términos generales, la estabilidad térmica de una enzima está evaluada en términos de vida media de la enzima bajo las condiciones de reacción [54,62].

En la figura 5.4.3 se observa el comportamiento que sigue la enzima libre e inmovilizada cuando se somete a incubación en un intervalo de 25-100 °C. El biocatalizador presentó mayor estabilidad térmica comparado con la enzima libre, transcurrida la incubación a 30 min. El comportamiento que tiene la enzima es prácticamente el mismo hasta la temperatura de 80 °C, ya que disminuye en ambas un 20 % de su actividad inicial, sin embargo, la incubación a 100 °C afecta drásticamente la actividad de la enzima libre disminuyendo el 80% de su actividad inicial, mientras que el biocatalizador mantiene su actividad constante. Una mejora en la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada se observó en lipasas de *Candida rugosa*[4], *Bacillus* GK8 [20], *Bacillus thermocatenuatus* [47], *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor miehei* y *Pseudomonas cepacia* [52].



**Figura 5.4.3** Estabilidad térmica de la enzima libre e inmovilizada. La inactivación se realizó incubando a 30 min en amortiguador de fosfatos pH 7.2 / 50mM.

#### 5.4.4 Estabilidad en refrigeración

Al igual que la estabilidad térmica, la evaluación de la estabilidad en almacenaje y operación se hace en términos de vida media del biocatalizador, es decir, el tiempo requerido para disminuir a la mitad la actividad enzimática. La mayoría de las enzimas han demostrado ser moderadamente estables en intervalo de 0 – 4 °C; por lo tanto, para cualquier enzima el intervalo ideal de temperatura de almacenación debe ser cuando la actividad catalítica no sea importante. Además, un factor importante que se debe considerar en el manejo de extractos crudos, es que también están presentes otras enzimas que pueden afectar su estabilidad y actividad [21,35].

Se evaluó la estabilidad en refrigeración para el biocatalizador y extracto crudo producido por *Bacillus pumilus*. En la figura 5.4.4 se observa que el comportamiento de la enzima libre e inmovilizada es estable, ya que el valor es prácticamente el mismo hasta los 15 días de refrigeración, ya que pierde 10% de la actividad inicial.

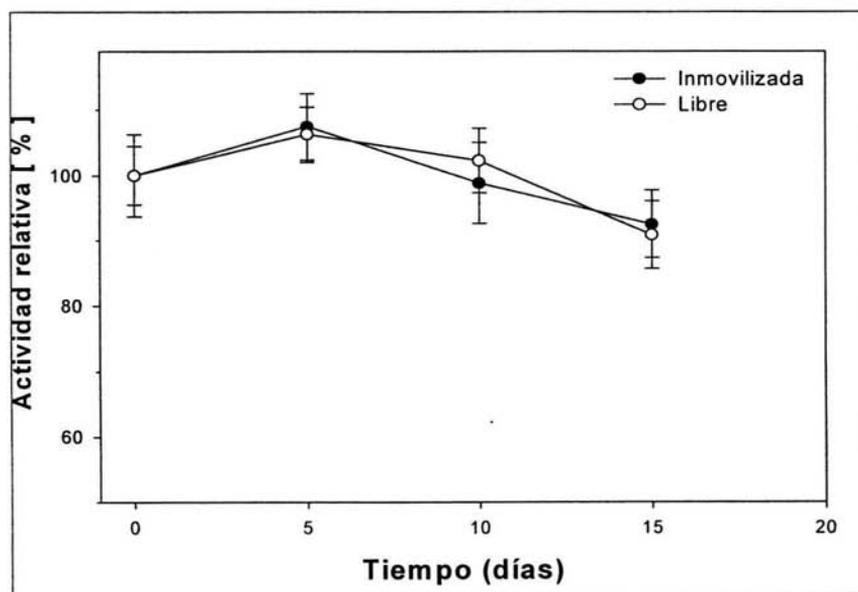


Figura 5.4.4 Estabilidad en refrigeración de la enzima libre e inmovilizada.

#### 5.4.5 Activación de la enzima inmovilizada

En la actualidad se conoce que algunas lipasas incrementan su actividad catalítica cuando están en una interfase aceite-agua. También se sabe que la inmovilización de lipasas en soportes hidrofóbicos puede incrementar su catálisis [11,23]. Bastida y col., (1997) [11], postularon la hipótesis de que las lipasas reconocen como interfase a la superficie de los soportes hidrofóbicos (como si fueran sus sustratos naturales), por lo que son adsorbidas fuertemente quedando estructuras abiertas en la superficie del soporte. Por lo tanto, esta estructura activa es quizá la responsable de aumentar la actividad catalítica de estas enzimas.

Una manera sencilla de confirmar lo descrito anteriormente puede ser mediante la determinación de actividad catalítica de la enzima en forma libre y compararla con la misma enzima, pero ya adsorbida en el soporte, es decir, utilizar la misma cantidad de proteína para el ensayo de actividad tanto para la forma libre como la inmovilizada. En la figura 5.4.5.A se observa en las barras blancas que el contenido de proteína es ligeramente mayor para el extracto crudo comparado con el biocatalizador, sin embargo, la actividad que presenta este último es 56 % más que la enzima libre. Por otro lado en la figura 5.4.5.B se observa que se llevó a cabo un ensayo parecido, sólo que en éste se mantuvo la actividad lipolítica constante (barras oscuras) y se varió la cantidad de proteína. El resultado fue que el biocatalizador usó 32.2 % menos proteína que la enzima libre para realizar la misma catálisis. En una investigación de Palomo y col., (2002) [46] observaron un incremento en la actividad de la enzimas de *Mucor miehei*, *Candida rugosa* y *Candida antarctica*. En una publicación más reciente Aucoin y col., (2004) [8], también realizan una inmovilización mediante adsorción interfacial obteniendo un aumento en la actividad de *Rhizomucor miehei*.

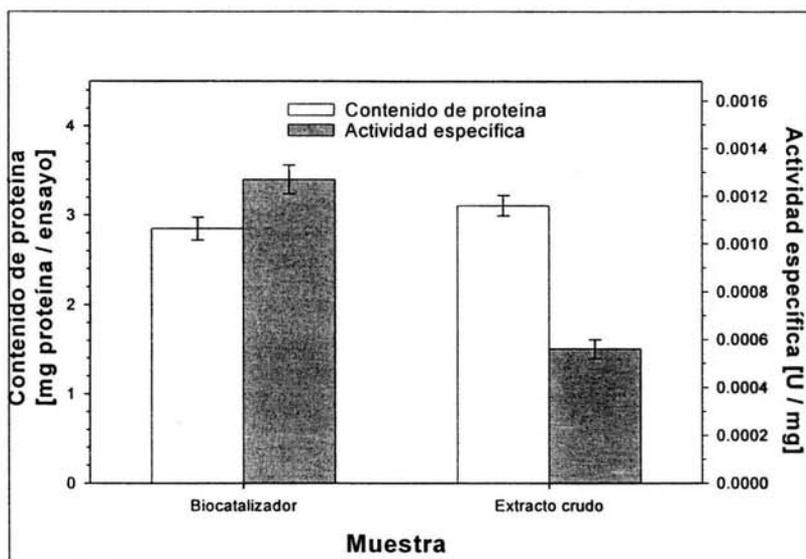


Figura 5.4.5.A Activación de la enzima mediante su adsorción al soporte. El ensayo se realizó mediante la hidrólisis del o-NFL usando la misma cantidad de proteína.

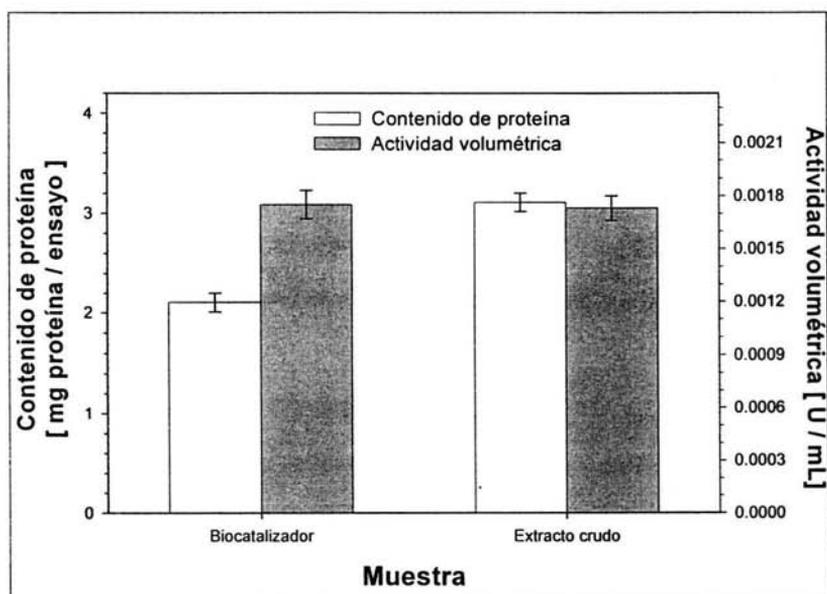


Figura 5.4.5 B Activación de la enzima mediante la adsorción al soporte. El ensayo se realizó mediante la hidrólisis del o-NFL usando diferente cantidad de proteína.

### 5.5 Estabilidad operacional del biocatalizador

Para que una enzima sea apropiada en una aplicación comercial, su estabilidad operacional debe ser suficiente para dicha aplicación. En condiciones industriales, es recomendable que la fuerza de la lipasa adsorbida al soporte sea suficientemente alta para prevenir la desorción, sin embargo, también es conveniente que la enzima pueda ser desorbida y reutilizar el soporte (recargándolo con enzima fresca). En la inmovilización de enzimas mediante adsorción la especificidad del sustrato generalmente no cambia y la regeneración del soporte puede ser posible después del tratamiento con detergentes y agentes desnaturalizantes [46,39].

La estabilidad operacional se estudió mediante la hidrólisis del o-NFL reutilizando el biocatalizador en ciclos continuos. En la figura 5.5 se observa que en el primer ciclo pierde sólo el 10% de su actividad inicial, pero en el segundo ciclo, disminuye el 50% de su actividad inicial. Paiva y col., (2000) [49] mencionan en su investigación que la mayor desventaja de la inmovilización por adsorción es la lixiviación de la enzima del soporte durante su utilización, por lo que el comportamiento que tiene el biocatalizador puede ser porque las interacciones entre enzima-soporte son débiles y, aunado al manejo brusco, como por ejemplo, la agitación en el baño de temperatura constante, tal vez origine que la enzima se desorba del biocatalizador. Por lo tanto al determinar nuevamente la actividad se presenta una menor catálisis (ya que sólo se mide la actividad de la enzima que está más fuertemente adsorbida). No obstante, no se conoce la causa en la disminución de actividad del biocatalizador, ya que como se mencionó anteriormente pudo ser por la desorción de la enzima o por la inactivación propia de la enzima.

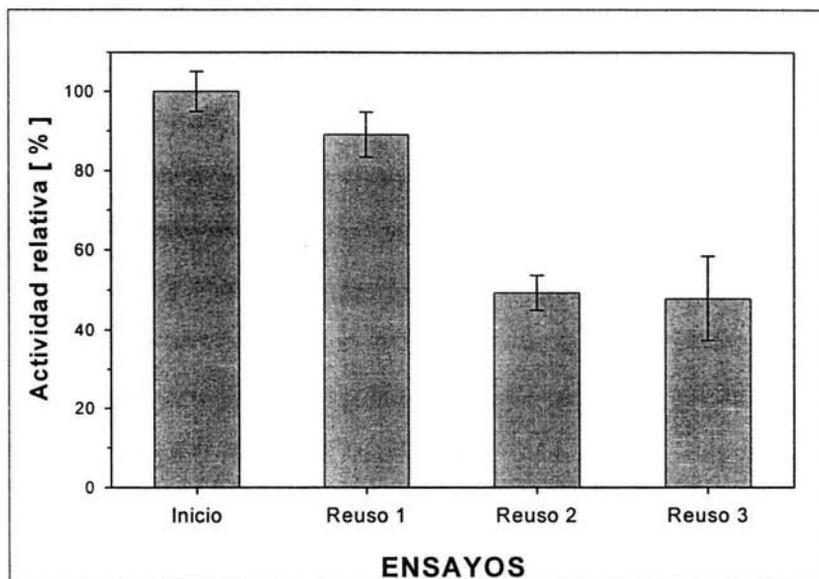
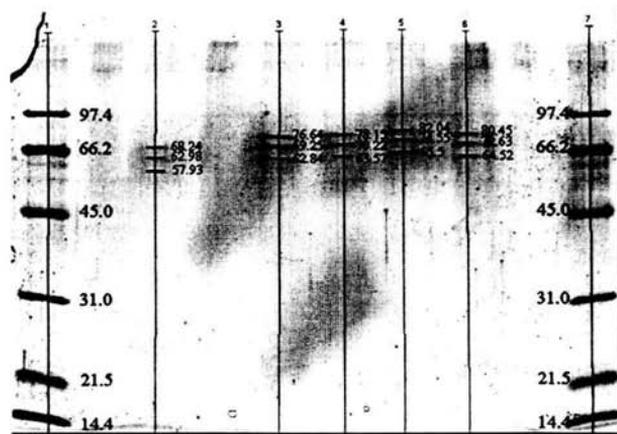


Figura 5.5 Capacidad de reutilización del biocatalizador en ciclos continuos La actividad se realizó con la hidrólisis del *o*-NFL.

### 5.6 Perfil electroforético de la proteína inmovilizada

Una forma de evaluar la eficiencia de la inmovilización en términos de proteína adsorbida en el biocatalizador es su identificación en geles de poliacrilamida, lo que además permite identificar las proteínas responsables de la actividad lipolítica. En algunas publicaciones utilizan agentes disociadores como Tritón X-100, urea, guanidina para fomentar la desorción de la enzima y analizarla mediante SDS-PAGE. [11,35,45,46].

En la figura 5.6 se observa el gel SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y cargado de 30  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. Se aprecia el perfil electroforético del extracto crudo en el carril 2 y en los carriles 3-6 la proteína desorbida del biocatalizador a diferentes tiempos de adsorción. En todos los carriles se presenta el mismo triplete característico con pesos moleculares que van de 60 – 80 kDa. Este resultado no permite diferenciar entre la(s) proteína(s) involucradas en la actividad lipolítica. A pesar de que el soporte no presenta selectividad por una proteína en particular, se observa su eficacia en la adsorción de proteínas contenidas en el extracto crudo.



**Figura 5.6** Electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida. Carril 1 y 7: MPM Carril 2: extracto crudo, Carril 3, 4, 5 y 6: Enzima inmovilizada durante 0.5, 2, 5 y 24 h, respectivamente.

## 6 CONCLUSIONES

- ✓ Las condiciones óptimas de inmovilización de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 fueron: concentración del extracto crudo de 2 mg proteína / mL, el pH y la fuerza iónica del buffer de reacción de 9.0 y 50 mM, respectivamente, mientras que la temperatura y tiempo óptimo de inmovilización fueron de 4 °C y 5 h, respectivamente.
- ✓ Se demostró que el Accurel® MP1000 es un soporte eficiente para inmovilización de lipasa, ya que el biocatalizador obtenido incrementó la actividad lipolítica en un 55% comparándola con la enzima libre.
- ✓ La inmovilización no mejoró la temperatura, pero si la estabilidad térmica de la enzima cuando se incubaba 30 min / 100 °C, ya que sólo disminuyó 20 % de su actividad inicial, mientras que la enzima libre pierde el 80 %; respecto a la estabilidad en almacenamiento, es similar tanto para la enzima libre como para el biocatalizador en las condiciones de ensayo ( 4 °C / 15 días).
- ✓ El perfil de actividad respecto a pH fue mejor para el biocatalizador ya que este mantiene más actividad a medida que se acidifica el medio de reacción.
- ✓ La vida media del biocatalizador sólo permitió dos ciclos de hidrólisis sucesivas antes de disminuir el 50 % de su actividad inicial.
- ✓ El análisis electroforético de la(s) proteína(s) responsables de la actividad lipolítica no permitió distinguir la enzima adsorbida, ya que se observaron las mismas bandas tanto en la muestras desorbidas como en el extracto crudo.

## ANEXO I. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Las aplicaciones biotecnológicas de las lipasas originan una demanda rápida de técnicas para determinar no sólo su actividad, sino el sustrato a utilizar. Sin embargo, no existe un método universal que permita la determinación simultánea de estas propiedades. La actividad de las lipasas puede determinarse monitoreando la liberación de ácidos grasos (hidrólisis) o también, por la formación de ésteres de ácidos grasos (síntesis).

La actividad hidrolítica puede ser determinado cualitativamente por difusión en gel y cuantitativamente mediante ensayos a) titulométricos; b) colorimétricos; c) fluorescencia; d) procedimientos cromatográficos y, e) métodos inmunológicos [28,50,61]. Particularmente, los métodos colorimétricos y fluorimétricos son la mejor opción por su rapidez, precisión y simplicidad, aunque tienen la desventaja de que los sustratos son diversos y costosos. A pesar de ello en investigaciones realizadas en el grupo de trabajo [51,64], se estableció que el método espectrofotométrico con *o*-NFL presentó la ventaja de ser muy sensible y rápido a diferencia de los métodos de titulación de ácidos grasos liberados y disminución de pH que también fueron ensayados. No obstante, es importante establecer que presenta ciertas limitantes químicas e instrumentales:

- No es específico para las lipasas, ya que también detecta actividad esterasa.
- El *o*-NF liberado, resultado de la hidrólisis de la lipasa, deberá estar como ión *o*-nitrofenolato para cuantificarse totalmente debido a que esta forma ionizada es la que absorbe a 410 nm.

Es importante señalar la importancia de alcalinizar el medio, debido a que es la mayor limitante de este ensayo y la reacción enzimática no puede medirse a pH's ácidos dada la poca o nula absorbancia del *o*-nitrofenol. Finalmente, una consideración importante al realizar la actividad enzimática en función del pH, es que el *o*-nitrofenol tiene diferentes coeficientes de adsorción a diferentes valores de pH, por lo que será necesario tener un estándar apropiado a cada valor de pH e incorporarse al protocolo de actividad.

#### **Método espectrofotométrico con *o*-nitrofenil laurato:**

**Fundamento:** La lipasa reconoce y cataliza la reacción de hidrólisis del *o*-NFL generando un compuesto colorido, el *o*-NF que en medio alcalino absorbe en la región visible a 410 nm.

#### **Curva patrón de *o*-nitrofenol:**

1. Pesar la cantidad de *o*-nitrofenol para tener una solución *stock* de 40 µg/mL
2. Tomar alícuotas de la solución *stock* y diluir con agua destilada hasta llevar a un volumen de 1 mL, como se indica en la tabla 1.
3. Adicionar 250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.8N). Mezclar y registrar la lectura de absorbancia a 410 nm. Volumen final = 1.25 mL
4. Construir una gráfica de absorbancia vs. concentración.

Tabla 1. Preparación de la curva patrón

Tubo	Stock [mL]	Agua [mL]	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> [mL]	o-NF [µg/mL]	Absorbancia		
					1	2	3
blanco	0.0	1.0	0.25	0.0	0.000	0.000	0.000
1	0.1	0.9	0.25	3.2	0.099	0.095	0.096
2	0.2	0.8	0.25	6.4	0.200	0.198	0.198
3	0.3	0.7	0.25	9.6	0.296	0.300	0.301
4	0.4	0.6	0.25	12.8	0.392	0.396	0.397
5	0.5	0.5	0.25	16.0	0.492	0.495	0.495
6	0.6	0.4	0.25	19.2	0.593	0.591	0.597
7	0.7	0.3	0.25	22.4	0.690	0.690	0.694
8	0.8	0.2	0.25	25.6	0.792	0.794	0.794
9	0.9	0.1	0.25	28.8	0.886	0.890	0.890
10	1.0	0.0	0.25	32.0	0.984	0.988	0.988

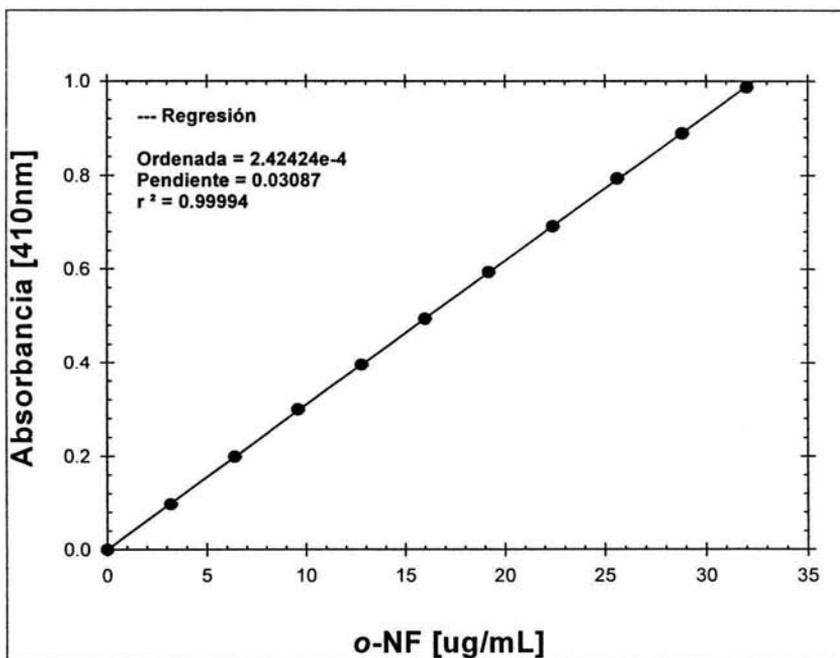
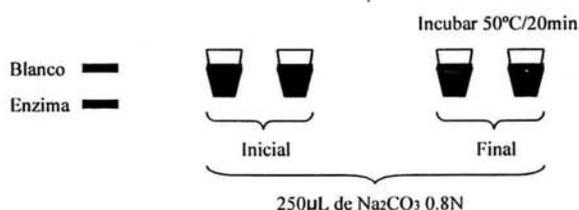


Figura 1. Curva Patrón de o-NFL. Se usó como referencia o-nitrofenol (Sigma)

**Ensayo de actividad lipolítica para *Bacillus pumilus* GMA1:** La actividad fue determinada de acuerdo al método descrito por Isobe y col. (1988) [31], con una ligera modificación:

1. Pesar 8.035 mg de *o*-NFL (25  $\mu$ mol) y disolverlo con 200  $\mu$ L de Tritón X-100.
2. En un tubo de ensayo verter 9.8 mL de solución amortiguadora CHES 100 mM, pH 10.
3. Adicionar el sustrato a la solución amortiguadora y mezclar perfectamente.
4. En tubos eppendorf colocar 900  $\mu$ L de la mezcla previa y adicionar 100  $\mu$ L de enzima y/o buffer (blanco). Registrar absorbancia inicial.\*
5. Incubar los tubos a 50 °C durante 20 min. Transcurrido el tiempo, añadir 250  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y registrar la absorbancia final.\*
6. Con la absorbancia residual y mediante la ecuación de la recta de la figura1, calcular la cantidad de *o*-NF liberado.
7. Una unidad enzimática corresponde a la cantidad de enzima requerida para liberar 1 $\mu$ mol de *orto*-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo descritas previamente.

\*Para la determinación de actividad lipolítica se requieren 2 tubos para el  $t_0$  =inicial y 2 para el  $t_1$  =20min. Para iniciar la reacción enzimática verter la enzima ó buffer(Blanco) al sustrato e incubar los tubos durante 20 min. A los tubos del tiempo inicial adicionar el álcali, mezclar y registrar absorbancia inicial. Transcurrido el tiempo de incubación añadir el álcali, mezclar y registrar la lectura de absorbancia.



## ANEXO II. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR LOWRY - SDS.

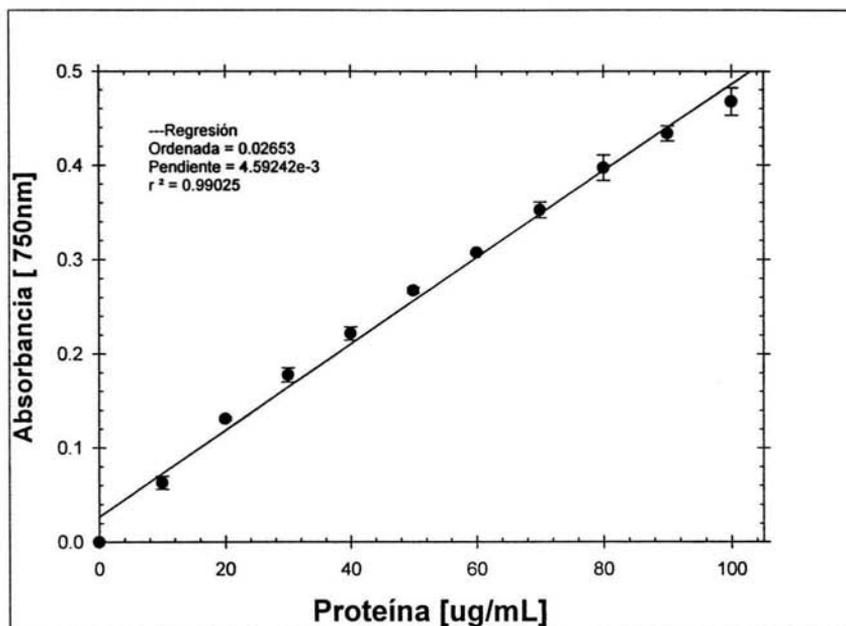


Figura 1. Curva Patrón de Proteína. Se usó como referencia Albúmina Sérica Bovina (Sigma).

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Al-Duri, B., Robinson, E., McNerlan, S., Bailie, P., (1995). Hydrolysis of Edible Oils by Lipases Immobilized on hydrophobic supports: Effects of Internal Support Structure. *JAACS* 72:1351-1359.
2. Al-Duri, B., Yong Y.P. (1997). Characterisation of the equilibrium behavior of lipase PS (from *Pseudomonas*) and Lipolase 100L (from *Humicola*) onto Accurel EP100. *J Mol Catal B* 3:177-188.
3. Al-Duri, B., Yong Y.P. (2000) Lipase immobilisation: An equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochem Eng J* 4:207-215.
4. Al-Duri, B., Goddard, R., Bosley, J. (2001). Characterisation of a novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide. *J Mol Catal B* 11:825-834.
5. Arpigny, J. L., Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343:177-183.
6. Arrollo, M. (1998). Immobilized Enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharma* 39(2) 23-39.
7. Arrollo M., (2001). *Tecnología enzimática*. Ed.Complutense. Madrid España. Pág.8-26.
8. Aucoin, M. G., Erhardt, F. A., Legge, R. L. (2003). Hyperactivation of *Rhizomucor miehei* lipase by hydrophobic xerogels. *Biotechnol Bioeng* 85:647-655.
9. Balcao, V. M., Vieira, M. C., Malcata, F. X. (1996). Adsorption of protein from several commercial lipase preparation onto a Hollow-Fiber membrane module. *Biotechnol Prog* 12:164-172.
10. Balcao, V. M., Malcata, X.. (1998). Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnol. Adv.* 16:309-341.
11. Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., Guisán, J. (1997). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 58:486-493.
12. Bickerstaff Gordon F. (1997) Immobilization of enzymes and cells. Humana Press USA Pág. 1-11, 327-343.

13. Bornscheuer, U.T., Bessier, C., Srinivas, R., Krishna, S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends Biotechnol 20:433-437.
14. Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis Fems Microbiol Lett 26:73-81.
15. Bosley, J.A., Peilow, A. D., (1997). Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading JAOCS 74:107-111.
16. Burton, S. G., Cowan, D. A., Woodley, J. M. (2002). The search for the ideal biocatalysts. Nature Biotechnol. 20:37-45.
17. Bustos-Jaimes, I. (1995). Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipase proveniente de un ambiente extremo. Tesis, Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
18. Cheetham, Meter S.J. (1998). What makes a good biocatalysts. J. Biotechnol. 66: 3-10.
19. Chen, J. C., Tsai, S. W. (2000). Enantioselective synthesis of (S)-Ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on accurel MP1000. Biotechnol Prog 16:986-992.
20. Dosanjh, N. S., Kaur, J. (2002). Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus* sp. Biotechnol Appl Biochem 36:7-12.
21. Dumitriu, E., Secundo, F., Patarin, J., Fechete, I. (2003). Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. J Mol Cat B 1-15.
22. Eggert, T., Pouderoyen, G. V., Dijkstra, B. W., Jaeger, K. E. (2001). Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. FEBS Lett 502:89-92.
23. Fernández-Lafuente, R., Armisén, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. Chem Phys Lipids 93:185-197.
24. Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Palomo, J. M., Mateo, C., Bastida, A., Coca, J., Haramboure, T., Hernández-Justiz, O., Terreni, M., Guisán, J.M. (2001). Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. J. Mol Cat B 11:649-656.

25. Foresti, M. L., Ferreira, M. L., (2004) Ethanol pretreatment effect and particle diameter issues on the adsorption on *Candida rugosa* lipase onto polypropylene powder. *Appl Surf Sci* 1-5.
26. Gacesa, Peter. (1990). *Tecnología de las enzimas*. Ed. Acribia. Zaragoza España. Pág. 89-102.
27. Gitlesen, T., Bauer, M., Adlercreutz, P., (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim Biophys Acta* 1345:188-196.
28. Gupta, R., Rath, P., Gupta, N., Bradoo, S. (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem* 37:63-71.
29. Gupta, R., Gupta, N., Rath, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763-781.
30. Hyung, K. K., Hwa J. C., Myung, H. K., Cheon, B. S., Tae, K. O. (2002) Expression and characterization of Ca<sup>2+</sup> independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim Biophys Acta* 1583:205-212.
31. Isobe, K., Akiba, T., Yamaguchi, S. (1988). Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. *Agric Biol Chem* 52:41-47.
32. Jaeger, K. E., Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 16:396-403.
33. Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315-351.
34. Jaeger, K. E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13:390-397.
35. Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *J Mol Cat B* 22:307-313.
36. Koops B., Papadimou E. Verheij H.M. (1999). Activity and stability of chemically modified *Candida antarctica* lipase B adsorbed on solid supports. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:791-796.
37. Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., Koutinas, A. A. (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 21:377-397.

38. Laemmli, V.K. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
39. Malcata, F. X., Reyes, H. R., García, H. S., Hill, C. G., Amundson, C. H. (1990) Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. *JAOCS* 67:890-910.
40. Matsumoto, M., Ohashi, K., (2003). Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. *Biochem Eng J* 14:75-77.
41. Min, K. Tsung, Gardner W. Harold. (2002). *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker USA Pág. 371-383.
42. Murray, M., Rooney, D., Van Neikerk, M., Montenegro, A., Weatherley, L.R. (1996). Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. *Process Biochem* 32:479-486.
43. Noinville, S., Revault. M., Baron, M. H. (2002). Conformational changes of enzymes adsorbed at liquid-solid interface: Relevance to enzymatic activity. *Biopolymers* 67:323-326.
44. Nthangeni, M. B., Patterson, H. G., Tonder, A. V., Vergeer, W. P., Litthauer, D. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb Technol* 28:705-712.
45. Oliveira de C. P., Alves M. G. Castro, H. (2000). Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochem Eng J* 5:63-71.
46. Palomo, J. M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2002). Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Cat B* 19-20:279-286.
47. Palomo, J. M., Segura, R.L., Fernandez-Lorente, G., Pernas, M., Rua, M. L., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente R. (2004). Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog* 20:630-635.
48. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29:119-131.

49. Paiva, A. L., Balcao, V. M., Malcasa, F. X. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 27:187-204.
50. Pencreac'h, G., Baratti, J. C. (2001). Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. *Enzyme Microb Technol* 28:473-479.
51. Peña, M. C. (2001). Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis, Maestría en Ciencias, Facultad de Química, UNAM.
52. Persson M., Mladenoska I., Wehtje E., Adlercreutz P. (2002). Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 31:833-841.
53. Peterson, L. G., (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. Wich is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.
54. Reetz M. T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 6:145-150.
55. Salis, A., Sanjust, E., Solinas, V., Monduzzi, M. (2003). Characterization of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization. *J Mol Catal B* 1-8.
56. Salis, A., Svensson, I., Monduzzi, M., Solinas, V., Adlercreutz, P. (2003). The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Biochim Biophys Acta* 1646:145-151.
57. Sarda, L., Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim Biophys Acta* 30:513-521.
58. Schmid D. R., Verger R. (1998). Lipases : Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition* 37(12) 1608-1633.
59. Sharma, R., Chisti, Y., Chand, B. U. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19:627-662.
60. Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Gupta, L. K., Gupta, J. K. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem* 37:1075-1084.
61. Thomson, C. A., Delaquis, P. J., Mazza, G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 39 (2) 165-187.

62. Tyndall, J. D. A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, I. A., Taylor, P., Walkinshaw, M. D. (2002) Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *J Mol Biol* 323:859-869.
63. Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., Haas, M. J., (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B* 9:113-148.
64. Wong de la Mora, P. (2001). Lipasa Termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción Fermentativa y Algunas propiedades. Tesis, Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.