



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS
LIPASAS DE *Candida antarctica*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A :

Q.A. SANDRA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ



**TUTOR:
DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA**

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Mario Calcagno Montans	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dr. José Mariano García Garibay	UAM-Iztapalapa
Suplente	Dr. Edgardo Escamilla Marván	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Alimentos y Biotecnología. Laboratorio 314, Edificio E.
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Eduardo Bárzana García
Tutor de Tesis

Q.A. Sandra Paola Sánchez Rodríguez
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

- » A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y poder aprovechar de toda su infraestructura durante mi desarrollo académico.
- » Al Dr. Eduardo Bárzana García por su confianza para permitirme desarrollar este proyecto contando siempre con todo su apoyo. Mi más sincero agradecimiento por haberme guiado de manera inteligente durante todos estos años que he colaborado en su grupo de investigación.
- » A los doctores miembros de mi comité tutorial: Dra. Carmen Wachter y Dr. Edgardo Escamilla por su importante colaboración y asesoría brindada durante el desarrollo de este proyecto. En especial al Dr. Edgardo Escamilla, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo experimentos de purificación de proteínas.
- » Se reconoce la colaboración de la Dra. Amelia Farrés, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo experimentos de determinación de pureza de proteínas. En especial a la M.C. Idalia Flores Argüello por su valiosa ayuda y asesoría técnica en los experimentos de purificación de proteínas.
- » A los miembros de mi Jurado: Dra. Amelia Farrés, Dr. Mario Calcagno Montans, Dr. José Mariano García Garibay y Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por sus aportaciones y sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo.
- » Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo de mi maestría.

DEDICATORIAS

Este trabajo no sólo es el fruto de más de dos años de investigación, ni de cientos de horas de laboratorio, ni de decenas de fines de semana sacrificados, ni siquiera de todas las horas de estudio desde que era una niña, es el fruto, también, de cientos de personas que han aportado algún grano de arena a la persona que ahora soy. Esta Tesis representa un punto y seguido en mi formación y en mi trayectoria personal. En especial quisiera dedicarla:

- » A mis padres por su amor, apoyo incondicional y sacrificios que me permitieron alcanzar este logro.

- » A mis cuatro hermanas, por que se que puedo contar con ellas en los momentos difíciles, además de que su compañía me ha motivado a salir siempre adelante.

- » A toda mi familia, tíos, primos, sobrinos y en especial a mis abues Lolita y Eva por su cariño y por servirme de ejemplo de personas que siempre luchan para salir adelante, las quiero mucho.

- » A mis amigos del laboratorio por haber contribuido a crear un ambiente de trabajo agradable para soportar largos días de experimentos y trabajo. También gracias por la ayuda que me brindaron en algún momento.

- » A todos mis amigos, en especial quiero agradecer a Issis, Edith, Ana y Brenda, por que se que nuestra amistad es para toda la vida.

- » A Mau por todos los momentos que hemos pasado juntos. Tu ayuda y apoyo fueron muy valiosos para poder concluir mi trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVOS	4
3 HIPÓTESIS	4
4 ANTECEDENTES	5
4.1. Lipasas.....	5
4.2. Fuente y Aplicación de las Lipasas.....	10
4.3. Producción de Lipasas Microbianas.....	14
4.4. Efecto de Inductores.....	14
4.5. Efecto de la Transferencia de Oxígeno (OD).....	19
4.6. Determinación de Actividad Lipolítica.....	20
4.7. Lipasas de <i>Candida antarctica</i>	20
4.7.1. Características de <i>Candida antarctica</i>	20
4.7.2. Lipasas de <i>Candida antarctica</i>	21
4.8. Purificación de las Lipasas.....	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Materiales y reactivos.....	28
5.2. Equipos.....	31
5.3. Metodología.....	33
5.3.1. Estandarización del inóculo inicial de <i>Candida antarctica</i>	34
5.3.2. Cultivo de <i>Candida antarctica</i> a nivel matraz.....	35
5.3.3. Producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> en fermentador de 5L.....	36
5.3.4. Análisis de las cinéticas de fermentación.....	38
5.3.5. Actividad lipolítica en las células.....	41
5.3.6. Purificación de CALB.....	41
5.3.7. Determinación de pureza mediante electroforesis.....	44
5.3.8. Preparación de zimogramas.....	44
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1. Crecimiento y producción de las lipasas a nivel matraz.....	45
6.2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> a nivel matraz.....	46
6.3. Efecto del oxígeno disuelto (OD) sobre la producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> a nivel fermentador (5L).....	52
6.4. Efecto de las condiciones de fermentación sobre la morfología de <i>Candida antarctica</i>	61
6.5. Producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> en el sobrenadante y en el medio de cultivo completo.....	64
6.6. Efecto del Tritón-X100 sobre la secreción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i>	65
6.7. Purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i>	67
7.7.1. Obtención del extracto crudo de las lipasas.....	67
7.7.2. Secuencia de purificación.....	69
7 CONCLUSIONES	74
8 RECOMENDACIONES	75
9 BIBLIOGRAFÍA	76
10 ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1	Aplicación industrial de las lipasas microbianas..... 10
Tabla 2	Algunas lipasas que se encuentran disponibles comercialmente..... 13
Tabla 3	Descripción de algunas levaduras productoras de lipasas, su localización celular y número de isoenzimas producidas por cada una..... 18
Tabla 4	Características de CALA y CALB..... 22
Tabla 5	Descripción del grado de pureza de algunas lipasas comerciales..... 25
Tabla 6	Formulación por litro del medio de cultivo YM..... 28
Tabla 7	Formulación por litro del medio de cultivo YM, con diferentes concentraciones de glucosa..... 28
Tabla 8	Sustratos lipídicos empleados..... 28
Tabla 9	Concentración de glucosa e inductores estudiados..... 36
Tabla 10	Efecto de la fuente de carbono e inductores sobre la actividad lipolítica..... 48
Tabla 11	Purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> 73
Tabla 12	Purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> mediante precipitación con sulfato de amonio al 60%..... 89
Tabla 13	Purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> mediante precipitación con sulfato de amonio al 60%..... 89
Tabla 14	Purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> utilizando filtración en gel..... 92

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema de la hidrólisis y síntesis de acilglicéridos mediante lipasas.....	5
Figura 2	Modelo de acción de las lipasas en sustratos solubles e insolubles.....	6
Figura 3	Estructura de la lipasa de <i>Mucor miehei</i>	7
Figura 4	Mecanismo catalítico de las lipasas.....	9
Figura 5	Camino usado por las bacterias para secretar las enzimas lipolíticas.....	15
Figura 6	Camino de secreción en hongos filamentosos.....	16
Figura 7	Fotografías de la morfología de <i>Candida antarctica</i>	21
Figura 8	Estructura tridimensional de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	24
Figura 9	Estructura tridimensional del sitio activo de CALB.....	24
Figura 10	Diagrama del procedimiento experimental.....	33
Figura 11	Etapas involucradas en la preparación del inóculo de <i>Candida antarctica</i> para las fermentaciones a nivel matraz y a nivel fermentador.....	34
Figura 12	Diagrama del análisis de experimentos en fermentador.....	37
Figura 13	Esquema de la metodología de purificación para las lipasas de <i>Candida antarctica</i>	42
Figura 14	Crecimiento y producción de las lipasas a nivel matraz de 500 ml con 250 ml de medio YM a 165 rpm y 30°C, durante 110 h.....	45
Figura 15	Rendimiento $Y_{p/x}$ y actividad específica para cada uno de los medios de cultivo estudiados.....	49
Figura 16	Comparación de la actividad lipolítica en el medio de cultivo completo y en el sobrenadante.....	51
Figura 17	Producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> en un fermentador de 5L. Efecto del oxígeno disuelto.....	53
Figura 18	Producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> en un fermentador de 5l. Efecto de la agitación.....	54
Figura 19	Efecto de la concentración de OD sobre la producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> a 30°C.....	59
Figura 20	Efecto de la agitación sobre la producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> a 30°C.....	60

Figura 21	Morfologías observadas en fermentaciones de microorganismos filamentosos.....	61
Figura 22	Morfología de <i>Candida antarctica</i> en una fermentación con un 40% de OD.....	62
Figura 23	Producción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> en el sobrenadante y en medio de cultivo completo.....	64
Figura 24	Efecto del Tritón sobre la secreción de las lipasas de <i>Candida antarctica</i>	66
Figura 25	Recuperación de las lipasas unidas a las células mediante un lavado con agua destilada desionizada.....	68
Figura 26	Zimograma del extracto crudo de las lipasas, para demostrar la actividad de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> hacia la hidrólisis de α -naftol.....	68
Figura 27	Cromatografía sobre Fenil Sefarosa CL4B para la purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i>	70
Figura 28	Electroforesis SDS/PAGE de las fracciones obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica.....	71
Figura 29	Electroforesis SDS/PAGE para los dos primeros pasos de purificación.....	71
Figura 30	Electroforesis SDS/PAGE y zimograma de las muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico.....	72
Figura 31	Esquema del fermentador de 5 L BIOFLO III.....	80
Figura 32	Turbina Rushton de seis palas planas.....	82
Figura 33	Cromatógrama característico de la reacción de transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol.....	85
Figura 34	Efecto de la glucosa y de los diferentes sustratos lipídicos sobre la morfología de <i>Candida antarctica</i>	86
Figura 35	Recuperación de las lipasas asociadas a las células, mediante lavados con diferentes soluciones.....	87
Figura 36	Purificación de las lipasas de <i>Candida antarctica</i> mediante precipitación con sulfato de amonio, acetona y etanol.....	88
Figura 37	Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida.....	90
Figura 38	Electroforesis SDS/PAGE y zimograma de las fracciones obtenidas de la filtración en gel.....	92

RESUMEN

Las lipasas de *Candida antarctica* (actualmente reclasificada como *Pseudozyma antarctica*) tienen gran interés a nivel industrial debido a sus propiedades catalíticas. Sin embargo, existe poca información sobre las condiciones necesarias para su producción y purificación. En el presente trabajo se estudió el efecto de: (A) diferentes inductores (sustratos lipídicos), (B) la velocidad de agitación y (C) el oxígeno disuelto (OD) sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* (CalA Y CalB). También, otro propósito fue establecer una metodología de purificación para ambas lipasas.

Al estudiar el efecto de los diferentes inductores sobre el crecimiento y la producción de las lipasas (100 mL de medio de cultivo, 30°C y 165 rpm) se observó que la levadura puede crecer en todos los sustratos lipídicos pero no se observó un efecto inductor sobre la producción de las lipasas; los mejores rendimientos se obtuvieron al utilizar glucosa como única fuente de carbono.

El efecto del oxígeno disuelto y de la velocidad de agitación se estudió en un fermentador de 5L (con 4L de medio de cultivo, 30°C y una velocidad de aireación de 1.08 vvm). La mayor actividad lipolítica se obtuvo al mantener constante el OD a un 40% de saturación y su control preciso demostró ser crítico debido a que el cambio gradual de las condiciones dentro del fermentador (viscosidad, demanda de oxígeno principalmente) impiden mantener una velocidad de agitación constante. Al realizar el escalamiento para la producción de las lipasas, de matraz a fermentador, se logró reducir el tiempo de fermentación (de 110 a 72 h) y también se pudo incrementar la actividad lipolítica (~5 veces).

Una vez establecidas las condiciones a las cuales se obtiene un mejor rendimiento en la producción de las lipasas, se propuso una metodología para su purificación. Se logró una purificación más eficiente al utilizar cromatografía de intercambio aniónico sobre QAE Toyopearl (CalA y CalB no presentaron afinidad por esta resina en un rango de pH de 7 a 9), cromatografía de interacción hidrofóbica sobre Fenil Sefarosa CL4B (con la cual se incrementó considerablemente el factor de purificación) y finalmente cromatografía de intercambio catiónico sobre CM Sefarosa (la cual permitió separar ambas lipasas).

ABSTRACT

Lipasas of *Candida antarctica* (actually reclassified as *Pseudozyma antarctica*) have great interest at industrial level due to their catalytic properties. Nevertheless, there are few reports about the required conditions for their production and purification. In the present work were studied the effect of: (A) different inducers (lipidic substrates), (B) agitation speed and (C) the controlled dissolved oxygen (OD) on the production of lipasas of *Candida antarctica* (CalA and CalB). Also, another goal of this work was to establish a methodology for the purification of both lipasas.

The study of different inducers on the growth and production of lipasas (100 mL of culture medium, 30°C and 165 rpm) revealed that yeast is able to grow in all lipidic substrates but we did not observe an inductive effect on the production of lipasas; the best yields were obtained using only glucose as carbon source.

The effect of dissolved oxygen and agitation speed were studied in a 5L batch system (with 4L of culture medium, 30°C and aeration rate of 1.08 vvm). A highest lipolytic activity was obtained under constant dissolved oxygen conditions (40% of saturation) and its precisely control was critic during the whole fermentation process because constant changes in the conditions within the vessel (mainly viscosity and oxygen demand) do not allow to maintain the same agitation speed. Results, as a consequence of the increase in scale from Erlenmeyer flask to 5L batch system, showed a decrease in the fermentation time and a significant increase in the lipolytic activity (~5 times).

Once defined the adequate conditions to produce lipasas, a methodology for their purification was established. It consists in consecutive chromatographic steps, which include an anionic chromatography on QAE Toyopearl (CalA and CalB did not display affinity by this resin in a rank of pH from 7 to 9), hydrophobic chromatography on Phenyl Sepharose CL4B (which allowed a considerably increment in the purification factor) and finally cationic chromatography on CM Sepharose (which allowed to separate both lipasas).

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace dos décadas, las lipasas se encuentran entre los biocatalizadores más importantes con aplicación biotecnológica, debido a que pueden llevar a cabo bioconversiones de interés comercial de compuestos orgánicos de baja polaridad en medios con bajo contenido de agua. Entre sus principales características, podemos mencionar que pueden catalizar una amplia variedad de reacciones (esterificaciones, transesterificaciones, alcoholisis, aminólisis, acidólisis e hidrólisis), su estabilidad bajo condiciones de pH y temperaturas moderadamente altas. En el caso de medios orgánicos (tales como el hexano), mantienen su capacidad catalítica y también muestran una elevada quimio-, regio-, y enantioselectividad, así como alta estéreo-especificidad (Vakhlu y Kour, 2006; Muralidhar *et al.*, 2002; Schmid y Verger, 1998; Jaeger, 1998 y 1999).

Entre las lipasas disponibles, las lipasas microbianas son las que tienen mayor aplicación industrial (principalmente las de origen fúngico), debido a que las cepas pueden ser cultivadas más fácilmente y a un bajo costo de extracción (Vakhlu y Kour, 2006). Su naturaleza enantioselectiva y regioselectiva ha sido utilizada para la resolución de medicamentos quirales, para la modificación de grasas, para la producción de biocombustibles y productos del cuidado personal, así como para la elaboración de potenciadores de sabor. Su principal uso industrial se encuentra en la formulación de los detergentes, la cual representa un 32% del mercado total para este tipo de enzimas (Sharma *et al.*, 2001). Debido a su capacidad de ser catalíticamente activas en medios no-acuosos, las lipasas han sido las enzimas más estudiadas por investigadores de diversas disciplinas.

Dentro de las lipasas de importancia, *Candida antarctica* produce dos diferentes lipasas extracelulares. Esta levadura actualmente se ha reclasificado como *Pseudozyma antarctica*, ya que estudios recientes han sugerido una relación más cercana con el género *Pseudozyma* (Hoegh *et al.*, 1995). En este trabajo se decidió utilizar el nombre de *Candida antarctica* para fines aplicativos, ya que las lipasas producidas y comercializadas por esta especie son conocidas como lipasa A y B de *Candida antarctica* (CalA y CalB).

La lipasa B (CalB) es una de las hidrolasas más estudiadas en el campo biocatalítico, principalmente porque no requiere de activación interfacial y por su eficiencia en síntesis regio- y enantio- selectivas (Anderson *et al.*, 1998). Estas propiedades y su gran potencial como biocatalizador han sido reportadas en un gran número de investigaciones (Martinelle *et al.*, 1995; Raza *et al.*, 2001; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Uppenberg *et al.*, 1995; Blank *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta ahora hay relativamente pocos estudios en donde se describa el uso de CalB en procesos industriales. Una posible razón es el alto precio que tienen las preparaciones comerciales de esta enzima (inmovilizadas sobre materiales sólidos): Novozyme 435 (Novozymes A/S) y Chirazyme (Roche Molecular Biochemicals). Debido a esto, su aplicación reside principalmente en la producción de compuestos químicos de alto valor agregado, en donde se aprovecha su reutilización sin observar pérdidas considerables en su capacidad catalítica. Un proceso industrial en donde se usa CalB es la producción de isopropil miristato, el cual es utilizado como ingrediente en cosméticos. En cuanto a la lipasa A (CalA), su uso es escaso y su estructura tridimensional no ha sido aclarada. Sin embargo, CalA es un biocatalizador muy útil con una gran variedad de aplicaciones, las cuales se han descrito especialmente en los últimos años (Domínguez *et al.*, 2005). CalA presenta características únicas entre las hidrolasas, como son su alta termoestabilidad, su capacidad de aceptar alcoholes que presentan impedimento estérico, su reconocimiento sn-2 en la hidrólisis de triglicéridos, su selectividad hacia los ácidos grasos trans y su estabilidad a pH ácido y temperaturas elevadas (Kirk y Christensen, 2002).

El desarrollo de tecnologías en las que se requieran lipasas para catalizar la síntesis de nuevos compuestos es un área en expansión con miras a incrementar su aplicación en la industria. La demanda en la producción de preparaciones con alta actividad lipolítica ha llevado a investigar sobre los microorganismos productores de lipasas, sobre sus condiciones de cultivo y sobre sus propiedades bioquímicas (Ionita *et al.*, 2001). Se han publicado una gran variedad de estudios sobre la selección de cepas productoras de lipasas, sin embargo, todavía está pendiente el definir todas sus propiedades catalíticas para aplicaciones específicas y las condiciones necesarias para su producción en cuanto a los procesos de fermentación y purificación. Por lo tanto, la identificación de las condiciones que mejoren la producción de las lipasas continúa siendo un tópico importante de investigación.

La producción de las lipasas A y B de *Candida antarctica* no ha sido documentada de manera amplia en comparación con las lipasas de otros microorganismos, por ejemplo *Candida rugosa* (Sailas y Pandey, 1997; Gordillo *et al.*, 1998; Benjamín y Pandey, 1998; Pernas *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 2006). Seguramente esta información se mantiene como secreto industrial. Entre la poca información publicada sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* se encuentra la patente "Thermally stable and positionally non-specific lipase isolated from *Candida*" (Michiyo, 1993), en la que se estudia la producción de las lipasas del género *Candida* y se reportan diferentes condiciones de crecimiento en cuanto a temperatura, agitación y composición del medio, en función de la escala de la fermentación; además de algunas posibles secuencias de purificación para sus lipasas. También, Patkar *et al.* (1993) reportaron una posible secuencia de purificación para las dos lipasas de *Candida antarctica*, pero no mencionan los volúmenes de trabajo y tampoco reportan los rendimientos que obtuvieron. Posteriormente Hoegh *et al.* (1995) clonaron y expresaron los genes de estas dos lipasas en *Aspergillus oryzae*, pero no existen reportes en donde se hayan estudiado otros factores que pudieran influenciar significativamente su producción, como son la composición del medio (efecto de diferentes lípidos como inductores) y la disponibilidad de oxígeno en el medio. En varios estudios relacionados con la producción de lipasas de otros microorganismos, se ha encontrado que estos factores son de gran relevancia para el control de su secreción (Jaeger *et al.*, 1999; Lotti *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2004; Vakhlu y Kour, 2006; Chen *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2005).

Con base a esta información, resulta de interés el caracterizar el sistema de fermentación para la producción de las lipasas A y B de *Candida antarctica* (CalA y CalB). El propósito de esta investigación fue estudiar el efecto de distintos sustratos lipídicos, de la agitación y del oxígeno disuelto sobre la producción de ambas lipasas, así como establecer una metodología para su purificación, poniendo mayor atención a la recuperación de la lipasa B, ya que sus propiedades catalíticas la hacen particularmente atractiva. Posteriormente esto permitiría realizar estudios cinéticos para diferentes reacciones, incluso inmovilizada en soportes más apropiados para el estudio de reacciones específicas que permitan la obtención de productos tales como polímeros, biodiesel y una diversidad de ésteres orgánicos.

2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de diferentes inductores (sustratos lipídicos), de la velocidad de agitación y del oxígeno disuelto sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* (CaA Y CaB) y definir una metodología de purificación para ambas lipasas

3. HIPÓTESIS

La producción de las lipasas de *Candida antarctica* estará influenciada positivamente por la adición de inductores al medio de cultivo y por una alta transferencia de oxígeno disuelto durante la fermentación.

4. ANTECEDENTES

4.1 LIPASAS

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas; **EC 3.1.1.3**) son un grupo versátil de biocatalizadores. Su función principal es hidrolizar triglicéridos a glicéridos parciales y a ácidos grasos. Bajo ciertas condiciones esta reacción puede ser reversible, o sea de síntesis, donde la dirección de la reacción depende del contenido de agua disponible. Se ha encontrado que en medios con bajo contenido de agua las lipasas pueden catalizar reacciones de aminólisis, alcoholólisis, esterificación, transesterificación e interesterificación (Jaeger y Reetz, 1998; Gupta *et al.*, 2003). Los sustratos naturales de estas enzimas son triacilgliceroles de cadena larga, los cuales tienen muy baja solubilidad en agua (Figura 1). La función biológica de las lipasas es incierta en muchos casos, pero se sabe que está relacionada con la bioconversión de lípidos y también con diferentes procesos como el aprovechamiento de fuentes de carbono y la modificación o el reuso de las membranas celulares (Schmid y Verger, 1998; Bornscheuer *et al.*, 2002).

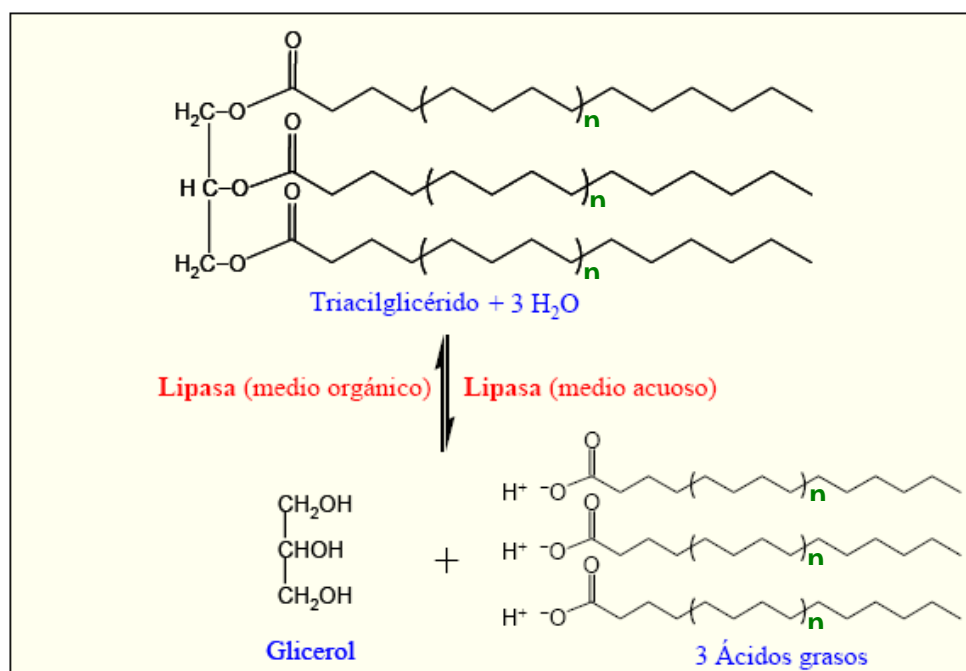


Figura 1. Esquema de la hidrólisis y síntesis de acilglicéridos mediante lipasas.

A diferencia de las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), las cuales actúan sobre moléculas de ésteres carboxílicos solubles en agua, la catálisis de la mayoría de las lipasas ocurre en una interfase lípido/agua. A este fenómeno se le conoce como activación interfacial, en el cual sólo se observa una actividad catalítica significativa en la presencia de una fase hidrofóbica, en un lípido disperso en agua o en un solvente orgánico. La cantidad de aceite disponible en la interfase determina la actividad de estas enzimas (Figura 2). Este fenómeno se ha relacionado con la presencia de un segmento hidrofóbico de la cadena polipeptídica generalmente conocido como tapa ("lid") que cubre la entrada al sitio activo de la enzima (Figura 3). En una interfase lípido/agua esta tapa experimenta un cambio conformacional permitiendo la entrada del sustrato a su sitio de unión (Schmid y Verger, 1998).

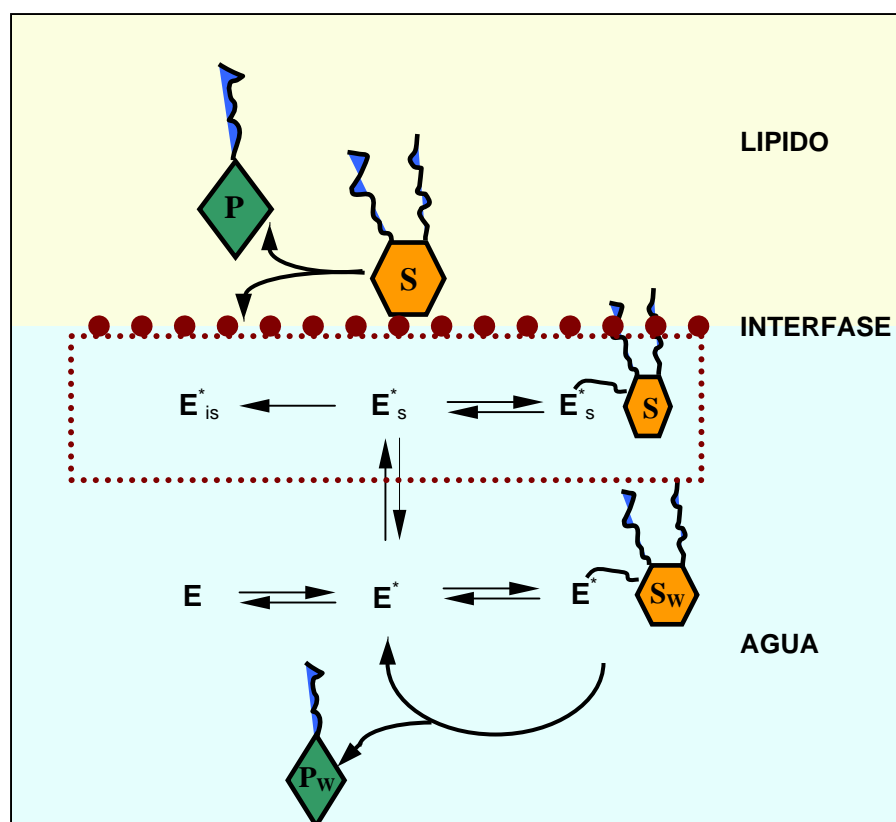


Figura 2. Modelo de acción de las lipasas en sustratos solubles e insolubles, con una lipasa que sufre cambios conformacionales para su activación. Símbolos: E (lipasa disuelta inactiva), E* (lipasa disuelta activa), E*s (lipasa activa absorbida), E*is (lipasa inactiva absorbida), Sw (sustrato soluble en agua), S (sustrato insoluble en agua), E*sS y E*Sw (complejos lipasa-sustrato), Pw (producto en fase acuosa) y P (producto en fase lipídica). (Modificada de Muralidhar *et al.*, 2002).

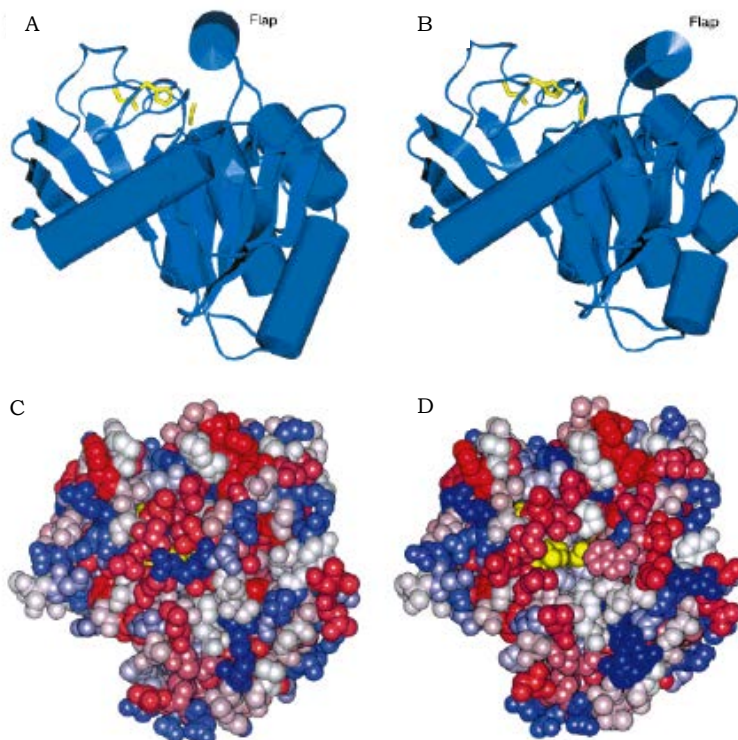


Figura 3. Estructura de la lipasa de *Mucor miehei* en su forma cerrada (A,C) y abierta (B,D). En la figura A y B se muestra la tríada catalítica (amarillo) y los elementos de la estructura secundaria mostrando el pliegue α/β hidrolasa, común en todas las lipasas. En la figura C y D se muestra la polaridad que presenta esta lipasa, el color representa un decremento en la polaridad (azúl oscuro > azúl claro > blanco > rojo claro > rojo oscuro). Sobre la abertura de la tapa, la tríada catalítica (amarillo) se convierte en (D) accesible, y la región que ata a la interfase se vuelve más apolar.

Sin embargo, existe evidencia de que no todas las lipasas presentan este fenómeno de activación interfacial. Las lipasas de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida antarctica* B, cuya estructura terciaria es conocida, presentan una pequeña tapa anfifílica cubriendo su sitio activo, pero no muestran activación interfacial (Bornscheuer *et al.*, 2002). Por tal motivo ni el fenómeno de activación interfacial o la presencia de un dominio “lid” son criterios apropiados para clasificar a una esterasa dentro de la subfamilia de las lipasas. El único criterio aceptado por el momento para diferenciar a las carboxilesterasas de las lipasas “auténticas” corresponde a la especificidad por el sustrato. Las lipasas “auténticas” son específicas para acilglicerol y otros ésteres con ácidos grasos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono), siendo la trioleína su sustrato de referencia, mientras que las carboxilesterasas actúan específicamente sobre acilglicerol de cadena corta (< 10

átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Jaeger *et al.*, 1999). Por lo tanto, para clasificar una esterasa como una lipasa, la evidencia experimental sigue siendo lo más conveniente donde lo importante es definir si pueden o no hidrolizar acilgliceroles de cadenas largas.

Con respecto a su estructura, la mayoría de las lipasas pertenecen a la familia de las α/β hidrolasas, las cuales consisten en una estructura central formada por 8 láminas β interconectadas por hélices α . El centro activo de estas enzimas tiene tres aminoácidos catalíticos cuya posición dentro del plegamiento suele estar conservada. En dicho centro activo se encuentra una serina nucleofílica, un ácido aspártico o un ácido glutámico y una histidina. La serina catalítica está generalmente incluida en el pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly, el cual forma un giro entre la lámina β 5 y la siguiente hélice α cuya función es estabilizar y orientar la serina nucleofílica, y que es conocido como "codo nucleofílico" (*nucleophilic elbow*). Además, el centro activo contiene otras estructuras que intervienen en la estabilización de los intermediarios producidos durante la catálisis "cavidad oxianiónica" (*oxyanion hole*), o que se encargan de acomodar el ácido graso a escindir "hendidura en el bolsillo de unión al ácido graso" (*scissile fatty acid binding pocket*) u otras partes del sustrato. Estas características condicionan la especificidad del sustrato y la selectividad de estas enzimas (Jaeger *et al.*, 1999).

El mecanismo catalítico de las lipasas se basa en un sistema de intercambio de cargas que consta de cuatro etapas. Tras la unión del sustrato, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre el enlace éster del lípido, lo que lleva a la ruptura del enlace y a la formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica. Seguidamente se libera el alcohol y se produce un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que ataca el enlace éster del intermediario transitorio, lo que produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico (Bornscheuer *et al.*, 2002). Las serina proteasas, también conocidas como las "proteasas de los detergentes" siguen esencialmente el mismo mecanismo (Figura 4).

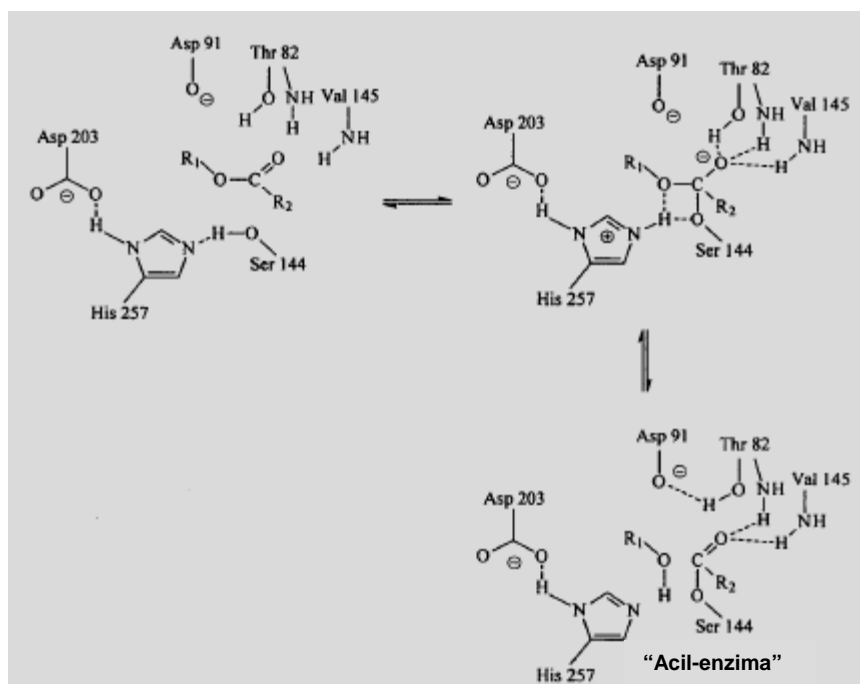


Figura 4. Mecanismo catalítico de las lipasas basado sobre una tríada catalítica de serina (núcleofilo), histidina y aspartato o glutamato (conectado a través de un puente de hidrógeno). El intermediario tetraédrico es estabilizado por una cavidad oxianión. El número de aminoácidos en este ejemplo es referido a la lipasa de *Rhizopus oryzae*.

Casi todas las lipasas tienen actividad en un amplio intervalo de pH y temperatura; generalmente presentan actividad máxima a un pH entre 7 y 9 y a una temperatura de 30 a 60°C. Se ha encontrado que su actividad óptima se obtiene en emulsiones donde se pueden obtener elevadas áreas superficiales del sustrato. Éstas no sólo son activas en emulsiones en fase normal (aceite/agua), sino también pueden presentar una mejor actividad en emulsiones invertidas (agua/aceite) y en sistemas micelares inversos (micro-emulsiones). En la naturaleza, las lipasas disponibles de diferentes fuentes presentan variaciones considerables en su especificidad para ciertas reacciones. Esta propiedad es generalmente referida como especificidad enzimática. Así, algunas lipasas tienen afinidad por ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico, cáprico, caprónico, caprílico, etc.), y algunas tienen preferencia por ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, linolénico, etc.), mientras otras no son específicas. Las lipasas usualmente muestran especificidad posicional y tienen preferencia *sn*-1 ó *sn*-3 (en relación con la posición del ácido graso en la molécula del glicerol) ó a ambas posiciones, pero no así por el ácido graso en la posición *sn*-2 (Saxena *et al.*, 2006).

4.2 FUENTE Y APLICACIÓN DE LAS LIPASAS

Las lipasas son enzimas ubicuas en la naturaleza y son producidas por una gran variedad de plantas, animales y microorganismos (Gupta *et al.*, 2004). En particular, la mayoría de las lipasas de origen fúngico son glicoproteínas monoméricas extracelulares, con pesos moleculares entre 33 y 65 kDa, y se ha reportado que generalmente se producen en forma de varias isoenzimas (Vakhlu y Kour, 2006). Los microorganismos productores de lipasas han sido encontrados en diversos hábitats como son desperdicios industriales, aceites vegetales procesados industrialmente, lecherías, suelos contaminados con aceites, alimentos en descomposición y compostas (Sharma *et al.*, 2001).

El uso comercial de las lipasas es un negocio de muchos millones de dólares y comprende una amplia variedad de aplicaciones (Tabla 1). A partir de la última década y sobre la base del gran número de investigaciones acerca de las lipasas, se ha incrementado considerablemente su uso en aplicaciones y en procesos industriales.

Tabla 1. Aplicación industrial de lipasas microbianas

INDUSTRIA	ACCIÓN	PRODUCTO ó APLICACIÓN
Detergentes Alimentos	Hidrólisis de grasas Hidrólisis de grasas en leche, maduración de quesos, modificación de grasas en mantequillas.	Remoción de manchas de grasa Desarrollo de sabores en leche, queso y mantequilla.
Panadería	Mejoramiento del sabor	Prolongación de la vida de anaquel.
Bebidas Carnes y pescados	Mejoramiento del aroma Desarrollo de sabor.	Bebidas Remoción de grasas en carnes y pescados
Grasas y aceites	Transesterificación; hidrólisis	Manteca de cacao, margarina, ácidos grasos, glicerol, mono y diglicéridos.
Química Farmacéutica	Enantioselectividad, síntesis Transesterificación, hidrólisis	Químicos, bloques quirales Lípidos especiales, ayuda digestiva
Cosméticos Piel Papel	Síntesis Hidrólisis Hidrólisis	Emulsificantes Pieles encurtidas Mejoramiento de calidad en el papel
Limpieza general	Hidrólisis	Remoción de grasas

(Sharma *et al.*, 2001)

Es de resaltar que en la industria de los alimentos se han empleado para el procesamiento de grasas y aceites, debido a que se obtienen grasas de alto valor agregado a partir de sustratos de bajo costo. Un ejemplo es la producción de sustitutos de manteca de cacao mediante la reacción de transesterificación catalizada por la lipasa de *Rhizomucor miehei*, que substituye el ácido palmítico por el ácido esteárico para proveer el triglicérido esteárico-oleico-esteárico con el punto de fusión deseado en el chocolate (Sharma *et al.*, 2001).

Desde hace varios años las lipasas se emplean como componente en los detergentes para la hidrólisis de grasas. En ésta área cerca de 1000 toneladas de lipasas son consumidas cada año. En 1994, Novo Nordisk introdujo la primera lipasa comercial recombinante, la cual era originaria de *Thermomyces lanuginosus* y fue expresada en *Aspergillus oryzae*. En 1995, para este propósito, fueron introducidas dos lipasas bacterianas —‘Lumafast’ de *Pseudomonas mendiocina* y ‘Lipomax’ de *P. alcaligenes*— por Genencor International (Jaeger y Reetz, 1998).

En la industria del papel, los componentes hidrofóbicos de la madera (principalmente los triglicéridos y las ceras), causan severos problemas durante el pulpeo y la fabricación del papel (Jaeger y Reetz, 1998). Las industrias de papel japonesas han desarrollado un método de control de estos componentes hidrofóbicos, utilizando la lipasa de *Candida rugosa* para hidrolizar hasta el 90% de los triglicéridos y ceras de la madera (Sharma *et al.*, 2001).

En la industria de los cosméticos y perfumes, su uso se debe principalmente a su actividad para producir tensoactivos y aromas, que son los ingredientes principales en estos productos. Los monoacilgliceroles y diacilgliceroles, preparados mediante la esterificación de glicerol por lipasas, son utilizados como tensoactivos en los cosméticos. Se han estudiado las lipasas de varias fuentes microbianas para realizar la transesterificación de 3,7-dimetil-4,7-octadien-1-ol y preparar el óxido de rosa, el cual es un importante ingrediente para las fragancias en la industria de la perfumería (Pandey *et al.*, 1999).

Como elementos de control medioambiental las lipasas se utilizan en el tratamiento de los derrames de aceite durante el aparejo y la refinación, en los suelos contaminados con aceites y para el tratamiento de aguas residuales. También las tuberías azolvadas de lípidos, provenientes de fábricas y restaurantes, se pueden tratar con lipasas de distintos orígenes. Se han ideado tecnologías para convertir el lodo desecado en plantas de biogás, en las cuales se utiliza una mezcla de enzimas, incluyendo lipasas. Por otro lado, se ha propuesto el tratamiento de la basura mediante el cultivo directo de microorganismos lipofílicos. Otro uso importante, es la degradación de desechos de poliésteres para convertirlos en productos útiles, especialmente para la producción de ácidos grasos no esterificados y lactonas. En el área de los servicios las lipasas han tenido una mayor importancia en la remoción de depósitos de biopelículas en los sistemas de agua de enfriamiento (Pandey *et al.*, 1999).

En el tratamiento del cuero en la industria peletera, en donde el proceso implica la depilación, el retiro de la grasa subcutánea y el relleno, una preparación enzimática con lipasas en combinación con otras enzimas hidrolíticas, tales como proteasas permite mejorar este proceso. El proceso enzimático para la producción de cuero y pieles involucra los pasos de mojado, lavado, depilación y baño en soluciones acuosas, donde cada baño tiene un pH de 8 a 13 y una lipasa alcalófila (Pandey *et al.*, 1999).

El uso de lipasas es también de interés en la elaboración de pesticidas, debido a su potencial para disminuir los costos y la contaminación del medio ambiente. Una gran variedad de pesticidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas o sus precursores) sintetizados con el uso de lipasas, están siendo comercializados actualmente. El uso más importante de las lipasas ha sido en la síntesis orgánica de los pesticidas para la producción de compuestos ópticamente activos. Generalmente, estos compuestos son producidos mediante la resolución enzimática de mezclas racémicas de ésteres de alcohol o carboxílicos (Pandey *et al.*, 1999).

El número de lipasas disponibles comercialmente se ha incrementado considerablemente a partir de 1980, debido al conjunto de ventajas que presentan estas enzimas (algunos ejemplos en la Tabla 2). Este incremento también se debe a los avances obtenidos en la clonación y expresión de enzimas, así como a un aumento en

la demanda de estos biocatalizadores (Bornscheuer *et al.*, 2002). Antes de esta década, las lipasas eran utilizadas principalmente en la formulación de detergentes y en la modificación de triglicéridos. Sin embargo, recientemente se ha incrementado el desarrollo de nuevas aplicaciones, basadas en la capacidad de estas enzimas para catalizar reacciones en sistemas con bajo contenido de agua. Se ha demostrado que pueden sintetizar ésteres en medios no acuosos, así catalizar reacciones de transesterificación, alcoholisis, hidrólisis o polimerizaciones. Estas aplicaciones tienen como potencial la eliminación de pasos químicos, debido a que las lipasas son capaces de producir compuestos ópticamente puros mediante reacciones de síntesis o mediante la resolución de mezclas racémicas (Lima *et al.*, 2003).

Tabla 2. Algunas lipasas que se encuentran disponibles comercialmente.

ORIGEN	CODIGO	MASA (kDa)	ESPECIFICIDAD	APLICACIÓN
De origen mamífero				
Lipasa pancreática humana	HPL	50	sn-1,3	
Lipasa gástrica humana	HGL	50	sn-3 (estable en ácido)	
Lipasa pancreática porcina	PPL	50	sn-1,3	Síntesis orgánica
Lipasa pancreática de cerdo	GPL-RP2	48	sn-1,3 (actividad fosfolipasa A1)	
De origen fúngico				
<i>Candida rugosa</i>	CRL	60	No específica	Síntesis orgánica
<i>Candida antarctica B</i>	CAL	60	sn-1,3	Síntesis orgánica
<i>Geotrichum candidum</i>	GCL	60	cis- Δ (ácidos grasos no saturados)	Oleoquímica
<i>Humicola laniginosa</i>	HLL	30	No específica	Detergentes
<i>Rhizomucor miehei</i>	RML	30	sn-1,3	Elaboración de queso
<i>Penicillium camemberti</i>	PEL	30	sn-1,3	Monoglicéridos
<i>Rhizopus oryzae</i>	ROL	41	sn-1,3 (actividad fosfolipasa A1)	Oleoquímica
De origen bacteriano				
<i>Pseudomonas glumae</i>	PGL	33	No específica	Detergentes, síntesis orgánica
<i>Burkholderia cepacia</i>	BCL	33	No específica	Síntesis orgánica
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	PPL	33	sn-1,3	detergentes
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CVL	33	sn-1,3	Síntesis orgánica
<i>Fusarium solani</i>	FSL	22		detergentes

(Modificada de Schmid y Verger, 1998).

4.3 PRODUCCIÓN DE LIPASAS MICROBIANAS

Las lipasas microbianas son producidas principalmente mediante cultivos sumergidos (Ito *et al.*, 2001), aunque también pueden ser usados métodos de fermentación en fase sólida. En algunos casos, también han sido utilizados cultivos con células inmovilizadas (Hemachander *et al.*, 2001). La mayoría de los estudios han estado enfocados en definir los requerimientos nutricionales y las condiciones de cultivo óptimas para la producción de lipasas en fermentación sumergida.

El estudio para la producción de las lipasas a nivel laboratorio generalmente se realiza a nivel matraz (entre 100 y 1000 mL), con medios de cultivo líquidos o utilizando pequeños fermentadores. La mayoría de los procesos para la producción de las lipasas se realizan todavía en cultivos por lote, donde los principales parámetros estudiados son composición del medio de cultivo y las condiciones de operación, de acuerdo al microorganismo que las produce (Gupta *et al.*, 2004; Jaeger y Reetz, 1998; Dalmau *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1999). Se ha demostrado que su producción está influida por los factores nutricionales y condiciones ambientales, como son la temperatura, pH, fuente de carbono y nitrógeno, presencia de lípidos, sales inorgánicas, concentración de oxígeno disuelto y agitación. También se ha encontrado que la síntesis y secreción de las lipasas de algunas cepas microbianas necesitan ser inducidas principalmente mediante la adición de algún sustrato lipídico al medio de cultivo (Corzo y Revah, 1999).

4.4 EFECTO DE INDUCTORES

En diversos estudios (Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999; Lotti *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2004, Saxena *et al.*, 2006) se ha determinado que el principal factor de expresión para la producción de las lipasas es la fuente de carbono, ya que son enzimas inducibles producidas generalmente en presencia de una fuente de carbono lipídica, como por ejemplo, aceites y algunos otros inductores como son triacilglicerol, ácidos grasos, ésteres hidrolizables, tensoactivos, sales biliares y glicerol. Ciertos ácidos grasos de cadena larga como son el oleico, linoleico y linolénico

han sido buena fuente de carbono para la producción de estas enzimas, aunque también su producción puede ser influida significativamente por otras fuentes de carbono, como son azúcares, polisacáridos, suero de la leche, casaminoácidos y otras fuentes más complejas (Gupta *et al.*, 2004).

Los lípidos son insolubles en agua y necesitan ser hidrolizados extracelularmente en sus componentes más polares para facilitar su absorción en caso de ser nutrientes para las células. En consecuencia, la mayoría de las lipasas son secretadas extracelularmente y por lo tanto deben ser translocadas a través de la membrana para llegar a su destino final. En las bacterias, generalmente estas proteínas tienen una secuencia señal, que dirige su desplazamiento fuera de la célula por medio del sistema Sec, aunque recientemente se ha descrito un segundo camino de desplazamiento, denominado camino Tat. En la Figura 5 se resumen los caminos principales de secreción para las lipasas bacterianas (Jaeger y Eggert, 2002).

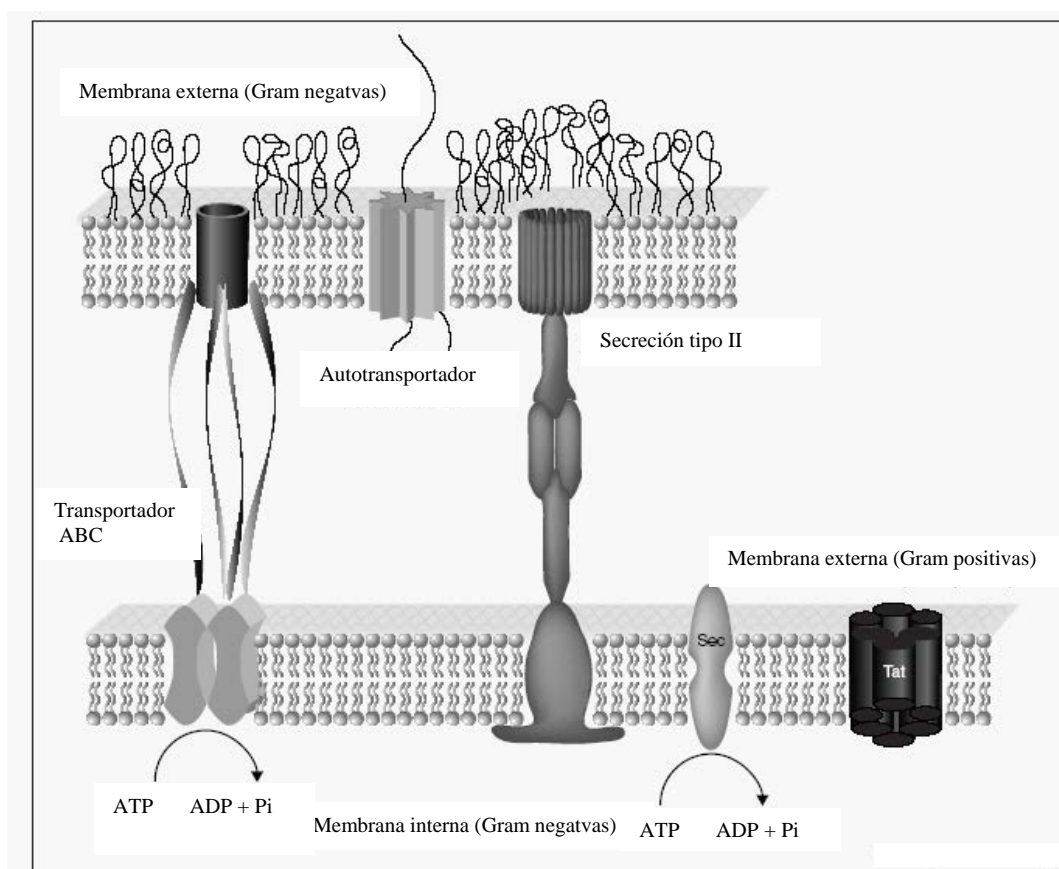


Figura 5. Caminos usados por las bacterias para secretar las enzimas lipolíticas. (Jaeger y Eggert, 2002).

En el caso de hongos filamentosos, estos son extraordinarios en su capacidad para secretar una gran cantidad de proteínas, metabolitos y ácidos orgánicos en el medio de crecimiento. El camino de secreción en los hongos no difiere grandemente del que se presenta en levaduras y eucariontes superiores, los cuales han sido más estudiados. Evidentemente hay diferencias significativas, particularmente en como es su crecimiento, en este caso resulta de una extensión polar en las extremidades de las hifas.

Las proteínas secretadas comienzan su viaje al medio extracelular con su entrada al retículo endoplásmico (RE) (Figura 6). En el RE las proteínas son plegadas y pueden someterse a distintas modificaciones como son glicosilaciones, formación de puentes disulfuro, fosforilación y ensamblaje de subunidades. Posteriormente las proteínas dejan el RE empacadas en vesículas transportadoras y se dirigen hacia el aparato de golgi donde pueden tomar lugar modificaciones adicionales como son más glicosilaciones y procesamiento peptídico. Finalmente vuelven a ser empacadas en vesículas secretoras y son dirigidas hacia la membrana plasmática donde son secretadas. En algunos casos las proteínas no llegan al espacio extracelular, pero son dirigidas hacia compartimentos intracelulares como las vacuolas donde llegan a ser proteínas residentes o se someten a degradación proteolítica.

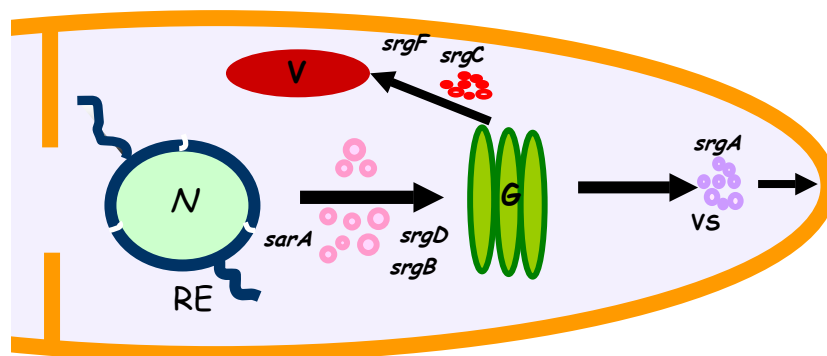


Figura 6. Camino de secreción en hongos filamentosos. GTPasas relacionadas con la secreción (*srg A-F*), núcleo (N), vacuola (V), retículo endoplásmico (RE), aparato de golgi (G) y vesículas de secreción (VS). Las proteínas son empacadas en vesículas transportadoras (Conesa *et al.*, 2001).

En varios reportes se ha demostrado que la levadura *Candida rugosa* secreta una lipasa extracelular cuya producción puede ser inducida por la adición de ácidos grasos al medio de cultivo. Esta lipasa está compuesta de varias isoformas con ligeras diferencias en sus propiedades catalíticas. Aunque también en esta misma levadura se pudo inducir la producción de una lipasa constitutiva usando glucosa como única fuente de carbono (Lotti *et al.*, 1998). Esto sugiere que la expresión de los genes que codifican para las lipasas puede estar sujeta a diferentes tipos de control, así como a la incorporación de diferentes sustancias lipídicas que pueden llevar a la producción de diferentes isoenzimas. Recientemente ha sido demostrado que el nivel de expresión de la lipasa de *Candida rugosa* puede ser modificado por medio de las condiciones de fermentación utilizadas durante su crecimiento, lo cual es consistente con la composición de isoenzimas modificadas que son obtenidas (Gordillo *et al.*, 1998). Es importante mencionar que existen varios reportes sobre las formas múltiples de las lipasas producidas por algunos microorganismos (Tabla 3). Esta multiplicidad ha sido atribuida a procesos post-transcripcionales, a la existencia de genes diferentes y a deglicosilaciones, entre otros. Se ha reportado que las levaduras de *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Geotrichum candidum* y *Yarrowia lipolytica* pueden producir formas múltiples de sus lipasas (Vakhlu y Kour, 2006).

Dalmau *et al.* (2000) reportaron el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de la lipasa de *Candida rugosa*. Al utilizar como única fuente de carbono glucosa, ácido acético, láctico, cítrico y succínico encontraron un buen crecimiento, pero una nula actividad lipolítica, mientras que sustratos relacionados con lípidos incrementaron la producción de biomasa y de la actividad lipolítica. Por otra parte, encontraron que la adición de glucosa a las células en un medio con ácido oleico como fuente de carbono puede reprimir fuertemente la producción de la lipasa, sugiriendo la existencia de un mecanismo de represión catabólica para el control de la producción de estas enzimas. Sin embargo, la glucosa estimuló la secreción de la lipasa acumulada en el interior de las células, pero el mecanismo exacto de la secreción no ha sido completamente establecido.

Por mencionar algunos otros ejemplos, la producción de la lipasa de *Pseudomonas sp* estuvo fuertemente inducida por triglicéridos y detergentes y no hubo

represión por glucosa o glicerol, además ácidos grasos de cadena larga, como el ácido oleico tuvieron un efecto inhibitorio sobre la producción de ésta lipasa. Aunque en hongos generalmente se ha encontrado que los sustratos lipídicos y ácidos grasos actúan como inductores, en algunas especies, como son *Aspergillus* o *Rhizopus*, sus lipasas son producidas constitutivamente (Dalmau *et al.*, 2000).

También se ha encontrado que la fuente de nitrógeno, incluyendo nitrógeno orgánico e inorgánico, juega un papel muy importante en la síntesis de estas enzimas. En estudios realizados por Tan *et al.* (2003) encontraron que la caseína y la harina de soya eran las mejores fuentes de nitrógeno orgánico para la producción de la lipasa de *Candida sp.* y que la mejor fuente de nitrógeno inorgánico era el sulfato de amonio ((NH₄)₂ SO₄), el cual incrementó tres veces la actividad de la lipasa.

Tabla 3. Descripción de algunas levaduras productoras de lipasas, su localización celular y número de isoenzimas producidas por cada una

FUENTE	LOCALIZACIÓN EN LA CÉLULA	ISOFORMAS
<i>Candida albicans</i>	Extracelular	10*
<i>Candida antarctica</i>	Extracelular	2*
<i>Candida rugosa</i> / <i>Cylindracea</i> ATCC 14380 DMS 2031 L 1754	Extracelular	5* 3 2
<i>Candida parapsilosis</i> CBS604	Unida a la célula	1*
<i>Geotrichum candidum</i> ATCC 34614 NRCC205002	Extracelular	2* 2*
<i>Geotrichum sp.</i> FO401B	Extracelular	2
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Extracelular	1*
<i>Trichosporon fermentans</i> WU-C12	Extracelular	2*
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Extracelular y unida a la célula	2, 1*

* Los genes que codifican a estas isoenzimas han sido identificados aislados y clonados (Modificada de Vakhlu y Kour, 2006).

4.5 EFECTO DE LA TRANFERENCIA DE OXÍGENO DISUELTO

En algunos estudios se ha determinado el efecto de la aireación y del oxígeno disuelto (OD) sobre la secreción de las lipasas. Vadehra *et al.* (1969) encontraron que la presencia de aire fue esencial para la producción de la lipasa de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, para *Syncephalastrum recemosum* se descubrió que un cultivo estático provee una mayor actividad de la lipasa que un cultivo agitado (Chopra y Chander, 1983). También se ha reportado que al mejorar la aireación del medio de cultivo mediante agitación o dispersión del aire, se obtiene un incremento en la producción de las lipasas para cualquier microorganismo, ya sea para organismos unicelulares y en la mayoría de los hongos filamentosos (Chen *et al.*, 1999).

La aireación, la agitación y la medición del nivel de OD han sido utilizados como parámetros relacionados con el control de las fermentaciones aerobias. Giuseppin (1984) reportó que la producción de la lipasa de *Rhizopus delemar* fue dependiente de la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. Un incremento en la concentración de oxígeno resultó en un incremento en la concentración de la lipasa, sugiriendo que el oxígeno fue el sustrato limitante. Contrario a esto, Genovefa *et al.* (1994) reportaron que altos niveles de aireación disminuyen la producción de la lipasa de *Staphylococcus carnosus*. Encontraron que niveles altos de aireación fueron relacionados con la producción de peróxido de hidrógeno, el cual tuvo un efecto inhibitorio en el microorganismo. La adición de catalasa al medio de cultivo incrementó la producción de la lipasa y también el crecimiento celular. En otro estudio se determinó el efecto de la aireación sobre la producción de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* a nivel matraz y encontraron que bajos niveles de aireación incrementaron la actividad lipolítica y formación de micelio en el medio de cultivo (Corzo y Revah, 1999). También Alonso *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la velocidad de agitación y del nivel de oxígeno, mediante cambios en la velocidad del flujo de aire, sobre la producción de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* y encontraron que se tiene un efecto más pronunciado de la velocidad de agitación que del flujo de aire.

4.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Se sabe que las lipasas hidrolizan los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol. Las dificultades que conlleva el hecho de que las lipasas sean enzimas solubles en medio acuoso y que actúan sobre sustratos hidrofóbicos han llevado al desarrollo de una gran cantidad de métodos para determinar su actividad y su inhibición, tales como ensayos en placas con triacilglicéridos, ensayos espectrofotométricos con diversos sustratos, principalmente derivados del *p*-nitrofenol, ensayos espectrofluorimétricos con análogos de acilglicéridos que contienen fluoróforos como la 4-metilumbeliferona (MUF), ensayos cromatográficos para la detección de moléculas como los ácidos grasos, el β -naftol o el *p*-nitrofenol liberados por las lipasas al hidrolizar los acilglicéridos o sus correspondientes análogos, métodos de titulación basados en la neutralización de la acidez generada por los ácidos grasos libres, métodos tensiométricos que miden cambios en la tensión superficial de las monocapas lipídicas y otros métodos para la detección de la actividad lipolítica o de las propiedades fisicoquímicas de estas enzimas, tales como ensayos conductimétricos, turbidimétricos, resonancia magnética nuclear, microscopía de fuerzas atómicas y cristalografía, entre otras (Gupta *et al.*, 2003).

4.7 LIPASAS de *Candida antarctica*

4.7.1 CARACTERÍSTICAS DE *Candida antarctica*

La especie *Candida antarctica* es un basidiomiceto anamórfico que actualmente se conoce con el nombre de *Pseudozyma antarctica*. La primera cepa fue aislada de sedimentos del lago Vanda en la Antártida. Posteriormente fue reclasificada en el género *Sporobolomyces*, basada en características morfológicas y fisiológicas (Goto *et al.*, 1969). Sin embargo, difiere morfológicamente con otras especies de *Sporobolomyces* en la ausencia de blastosporas. Recientes estudios han sugerido una relación más cerrada con el género *Pseudozyma* por lo que esta especie fue reclasificada con el nombre de *Pseudozyma antarctica* (Boekhout, 1995). Recientemente se han aislado cepas de esta especie de arroz no refinado cosechado en Japón, de varias frutas en Brasil, de la sangre de un paciente en Tailandia y de una

flor en Taiwán. Estas cepas presentan alta similitud en sus características fisiológicas y en su secuencias de ADNr en las regiones ITS (Wei *et al.*, 2005).

Dentro de sus características más importantes se puede señalar que es una levadura no fermentativa que presenta buen crecimiento sobre glucosa, arabinosa, sacarosa, maltosa, lactosa, glicerol, etanol y además puede crecer en NaCl al 10%. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 30°C. Forma hifas con el citoplasma retraído en las células y con esterigmatas sobre las cuales son formadas blastoconidias. Sus colonias son dimórficas con el centro plano y algunas veces levantado irregularmente, son lisas, butirosas, opacas y pueden ser de color crema a rosa. Las células en forma de levadura son elipsoidales, con conidiogénesis polar y proliferación simpodial. Su reproducción es vegetativa, mediante gemación y no presenta reproducción sexual (Boekhout, 1995). En la Figura 7 se pueden observar las características morfológicas y microscópicas que presenta esta levadura al crecer sobre agar YM.

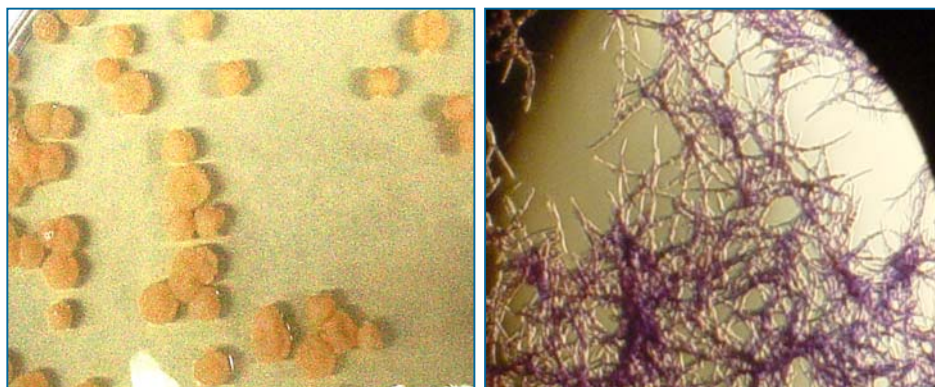


Figura 7. Fotografías de la morfología de *Candida antarctica*. a) Colonias sobre agar YM y b) Vista al microscopio, utilizando cristal violeta como colorante de contraste (40x). Estas fotos pertenecen a la cepa utilizada en este trabajo.

4.7.2 LIPASAS DE *Candida antarctica*

Como ya se indicó anteriormente, *Candida antarctica* produce dos lipasas (CALA y CALB). Ambas lipasas fueron aisladas y caracterizadas por Patkar *et al.* (1993) y Hoegh *et al.* (1995) en Novo Nordisk (actualmente Novozyme). Estas dos lipasas presentan propiedades muy diferentes (Tabla 4). La estabilidad de una enzima es un factor crítico que determina su aplicabilidad. Ambas lipasas son estables en un amplio rango de pH, sin embargo, CalA es más estable a pH ácido y CalB es más estable a pH alcalino. CalA es una enzima extremadamente termoestable, su temperatura óptima se encuentra alrededor de los 90°C, siendo probablemente una de las lipasas más termoestables descritas hasta la fecha. Aunque CalB no es tan estable en disolución como CalA, ambas lipasas son muy estables cuando se encuentran inmovilizadas en algún soporte.

Tabla 4. Características de CalA y CalB

	CalA	CalB
Peso molecular (kDa)	45	33
Punto isoeléctrico (pI)	7.5	6.0
pH óptimo	7	7
Actividad específica (LU/ mg)	420	435
Termoestabilidad a 70°C ^a	100 (100)	15 (0)
Estabilidad pH ^b	6 - 9	7 - 10
Activación interfacial	Si (pero baja)	No
Especificidad posicional hacia triglicéridos	<i>Sn</i> - 2	<i>Sn</i> - 3

^aActividad residual después de incubación a 70°C en buffer Tris 0.1 M (pH 7) por 20 min y (120 min). ^bpH al cual más del 75% de la actividad es retenida después de incubación por 20 h a temperatura controlada.

(Kirk y Christensen, 2002)

En particular, CalB tiene la capacidad de realizar reacciones tales como transesterificaciones, hidrólisis, alcoholólisis, aminólisis, glicerólisis, síntesis de ésteres y amidas de ácidos grasos y poliésteres alifáticos (Anderson *et al.*, 1998; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Rantwijk *et al.*, 2003). CalB es uno de los biocatalizadores más eficaces para la resolución de alcoholes y especialmente de aminas, permitiendo la preparación de una variedad importante de hidroxilados y amino derivados ópticamente

activos. Algunas aplicaciones potenciales para CalB son en la resolución de alcoholes secundarios, en la producción de polilactonas y poliésteres. Se ha demostrado su estabilidad en disolventes orgánicos de alta polaridad como el acetonitrilo, en líquidos iónico, en sistemas sólido/gas y en CO₂ supercrítico.

Existen pocos estudios reportados sobre la actividad y especificidad de la lipasa A. Las primeras investigaciones no revelaron alguna especificidad inusual de esta enzima. Aunque se sabe que para la hidrólisis de triglicéridos tiene preferencia por la posición *sn*-2 esta selectividad no es suficientemente pronunciada como para permitir una síntesis selectiva de 1,3-diglicéridos o 2-monoglicéridos. En la interesterificación de triglicéridos CalA demuestra no ser selectiva, no se le ha demostrado alguna especificidad inusual en la esterificación de alcoholes simples y se ha encontrado que tiene una actividad específica más baja comparada con la mayoría de las lipasas. En estudios recientes se ha reportado que demuestra ser más activa que CalB en la acilación de aminas secundarias y de alcoholes terciarios, representando un catalizador ideal en la bioresolución de compuestos con algún impedimento estérico, no obstante esta lipasa ha sido mucho menos empleada en síntesis orgánica que CalB (Gotor-Fernández *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, la mayoría de las lipasas presentan activación interfacial, es decir su actividad es mucho más alta cuando actúan sobre sustratos en una interfase agua/aceite comparado con sustratos disueltos. CalA muestra activación interfacial, mientras CalB no muestra dicho comportamiento (Martinelle *et al.*, 1995). El motivo estructural que forma la tapa del sitio activo está ausente o es muy pequeño en CalB. La estructura tridimensional de CalB fue resuelta en 1994 y se muestra en la Figura 8 (Uppenberg *et al.*, 1994).

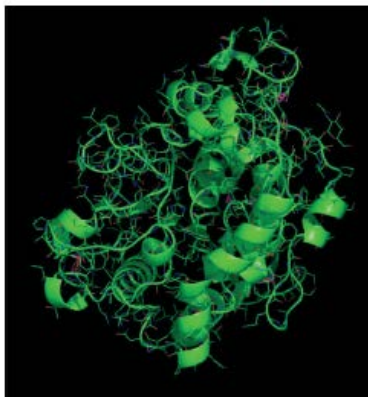


Figura 8. Estructura tridimensional de la lipasa B de *Candida antarctica*

CalB es una proteína globular que consiste de 317 aminoácidos con dimensiones aproximadas de 30 Å x 40 Å x 50 Å. La secuencia de aminoácidos no muestra una semejanza significativa con la secuencia de otras lipasas. Esta enzima pertenece a la familia de las α/β hidrolasas. Esta familia contiene esterasas, lipasas, haloperoxidasas, proteasas y algunas otras enzimas. El sitio activo se encuentra en el centro de la proteína y consiste en una tríada catalítica de Ser 105, Asp 187 y His 224, común en todas las serina hidrolasas (Figura 9) (Uppenberg *et al.*, 1995).

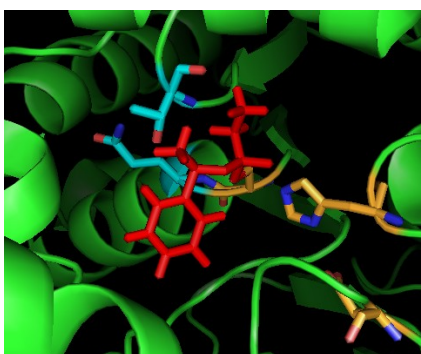


Figura 9. Estructura tridimensional del sitio activo de CalB

4.8 PURIFICACIÓN DE LAS LIPASAS

Existe una gran variedad de lipasas que han sido purificadas y caracterizadas de acuerdo a su actividad y estabilidad en función del pH, la temperatura, el efecto de los iones metálicos y los agentes quelantes. La mayoría de las aplicaciones comerciales no requieren que estas enzimas se encuentren completamente puras, ya que una purificación excesiva es muy costosa y reduce su recuperación; sin embargo, cierto grado de pureza permite mejorar su uso. Además la purificación de las enzimas permite determinar su secuencia de aminoácidos, así como su estructura tridimensional. Los estudios de lipasas puras por cristalografía de rayos X permiten establecer su relación estructura-función y contribuye a entender mejor su mecanismo de acción en hidrólisis y transesterificaciones. Por otro lado, las industrias de química fina, farmacéuticas y de cosméticos también pueden requerir lipasas puras (Saxena *et al.*, 2003). Usualmente las lipasas de interés deben ser separadas de otras esterasas y proteasas que se encuentran en la preparación cruda de la enzima (Tabla 5).

Tabla 5. Descripción del grado de pureza de algunas lipasas comerciales.

Fuente	Cantidad de proteína (%)	Actividad lipolytica ^[a] (Umg ⁻¹)	Principales bandas SDS-PAGE (kDa)	Numero de bandas principales en SDS-PAGE	Numero de bandas esterasa ^[b]	Actividad proteasa ^[c] (%)
<i>Rhizomucor miehei</i>	3.5	16	25	5	2	1
<i>Rhizopus sp.</i>	4.8	32	43, 67	10	4	3
<i>Humicola laniginosa</i>	2.9	10	20, 30	4	2	20
<i>Candida rugosa I</i>	4.2	11	20, 30, 43, 67, 90	13	2	<1
<i>Candida rugosa II</i>	6.4	14	43, 67	11	2	<1
<i>Geotrichum candidum</i>	4.3	8	67	3	0	<1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.2	30	14, 25, 40, 43	6	3	<1
<i>Cromobacterium viscosum I</i>	1.1	45	17, 30, 40	3	1	0
<i>Cromobacterium viscosum II</i>	9.5	154	17, 30, 40	2	1	12

[a] Hacia trioleina (pH 7.5, 37°C). [b] Hidrólisis en la presencia de α -naftol acetato. [c] Actividad como un porcentaje de proteinasa K sobre azoalbúmina. (Modificada de Schmid y Verger, 1998).

Los métodos que generalmente son utilizados para la purificación de proteínas dependen de técnicas no específicas como son la precipitación, ultrafiltración, cromatografía de interacción hidrofóbica, filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. En algunos casos ha sido utilizada la cromatografía de afinidad

para reducir el número de pasos individuales de purificación. Recientemente han sido aplicadas nuevas tecnologías para la purificación de lipasas. Estas incluyen procesos de filtración en membrana, inmunopurificación, sistemas acuosos de dos fases y utilización de polímeros como fase estacionaria en cromatografía en columna. Para propósitos industriales generalmente las estrategias de purificación empleadas deben ser baratas, rápidas, con altos porcentajes de recuperación y además que su operación pueda realizarse a gran escala (Gupta *et al.*, 2004).

El método cromatográfico más usado para fines industriales es la cromatografía de intercambio iónico, el cual es utilizado en 67% de los métodos de purificación revisados por Saxena *et al.*, (2003). Un 29% de estos procedimientos lo utilizan más de una vez en la misma secuencia. El segundo método de purificación más utilizado es la filtración en gel. La selección del método cromatográfico para la purificación de lipasas microbianas depende de la preparación inicial de la lipasa y de su uso en una etapa particular del esquema total de purificación. Veeraragavan y Gibbs (1989) identificaron dos lipasas producidas por *Candida rugosa* y las separaron por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (Mono Q) después de la extracción de la lipasa cruda con etanol. La lipasa I fue purificada seis veces con un 18% de recuperación y la lipasa II fue purificada dos veces con un 25% de recuperación. En otro reporte (López *et al.*, 2000) se presenta la purificación de dos isoformas de la lipasa B de *Candida rugosa* por medio de una cromatografía de intercambio aniónico sobre una columna Mono-P-HR5/5, equilibrada con un buffer histidina/HCl 25mM (pH 6.1). Pernas *et al.* (2000) realizaron la purificación de dos isoenzimas (Lip2 y Lip3) de *Candida rugosa*, para lo cual comenzaron con una precipitación con sulfato de amonio (60% de saturación) y posteriormente utilizaron una columna Sephadex G-25 (16.5 x 1.5 cm). Las fracciones colectadas con la actividad de la enzima fueron tratadas con colato de sodio y precipitadas en etanol/éter. El precipitado obtenido lo disolvieron en Tris-HCl 25mM y lo pasaron por una columna DEAE-Sephacel (10 x 1.6cm) equilibrada con buffer Tris- HCl 25 mM (pH 7.5). Para determinar el peso molecular de las dos isoenzimas por medio de una electroforesis, primero realizaron una cromatografía de filtración en gel utilizando la columna Sephacryl S-100 HR (60x1.6 cm). Esta columna fue calibrada con aprotinina (6.5 kDa), citocromo C (12.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), seroalbumina bovina (66 kDa) y dextrano azul (200 kDa).

Se sabe que las lipasas presentan grandes superficies hidrofóbicas alrededor de su sitio activo, por lo tanto su purificación también podría realizarse mediante cromatografía de interacción hidrofóbica. El uso de este tipo de cromatografía para la purificación de lipasas se ha incrementado enormemente en los últimos años (Hong y Chang 1998; Nawani y Kaur, 2000; Brush *et al.*, 1999; Mayordomo *et al.*, 2000). Un ejemplo específico, es la purificación de la lipasa producida por *Acinetobacter sp.* RAG1 (Snellman *et al.*, 2002), donde se reportó que esta lipasa tiene muy poca afinidad por las resinas de intercambio aniónico y por lo tanto otras proteínas pudieron ser removidas pasando el sobrenadante por una columna aniónica Mono Q. Posteriormente la lipasa fue unida a una columna de butil sefarosa y eluida con un gradiente de Triton X-100 obteniendo un 22% de recuperación con un factor de purificación superior a 10.

En lo que respecta a la purificación de las lipasas de *Candida antarctica*, es muy poca la información disponible. Patkar *et al.* (1993) reportaron la purificación de las dos lipasas de *Candida antarctica* y su inhibición por dietil p-nitrofenilfosfato y esteretil n-hexilclorofosfato. Para ello utilizaron precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio aniónico, seguida por cromatografía de interacción hidrofóbica, pero no mencionan los volúmenes en los que realizaron la purificación ni los rendimientos que obtuvieron. Dicho estudio estuvo enfocado principalmente a la caracterización de las dos lipasas en cuanto a su peso molecular, punto isoeléctrico, secuencia de aminoácidos y a su estabilidad en temperatura y pH.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales y reactivos

Microorganismo

Todos los experimentos se llevaron a cabo con la cepa de *Pseudozyma antarctica* (*Candida antarctica*) **NBRC 10260**, la cual se obtuvo de una colección del Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación de la ciudad de Chiba, Japón.

Medios de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo YM (Yeast and Mould Broth; marca Difco™, Detroit, USA). Su fórmula por litro se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Formulación por litro del medio de cultivo YM.

Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de malta	3.0 g
Peptona	5.0 g
Dextrosa	10.0 g
Se suspenden 21g en un litro de agua	
pH final: 6.2± 0.2	

Para estudiar el efecto de una concentración menor de glucosa y el efecto de algunos sustratos lipídicos como única fuente de carbono, se llevó a cabo la formulación del medio de cultivo, utilizando los componentes descritos en la Tabla 7.

Tabla 7. Formulación por litro del medio de cultivo YM, con diferentes concentraciones de glucosa.

Componente	Cantidad	Marca
Extracto de levadura	3.0 g/l	OXOID, México.
Extracto de malta	3.0 g/l	OXOID, México
Peptona	5.0 g/l	OXOID, México
Glucosa	0.3 % y 2%	Sigma, USA.

Los sustratos lipídicos empleados se enlistan en la Tabla 8.

Tabla 8. Sustratos lipídicos empleados.

Sustrato lipídico	MARCA
Ácido oleico	Sigma, al 99%, USA.
Ácido palmítico	Sigma, al 99%, USA.
Aceite de oliva	Sigma, al 99%, USA.
Aceite de soya	Sigma, al 99%, USA.

Conservación de la cepa

- Chaquiras de vidrio
- Glicerol ; marca J.T. Baker, al 99.8%, México.
- Medio de cultivo YM; marca Difco™, Detroit, USA

Fermentaciones a nivel matraz y fermentador

- Matraces Erlenmeyer de 125, 500 y 1000 ml
- Tween 80; marca SIGMA, USA.
- Antiespumante A emulsión; marca SIGMA, USA.
- Tritón X-100; marca SIGMA, USA

Análisis de cinéticas de fermentación

Determinación de Biomasa

- Agua destilada y desionizada (Obtenida mediante equipo Millipore).
- Acetona; marca J.T. Baker; grado reactivo analítico, al 99.7%, México.
- Filtros de membranas de 0.45 µm; marca Millipore.

Determinación de Proteína

- Reactivo de Bradford; marca. Bio-Rad, USA.
- Agua destilada desionizada (obtenida mediante equipo Millipore).
- Papel filtro; marca Whatman #1.

Determinación de azúcar

- Ácido sulfúrico; marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.2%, México.
- Fenol, marca SIGMA-ALDRICH, al 99.5%, USA.

Determinación de actividad lipolítica mediante transesterificación

- Acetato de etilo; marca Aldrich, grado reactivo analítico, al 99+%, USA.
- Acetato de butilo; Productos Químico Monterrey, grado reactivo analítico, 98%.
- 1-Butanol; marca Sigma-Aldrich, grado reactivo analítico, al 99.9%, USA.
- Hexano; marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.9% y grado HPLC, al 99.99%, México.
- Matrices Erlenmeyer con tapón rosca de 50 mL.

Determinación de actividad lipolítica mediante hidrólisis

- p-Nitrofenil laurato; marca Fluka, grado reactivo analítico, >98.0%, USA.
- Etanol; marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.9%, México.
- Carbonato de sodio; marca J.T. Baker, al 100.2%, México.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.

Elaboración de Buffer Tris-HCl

- Agua destilada desionizada (obtenida mediante equipo Millipore).
- Base trizma; marca SIGMA, al 99.9%, USA.
- Ácido clorhídrico; marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 36.7%, México.

Purificación

- Columna de intercambio iónico (20cm X 2.5cm) con resina Toyopearl QAE 550C; distribuida por SUPELCO de SIGMA-ALDRICH, México. Con tamaño de poro de 50-150 μm , capacidad de intercambio iónico de 0.28 a 0.38 meq/mL, límite de exclusión de 5×10^5 Da, presión máxima de 0.15 bar.
- Cloruro de sodio, marca J.T. Baker, al 99.9%, Méx.
- Buffer Tris-HCl.
- Bolsas de diálisis
- Columna de interacción hidrofóbica (10 X 2.5cm) con resina Fenil Sefarosa CL4B; marca SUPELCO de SIGMA Aldrich, México.
- Columna de intercambio catiónico (8cm x 2.5cm) con resina CM-Sefarosa Fast Flow distribuida por SIGMA-ALDRICH, México. Con tamaño de poro de 45-165 μm (húmeda), capacidad de intercambio iónico de 90-130 meq/mL, límite de exclusión de 4×10^6 Da.

- Columna de filtración en gel (100cm X 1cm) con resina Sephacryl 200 HR; marca SIGMA, USA. Con tamaño de poro de 25-75 μm (húmeda), rango de fraccionamiento de 1,000 a 80,000 Da y de 5,000 a 250,000 Da.

Determinación de pureza

- Geles de poliacrilamida al 10% con:
 - Buffer (Tris-HCl 1.5 mM, pH 8.8)
 - Acrilamida (marca J.T. Baker, México)
 - SDS (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
 - Persulfato de amonio (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
 - TEMED (marca BIO-RAD, USA)
- Azul de comassie R-250; marca SIGMA-ALDRICH, USA.
- Buffer de tratamiento con:
 - 0.125 M de Tris-HCl (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
 - 4% de SDS (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
 - 20% de glicerol (marca J.T. Baker, al 99.8%, México)
 - 10% de β -mercaptoetanol (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
 - 0.01% de azul de bromofenol (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
- Buffer de corrida con:
 - 0.025 M de Tris-HCl
 - 0.192 M de Glicina (marca GenaAR, Japón)
 - 0.1% de SDS (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
- Solución desteñidora con:
 - 7% de ácido acético (marca REASOL, al 99.7%, México)
 - 5% de metanol (marca J.T. Baker, al 99.9%, México)
- Marcadores de peso molecular de amplio y bajo rango; marca BIO-RAD, USA.
- α -Naftol acetato; marca SIGMA, USA.
- Fast Red TR; marca SIGMA, USA.
- Isoelectroenfoque
 - Geles de poliacrilamida
 - Ácido tricloroacético (marca J.T. Baker, al 99.9%, México)
 - Metanol (marca J.T. Baker, al 99.9%, México)
 - Ácido acético (marca REASOL, al 99.7%, México)
 - Fast Gel Blue R (marca SIGMA-ALDRICH, USA)
 - CuSO₄ (marca SIGMA-ALDRICH, USA)

5.2 Equipos

- **Campana flujo laminar**; marca VECO, Morelos, México.
- **Autoclave**; marca Amerex Instruments, Inc., modelo HA- 300MII, Japón.
- **Congelador REVCO**; marca Legaci, modelo ULT390, USA.



- **Fermentador**; marca New Brunswick Scientific CO., Inc., modelo BIOFLO III, de 5L, New Jersey, USA. Con control de pH, oxígeno disuelto, agitación, temperatura, alimentación de nutrientes y espuma. En el **anexo I** se describen más detalladamente sus características y como se llevó a cabo su operación.
- **Cromatógrafo de gases**; marca Hewlett-Packard, modelo 5890, USA. Equipado con un detector de ionización de flama (DIF) y una columna HP-20M (C 20M) con 25 m x 0.32 mm x 0.3 µm de espesor de película. Con los siguientes gases: aire (libre de hidrocarburos), hidrógeno y nitrógeno (ultra alta pureza); marca PRAXAIR, México D.F.
- **Microscopio de campo claro**; marca OLYMPUS OPTICAL, modelo BX40, USA.
- **Liofilizadora**; marca Heto, modelo FD 1.0, USA.
- **Agitador orbital**; marca Thermolyne, modelo Aros 160, USA.
- **Balanza analítica**; marca OHAUS, modelo AP2105, USA.
- **Espectrofotómetro**; marca PERKIN ELMER UV/VIS, modelo Lambda 2S, USA.
- **Centrífuga**; marca Eppendorf Centrifuge, modelo 5415 C, USA.
- **Centrífuga**; marca International Equipment Company, modelo Clinical, USA.
- **Centrífuga**; marca BECKMAN, modelo J2-M21, USA.
- **Potenciómetro**; marca BECKMAN, modelo Φ41 pH meter, USA.
- **Equipo electroforesis**; marca Bio-Rad, USA.
- **Equipo Fast System**; marca Pharmacia, modelo LKB Biotechnology.
- **Equipo filtración**; marca Millipore, México.
- **Equipo de ultrafiltración**; marca Millipore, México.

5.3 Metodología

Para realizar los estudios de purificación de las lipasas A y B de *Candida antarctica* primero fue necesario establecer las condiciones a las cuales se obtienen los mejores rendimientos de las mismas. Para ello se estudió el efecto de diferentes inductores, de la velocidad de agitación y del oxígeno disuelto. La Figura 10 muestra un diagrama de bloques que esquematiza de manera general las principales etapas de la experimentación.

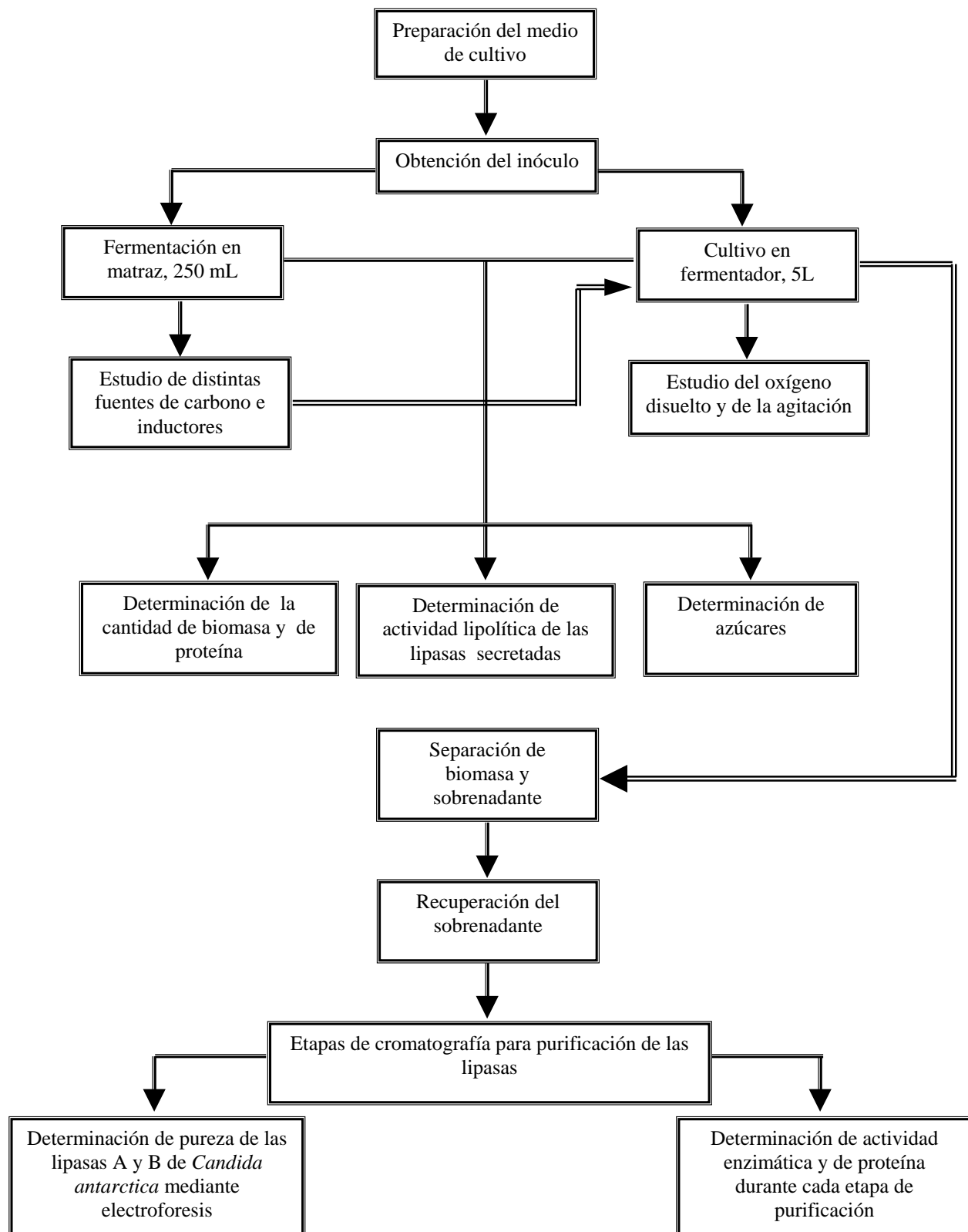


Figura 10. Diagrama general del procedimiento experimental.

5.3.1 Estandarización del inóculo inicial de *Candida antarctica*

La preparación del inóculo se hizo a partir de la cepa *Pseudozyma antarctica* conservada por ultracongelación a $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ en chaquiras preparadas en caldo YM con glicerol al 11% (v/v) como crioprotector.

Se realizó una primera resiembra en 40 mL de caldo YM y se dejó incubar a 30°C y 165 rpm durante 48 h. Posteriormente, se realizó una segunda resiembra en 360 mL de caldo YM bajo las mismas condiciones de incubación. Este inóculo se utilizó para la producción de las lipasas en el fermentador de 5 L, utilizando un volumen final de 4 L (Figura 11). Éste inóculo también se utilizó para realizar las curvas de crecimiento en matraz (en todos los casos el inóculo fue de un 10% del volumen final).

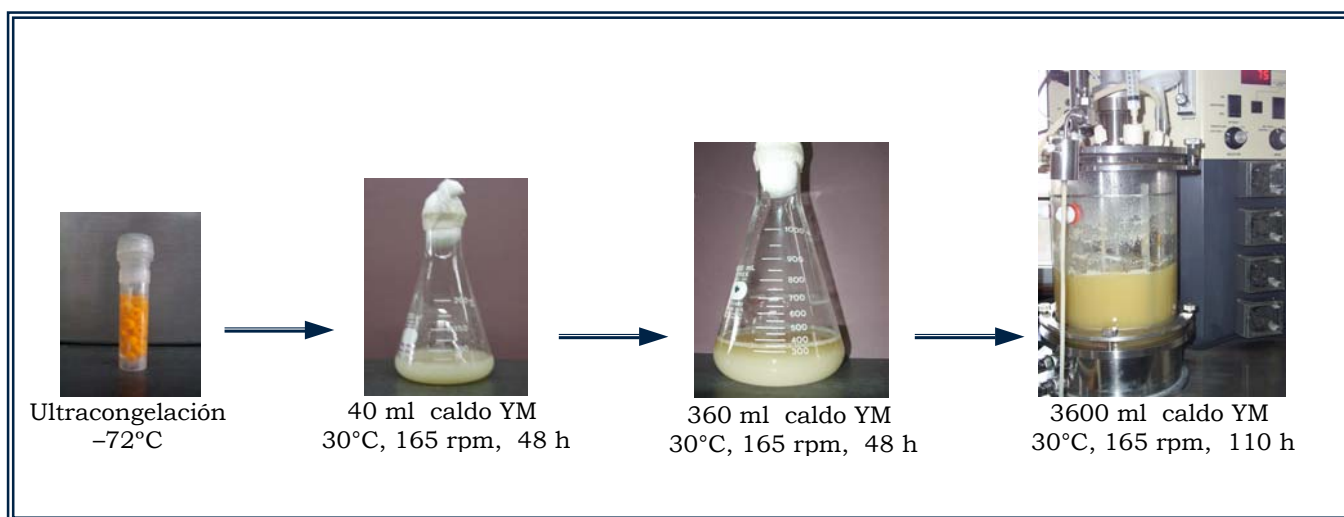


Figura 11. Etapas involucradas en la preparación del inóculo de *Candida antarctica* para las fermentaciones a nivel matraz y a nivel fermentador.

5.3.2 Cultivo de *Candida antarctica* a nivel matraz

(a) Determinación de la curva de crecimiento y actividad lipolítica a nivel matraz

Las fermentaciones de *Candida antarctica* a nivel matraz se llevaron a cabo utilizando matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de medio YM y 10% de inóculo del microorganismo. Los matraces se incubaron a 30 °C y 165 rpm durante 110 h. Se tomaron muestras cada 24 h y se determinó la producción de biomasa, la actividad lipolítica, la concentración de proteína y los azúcares consumidos.

(b) Efecto de diferentes inductores sobre la producción de las lipasas a nivel matraz

Para evaluar el efecto de distintos inductores sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica*, se utilizaron matraces de 500 mL con 250 mL de caldo YM. Se utilizaron diferentes concentraciones de glucosa y diferentes concentraciones de sustratos lipídicos que pudieran funcionar como inductores para la producción de las lipasas (aceite de oliva, aceite de soya, ácido oleico y ácido palmítico). A estos matraces también se les adicionó 0.1% de tween 80, para mejorar la emulsificación de los sustratos lipídicos en el medio de cultivo. En la Tabla 9 se muestran las concentraciones y combinaciones de las fuentes de carbono estudiadas. Se utilizó 10% de inóculo y los matraces se dejaron incubar durante 96 h a 30°C y 165 rpm. Posteriormente se determinó la producción de biomasa, la concentración de proteína y la actividad de las lipasas, mediante dos reacciones diferentes, una mediante la hidrólisis de pNP-laurato y otra vía transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol, tanto en el medio de cultivo completo (con células) como en el sobrenadante.

Es importante mencionar el criterio de selección de estos sustratos lipídicos. Se buscó que los ácidos grasos fueran de cadena larga, ya que generalmente se ha reportado que las lipasas tienen preferencia por este tipo de lípidos. Además se buscó que variaran en el número de insaturaciones; el ácido palmítico (16:0) no presenta

insaturaciones y el ácido oleico (18:1n-9) presenta una insaturación. En el caso de los aceites, se buscó que los ácidos grasos se encontraran en forma de triglicéridos; el aceite de oliva contiene 79% de ácido oleico y el aceite de soya 54% de ácido linoleico (18:2n-6).

Tabla 9. Concentración de glucosa e inductores estudiados

Medio Cultivo	% Glucosa	% Sustrato lipídico
YM	2%	Cero (no se agregó)
YM	1%	Cero (no se agregó)
YM	1%	0.5% aceite de oliva
YM	1%	0.5% ácido oleico
YM	1%	0.5% ácido palmítico
YM	1%	0.5% aceite de soya
YM	0.3%	Cero (no se agregó)
YM	0.3%	1.0% aceite de oliva
YM	0.3%	1.0% ácido oleico
YM	0.3%	1.0% ácido palmítico
YM	0.3%	1.0% aceite de soya
YM	0%	2.0% aceite de oliva
YM	0%	2.0% ácido oleico
YM	0%	2.0% ácido palmítico
YM	0%	2.0% aceite de soya

5.3.3 Producción de las lipasas de *Candida antarctica* en el fermentador de 5L

(a) Cultivo de *Candida antarctica* a nivel fermentador

Para estudiar la producción de las lipasas de *Candida antarctica* a nivel fermentador, se transfirieron 400 mL del inóculo (10%) a 3600 mL de medio YM con 1% de glucosa previamente esterilizado dentro del fermentador. La primera fermentación se mantuvo a 30°C y 75 rpm, con un flujo de aire de 1.08 vvm (5.4 L/min) durante 96 h. Se tomaron muestras a intervalos de 12 h para determinar la producción de biomasa, la actividad lipolítica, la concentración de proteína y los azúcares consumidos (Figura 12).

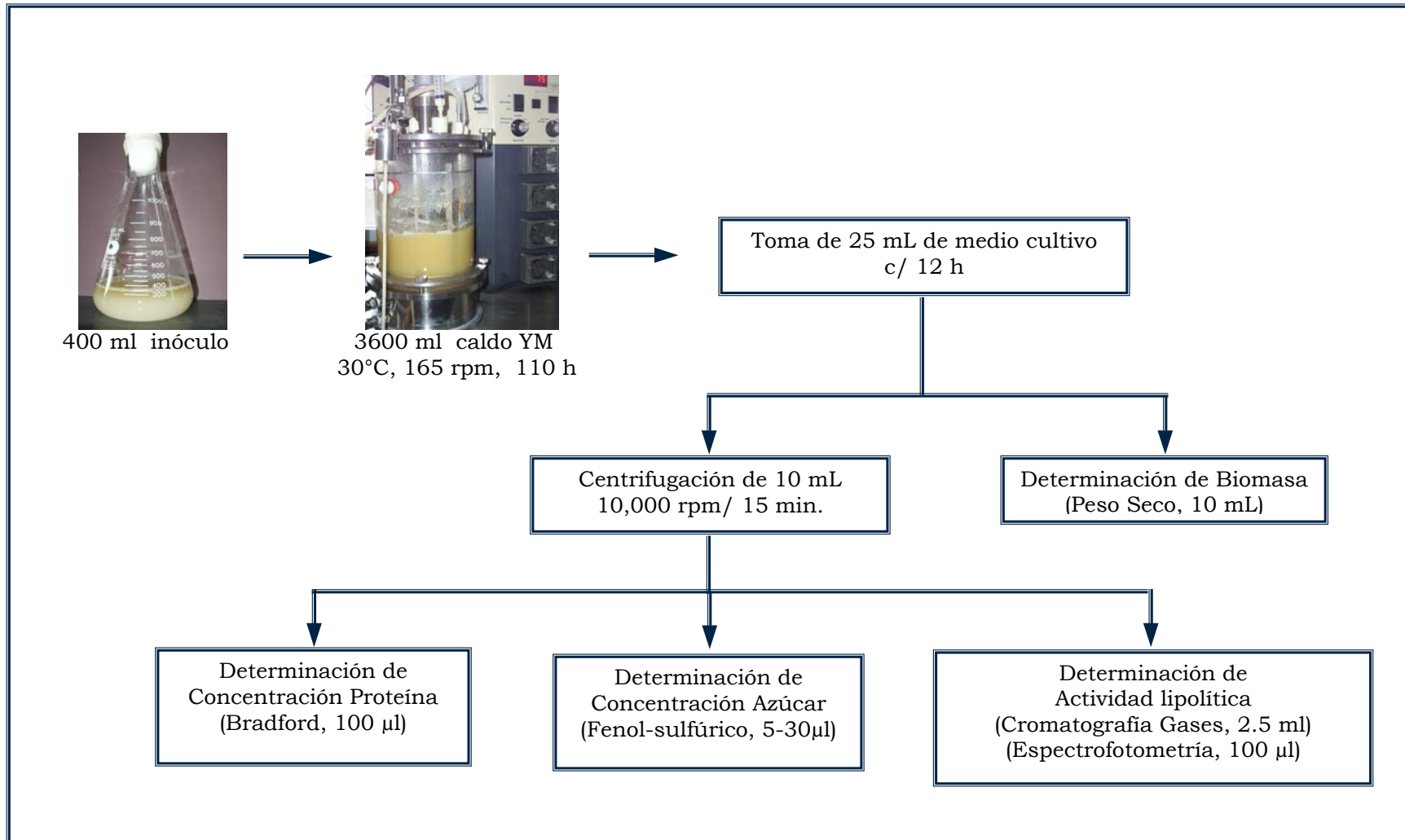


Figura 11. Diagrama del análisis de experimentos en fermentador.

b) Efecto de la agitación y del oxígeno disuelto sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica*.

Se estudiaron cuatro velocidades de agitación (75, 300, 500 y 600 rpm) y tres niveles de saturación de oxígeno disuelto (0, 20 y 40%). En todas las fermentaciones se mantuvo constante el flujo de aire a 1.08 vvm, el cual corresponde al valor máximo de operación en el fermentador empleado en este estudio (en el **anexo I** se detalla el manejo del fermentador). Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado.

Cuando la agitación se mantuvo constante, se monitoreó el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto durante el transcurso de toda la fermentación para conocer la cantidad de oxígeno disponible para el crecimiento de la levadura.

La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo constante mediante cambios automatizados en la velocidad de agitación, los cuales se monitorearon durante el transcurso del proceso de fermentación. En todas las fermentaciones se tomaron muestras cada 12 horas para determinar la producción de biomasa, la actividad lipolítica, la concentración de proteína y los azúcares consumidos. También se realizaron observaciones con un microscopio óptico para verificar si las células presentaban algún daño o cambio en su morfología, en función del tiempo de fermentación y de las condiciones de operación.

5.3.4 Análisis de las cinéticas de fermentación

Determinación de Biomasa (Peso seco)

Se filtraron (en membranas con un tamaño de poro de 0.45 μ m) 10 mL del medio de cultivo. Las células fueron lavadas 3 veces con agua destilada y 3 veces con acetona. Posteriormente se secaron en estufa a 60°C durante 18 h y la masa celular fue expresada como peso seco.

Determinación de Proteína

La determinación de proteína soluble se realizó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Se midió la absorbancia a 595 nm (en el **anexo IIa** se presenta la curva patrón obtenida). La concentración de proteína se calculó mediante la ecuación 1, donde *Abs* es la absorbancia a 595 nm y *fd* es el factor de dilución.

$$[\text{Proteína}] = \left(\frac{(Abs)_{595\text{ nm}} - 0.0245}{0.9215} \right) \cdot (fd) \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Determinación de Azúcar

La determinación de azúcares se realizó mediante el método de fenol-sulfúrico. Se preparó una solución de fenol al 5% en agua y se utilizó ácido sulfúrico concentrado. Se midió la absorbancia a 490 nm (en el **anexo IIb** se presenta la curva patrón obtenida). La concentración de azúcar fue calculada a partir de la ecuación 2, donde *Abs* es la absorbancia a 480 nm y *fd* es el factor de dilución.

$$[\text{Azúcar}] = \left(\frac{(Abs)_{480\text{ nm}} - 0.0283}{0.0105} \right) \cdot (fd) \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

Determinación de actividad enzimática

(a) Transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol.

La reacción se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 25 mL con tapón de rosca. La mezcla de reacción se preparó con una solución 866 mM de acetato de vinilo y 524 mM de 1-Butanol en hexano. A cada matraz se le adicionaron 7.5 mL de esta solución y 2.5 ml del extracto crudo de la enzima. Los matraces se incubaron en un



baño de agua a 45 °C y 210 rpm, durante 24 h. Posteriormente, las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases. La columna se mantuvo a 35 °C por tres minutos, y posteriormente se llevó a 85 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron mantenidas a 110 °C y 140 °C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como fase móvil a un flujo de 27.3 mL/min. Se inyectó 1 µl de cada una de las muestras. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

La cuantificación de las muestras inyectadas al cromatógrafo se llevó a cabo mediante una curva patrón de acetato de butilo (**anexo IIc**) y la actividad enzimática se definió como se describe en la ecuación 3.

$$Actividad = \frac{\mu\text{moles acetato de butilo formado}}{\text{min} \cdot \text{mL}} = \frac{U}{\text{mL}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

Hidrólisis de pNP-Laurato

La reacción se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a los cuales se les adicionaron 800 µl de buffer Tris-HCl 250 mM (pH 7), 0.1 M de pNP-Laurato disuelto en etanol y 100 µl del extracto crudo de la enzima. La hidrólisis se realizó durante 3 min a 30 °C y se detuvo por adición de 250 µl de Na₂CO₃ 0.1 M. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 420 nm. La actividad de la lipasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 µg de p-nitrofenol (con una absortividad molar de ϵ_{420} 1.336 x 10⁷ cm²/mol) a partir de p- nitrofenilaurato después de 3 min de reacción, bajo las condiciones de ensayo estandarizadas (Nawani y Kaur, 2000). Los análisis se realizaron por triplicado.

5.3.5 Actividad lipolítica en las células

Las lipasas de *Candida antarctica* son secretadas al medio de cultivo; sin embargo, se encontró (datos no mostrados) que una cantidad considerable se queda asociada a las células. Debido a esto se decidió cuantificar la actividad lipolítica retenida en el micelio mediante su extracción con diferentes soluciones. Para este estudio se utilizaron 3 muestras de 30 mL de medio de cultivo con 96 h de incubación, las cuales se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min para separar el sobrenadante de la biomasa. Las células obtenidas de la muestra 1 se aforaron a 30 mL con agua destilada, las células obtenidas de la muestra 2 se aforaron a 30 mL con una solución de NaCl 1M y las células obtenidas de la muestra 3 se aforaron a 30 mL con una solución de acetonitrilo al 30%. Cada una de las muestras se mezcló en un vórtex y se dejó en agitación durante 4 h a 200 rpm y 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min. Se recuperó por separado el pellet celular y el sobrenadante de cada una de las muestras. El pellet de células de cada una de las muestras se mezcló con 30 mL de buffer Tris-HCl (pH 7.2, 5 mM) para determinar la actividad lipolítica asociada a las células. También se determinó la actividad lipolítica liberada a cada uno de los tres sobrenadantes.

5.3.6 Purificación de CALB

Secuencia de purificación

Para la purificación de las lipasas se utilizó el medio de cultivo obtenido de una fermentación con 72 h de incubación en medio YM a 30°C y con OD controlado a un 40%. En la figura 13 se esquematiza la secuencia de purificación estudiada, posteriormente se describen cada uno de los pasos utilizados.

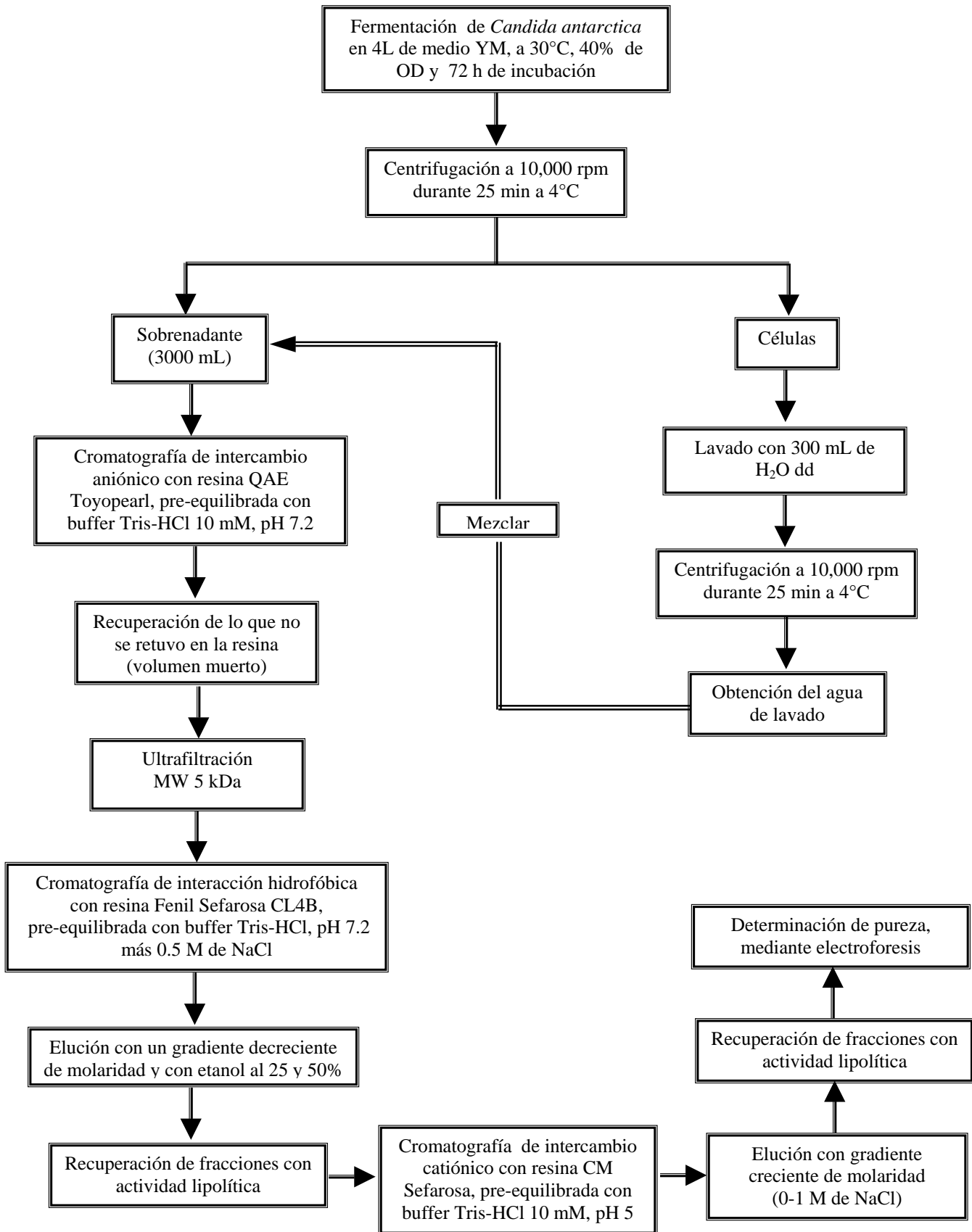


Figura 13. Esquema de la metodología de purificación para las lipasas de *Candida antarctica*

Primero se recuperó el extracto crudo de las lipasas. El medio de cultivo (3100 mL) se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C. Las células obtenidas se homogenizaron y se lavaron con 300 mL de agua destilada desionizada, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 25 min a 4°C, para recuperar el agua de lavado.

El agua de lavado de las células (300 mL) se agregó al sobrenadante (2700 mL) de la fermentación, y así se obtuvo el extracto crudo de las lipasas. Esta muestra se sometió a una etapa de cromatografía de intercambio aniónico (QAE Toyopearl); la columna fue pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.2). Las lipasas no presentaron afinidad por esta columna, pero otras proteínas pudieron unirse fuertemente, por lo que este paso cromatográfico fue útil para la eliminación de otras proteínas (adsorción negativa). Todos los análisis cromatográficos fueron realizados con columnas en las que el eluyente fluía por gravedad.

Después de recuperar la muestra que no se retuvo en la resina QAE Toyopearl (2900 mL), ésta se concentró a 560 mL mediante ultrafiltración (YM 5, con un tamaño de corte de 5 kDa). La solución concentrada se pasó por una columna de interacción hidrofóbica (50 mL) pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8.0) más 0.5 M de NaCl. Después de pasar la muestra, la columna se eluyó con diferentes soluciones. Primero se utilizaron 100 mL de buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8.0) con 0.5 M de NaCl, después 100 mL del mismo buffer pero con 0.25 M de NaCl y 100 mL del mismo buffer pero sin NaCl. Posteriormente se utilizaron 100 mL de etanol al 25% y para finalizar 150 mL de etanol al 50% en el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 5 mL y se les monitoreó la absorbancia a 280 nm y la actividad lipolítica mediante la reacción de hidrólisis del p-nitrofenil laurato. Posteriormente, se juntaron las fracciones con actividad lipolítica y se les determinó su pureza mediante electroforesis.

La muestra obtenida fue dializada con buffer Tris-HCl 10 mM (pH 5.0) y se sometió a una última etapa cromatográfica con una resina de intercambio catiónico (CM Sefarosa); la columna fue pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM (pH 5.0). Después de pasar la muestra, la columna se eluyó con un gradiente creciente de NaCl (de 0 a 1 M). Se colectaron fracciones de 5 mL a las que se les monitoreó la

absorbancia a 280 nm y la actividad lipolítica mediante la reacción de hidrólisis del p-nitrofenil laurato. Posteriormente, se juntaron las fracciones con actividad lipolítica y se les determinó su pureza mediante electroforesis.

5.3.7 Determinación de pureza mediante electroforesis

Se aplicó la técnica de electroforesis SDS-PAGE para verificar la pureza de las distintas muestras colectadas en cada etapa de purificación. Las muestras fueron preparadas en buffer (Tris-HCl 5 mM, pH 8.0) y diluidas 1:1 con el buffer de tratamiento. Se corrieron geles de poliacrilamida al 10% a 80 V y 400 mA durante 180 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular de amplio y bajo rango, que incluyen a la miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116.5 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), seroalbúmina (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa) y aprotinina (6.5 kDa). Las proteínas se tiñeron con azul de comassie R-250.

5.3.8 Preparación de zimogramas

Mediante la elaboración de zimogramas se pudo detectar la actividad lipolítica *in situ*. Se realizaron electroforesis desnaturalizantes y nativas. Para la electroforesis nativa, se corrieron geles de poliacrilamida al 10% a las mismas condiciones que para la electroforesis SDS-PAGE. La detección de la actividad lipolítica *in situ* se llevó a cabo con acetato de α -naftol. Los geles nativos fueron equilibrados en buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8) antes de exponerlos al substrato. Posteriormente se incubaron durante 10 min en 25 mL de la solución A (20 mg de acetato de α -naftol se disuelven en 5 mL de acetona y posteriormente se aforaron a 25 mL con Buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8)). Después de este tiempo se adicionaron 25 ml de la solución B (25 mg de Fasta red y 0.1% de Tritón X-100 aforados a 25 ml con Buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8)) hasta observar el desarrollo de una coloración café.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Crecimiento y producción de las lipasas a nivel matraz

Con la finalidad de determinar el tiempo de incubación al cual se obtiene el mayor crecimiento y la mayor actividad lipolítica, se determinaron las condiciones de crecimiento de la levadura a nivel matraz (Figura 14). Los resultados muestran que la fase estacionaria de crecimiento se alcanzó a las 72 h de incubación, lo que concuerda con el consumo de azúcares del medio de cultivo. La actividad lipolítica estuvo directamente relacionada con la proteína que se secretó al medio de cultivo y con la biomasa producida hasta la fase estacionaria. Las tres curvas presentaron una tendencia muy similar. La máxima actividad lipolítica se obtuvo después de 110 h de incubación alcanzando 0.0203 U/mL de sobrenadante y la máxima actividad específica se obtuvo a las 72 h (0.203 U/mg). Esta actividad fue analizada mediante la reacción de transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol. De esta manera quedó demostrada la capacidad de la cepa empleada para producir actividad lipolítica.

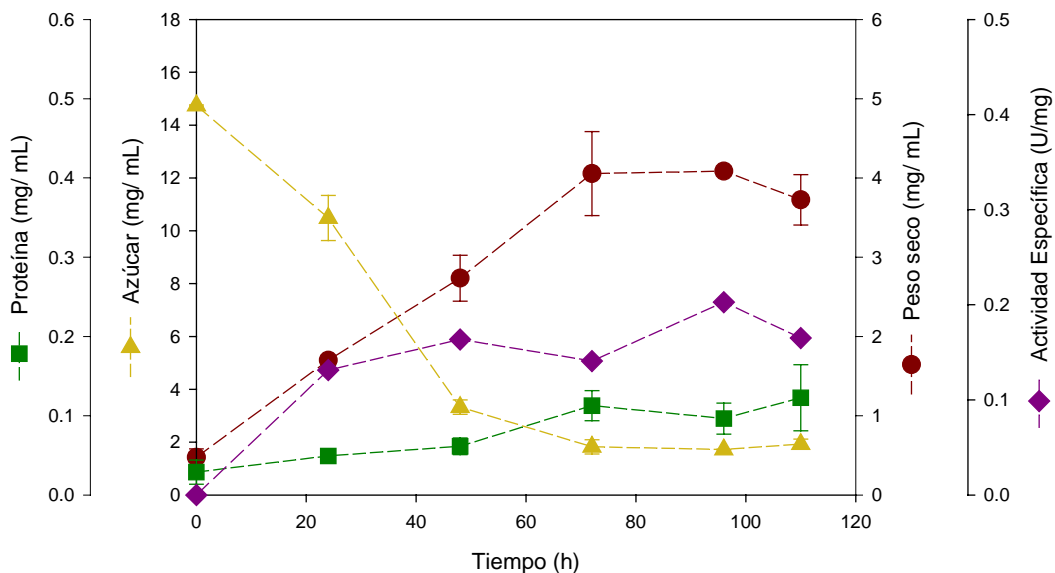


Figura 14. Crecimiento y producción de las lipasas a nivel matraz de 500 ml con 250 ml de medio YM a 165 rpm y 30°C, durante 110 h.

6.2 Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* a nivel matraz.

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* se usaron medios de cultivo con glucosa y con distintos sustratos lipídicos a diferentes concentraciones (Tabla 10). La actividad lipolítica se determinó mediante dos reacciones diferentes, transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol (método cromatográfico) e hidrólisis de p-nitrofenil laurato (método espectrofotométrico). Generalmente para la determinación de la actividad de las lipasas se utilizan reacciones de hidrólisis, pero en este caso no es únicamente específica para las lipasas, ya que también se puede detectar la actividad hidrolítica de esterases que pudiera secretar la levadura. Debido a esto se decidió utilizar un método más específico para detectar la actividad lipolítica, como es la reacción de transesterificación.

Los resultados obtenidos demuestran que la síntesis y secreción de las lipasas de *Candida antarctica* están reguladas por la naturaleza de los sustratos en el medio de cultivo. La levadura creció con los sustratos lipídicos y la mayoría de éstos permitieron mejorar la cantidad de biomasa producida. Sin embargo, la cantidad de lipasa secretada fue considerablemente menor respecto al uso de glucosa como única fuente de carbono. Por otro lado, con algunos inductores se aumentó la concentración de proteína, pero ésta no se correlacionó con un aumento de la actividad lipolítica. Cuando se determinó la actividad lipolítica mediante la hidrólisis del p-nitrofenil laurato se detectó un incremento en la actividad para algunos sustratos lipídicos, principalmente cuando se utilizaron como única fuente de carbono, pero no superaron a lo obtenido con glucosa al 2% (Medio 11 en la tabla 10).

Los mejores resultados para la producción de las lipasas se obtuvieron al utilizar glucosa como única fuente de carbono (Medio 1 y 11 en la tabla 10). De las tres concentraciones de glucosa estudiadas (0.3, 1.0 y 2.0%), se encontró que al aumentar su concentración de 1 a 2% se tiene un incremento considerable en la biomasa y en la actividad lipolítica. No se observó un efecto inductor de los sustratos lipídicos, por lo que estos resultados no concuerdan con lo esperado, ya que en otros estudios

generalmente se ha reportado que una fuente de carbono lipídica permite una mejor inducción de las lipasas, en particular para el género *Candida* (Domínguez *et al.*, 2006; Sailas y Pandey, 1997; Gordillo *et al.*, 1998). En el estudio reportado por Lotti *et al.* (1998), se menciona que la síntesis de enzimas inducibles es inhibida a nivel de transcripción por la adición de glucosa al medio de cultivo y que una fuente de carbono lipídica impide la síntesis de enzimas constitutivas. También se ha reportado que una mezcla de dos fuentes de carbono podría disminuir la producción de las lipasas. Nahas (1988) reportó que la actividad de la lipasa de *Rhizopus oligosporus* fue más baja al utilizar aceite de oliva en un medio que contenía 1% de glucosa o lactosa. Por otro lado, también se ha reportado que algunos microorganismos muestran una alta actividad para sus lipasas cuando el medio de cultivo contiene glucosa como única fuente de carbono y lo relacionan con una secreción constitutiva (Gupta *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2006). Hoegh *et al.* (1995) utilizaron el medio de cultivo YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) para llevar a cabo la clonación y expresión de los genes de las lipasas de *Candida antarctica* en *Aspergillus oryzae*, siendo ésta la única referencia disponible que describe un medio de cultivo utilizado para el crecimiento de esta levadura.

En la figura 15 se representó gráficamente el rendimiento $Y_{P/X}$ y la actividad específica para cada uno de los medios de cultivo estudiados y así llevar a cabo una comparación más clara de los resultados de la Tabla 10. Para ambas reacciones se observó una mayor actividad específica y rendimiento al utilizar glucosa como única fuente de carbono. Comparando las dos reacciones, la actividad específica mostró una tendencia muy similar en algunos medios de cultivo, principalmente cuando se utilizó un sustrato lipídico como única fuente de carbono (Figura 15, medio 12-15). Sin embargo, la tendencia fue diferente cuando se utilizó una mezcla de glucosa y algún lípido (Figura 15, medio 6-10), en algunos casos la actividad en la reacción de hidrólisis fue mayor, con respecto a la de transesterificación, lo cual indica una posible contribución catalítica de otras esterasas secretadas al medio de cultivo sobre la reacción de hidrólisis, y por otro lado una posible inducción de los sustratos lipídicos para la secreción de este tipo de enzimas. Sin embargo, aún no está bien entendida la manera en que estos componentes influyen la biosíntesis de las lipasas y de algunas otras esterasas.

Tabla 10. Efecto de la composición de la fuente de carbono e inductores sobre la actividad lipolítica a las 96 h de fermentación

M E D I O	FUENTE DE CARBONO E INDUCTOR	BIOMASA (mg/mL)	PROTEÍNA (mg/ mL)	ACTIVIDAD TRANSESTERIFICACIÓN (U/mL)		ACTIVIDAD HIDRÓLISIS (U/mL)	
				Sobrenadante	Medio completo	Sobrenadante	Medio completo
1	YM (1% glucosa)	4.96 ± 0.24	0.199 ± 0.027	0.021 ± 0.008	0.031 ± 0.001	0.0515 ± 0.008	0.0505 ± 0.0008
2	+ 0.5% aceite de oliva	7.09 ± 0.87	0.278 ± 0.036	0.008 ± 0.003	0.017 ± 0.005	0.0555 ± 0.031	0.0872 ± 0.031
3	+ 0.5% ácido oleico	6.71 ± 0.14	0.110 ± 0.021	0.007 ± 0.002	0.033 ± 0.007	0.0829 ± 0.025	0.0694 ± 0.014
4	+ 0.5% ácido palmítico	7.26 ± 1.61	0.278 ± 0.028	0.009 ± 0.005	0.019 ± 0.001	0.1916 ± 0.016	0.2397 ± 0.124
5	+ 0.5% aceite de soya	6.61 ± 0.83	0.279 ± 0.066	0.009 ± 0.004	0.017 ± 0.007	0.0554 ± 0.020	0.0628 ± 0.015
6	YM (0.3% glucosa)	2.52 ± 0.21	0.093 ± 0.064	0.007 ± 0.002	0.011 ± 0.002	0.0101 ± 0.003	0.0285 ± 0.0081
7	+ 1.0% aceite de oliva	7.83 ± 1.63	0.635 ± 0.048	0.008 ± 0.005	0.008 ± 0.004	0.0831 ± 0.013	0.0696 ± 0.022
8	+ 1.0% ácido oleico	6.32 ± 0.59	0.474 ± 0.233	0.005 ± 0.003	0.009 ± 0.0003	0.0721 ± 0.006	0.1011 ± 0.062
9	+ 1.0% ácido palmítico	5.82 ± 2.17	0.214 ± 0.037	0.013 ± 0.003	0.026 ± 0.005	0.1372 ± 0.010	0.1419 ± 0.043
10	+ 1.0% aceite de soya	7.86 ± 0.47	0.518 ± 0.087	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.002	0.0286 ± 0.003	0.0519 ± 0.002
11	YM (2% glucosa)	6.27 ± 0.92	0.204 ± 0.056	0.025 ± 0.095	0.068 ± 0.019	0.3480 ± 0.061	0.3615 ± 0.056
12	2.0% aceite de oliva	10.79 ± 3.40	0.691 ± 0.590	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.0003	0.0781 ± 0.033	0.0914 ± 0.029
13	2.0% ácido oleico	8.85 ± 2.45	0.893 ± 0.104	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.003	0.0823 ± 0.026	0.0802 ± 0.016
14	2.0% ácido palmítico	4.30 ± 0.77	0.162 ± 0.007	0.003 ± 0.0006	0.022 ± 0.0005	0.1072 ± 0.001	0.0998 ± 0.042
15	2.0% aceite de soya	2.83 ± 0.07	0.776 ± 0.221	0.005 ± 0.0008	0.006 ± 0.0001	0.1006 ± 0.044	0.1155 ± 0.043

* Crecimiento a nivel matraz de 250 ml con 100 ml de medio cultivo a 165 rpm y 30°C durante 96 h. Promedio y desviación estándar de 3 repeticiones



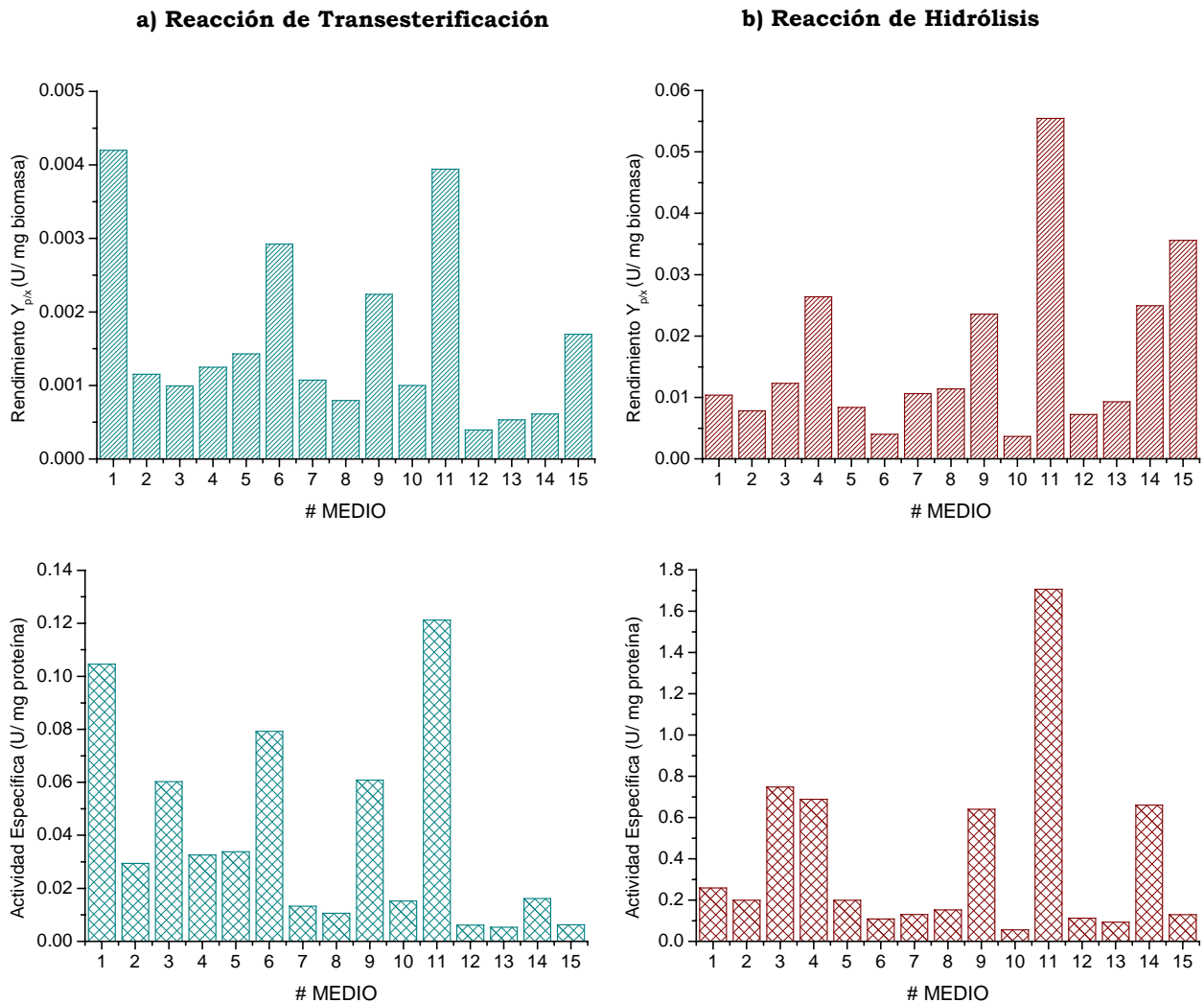


Figura 15. Rendimiento $Y_{p/x}$ y actividad específica (sobrenadante) para cada uno de los medios de cultivo estudiados al utilizar: a) Reacción de transesterificación y b) Reacción de hidrólisis. Los medios 1, 6 y 11 corresponden al utilizar glucosa como única fuente de carbono al 1, 0.3 y 2%, respectivamente.

Fickers *et al.* (2004) estudiaron la producción de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* y postularon que el gen LIP2 es el responsable de toda la actividad lipolítica extracelular, este gen codifica para una triacilglicerol hidrolasa glicosilada de 38 kDa. Demostraron que su nivel de inducción está influenciado positivamente por un incremento en la concentración de ácido oleico, pero no pudieron establecer una correlación directa entre la expresión de este gen y la actividad lipolítica, sugieren que la expresión de la lipasa podría estar regulada al nivel de su secreción. También encontraron una cinética bifásica en la producción de la lipasa, que probablemente no está relacionada con un fenómeno físico como pudiera ser la acumulación de la lipasa en el espacio periplásmico de la levadura antes de la exportación de la proteína a

través de la pared celular, ya que en un medio con glucosa, donde el nivel de la producción de la lipasa fue bajo, observaron una velocidad de producción constante, indicando que la lipasa es secretada directamente al medio de cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta primera etapa de la investigación, se puede deducir que durante la producción de las lipasas de *Candida antarctica* no hay efecto de represión por carbono.

En el presente estudio también se realizó un comparativo entre la actividad de la lipasa en el medio de cultivo completo (sobrenadante más células) y en el sobrenadante (obtenido por centrifugación del medio de cultivo para la separación de las células), con respecto a la biomasa producida (Figura 16). Aunque ha sido reportado que las lipasas de *Candida antarctica* son secretadas al medio, para las dos reacciones, se observó que la actividad en el sobrenadante fue menor que en el medio de cultivo completo, lo cual indicaría que cierta cantidad de las lipasas se quedan asociadas o retenidas en las células. Estos resultados fueron más notorios en la reacción de transesterificación, posiblemente más enzimas transesterificantes que se quedan unidas a las células y las hidrolíticas se secretan más al sobrenadante. Se ha reportado que cepas de levaduras del género *Candida*, *Yarrowia* y *Hansenula* pueden producir lipasas unidas a la célula o pueden secretarlas al medio de cultivo al encontrarse en medio líquido (Ionita *et al.*, 2001). En cuanto a la reacción de hidrólisis, la actividad lipolítica que se determinó en el sobrenadante y en el medio de cultivo completo fue muy similar. Otra posible explicación para esto es la secreción de algunas esterases al medio de cultivo que también pudieran detectarse mediante esta reacción, a diferencia de las lipasas. Es importante tratar de recuperar las lipasas que se quedan retenidas en la biomasa, mediante una extracción o algún tipo de lavado que permita su remoción y así poder incrementar la cantidad de lipasa recuperada en el extracto crudo de la enzima.

También se realizaron observaciones al microscopio a cada uno de los medios de cultivo estudiados para verificar si tienen algún efecto sobre la morfología de las células, ya que como se menciona en los antecedentes esta levadura es dimórfica, lo que quiere decir que puede crecer en forma de levadura o formando hifas dependiendo de las condiciones de crecimiento. En todos los medios de cultivo estudiados siempre

se observó crecimiento en forma de hifas, ya sea de manera dispersa o formando agregados (**anexo III**), sólo se presentaron pequeños cambios en la morfología de las células dependiendo de la fuente de carbono utilizada. Es importante mencionar que sólo se observaron cambios en la morfología a forma de levadura después de que la cepa fue resembrada varias veces.

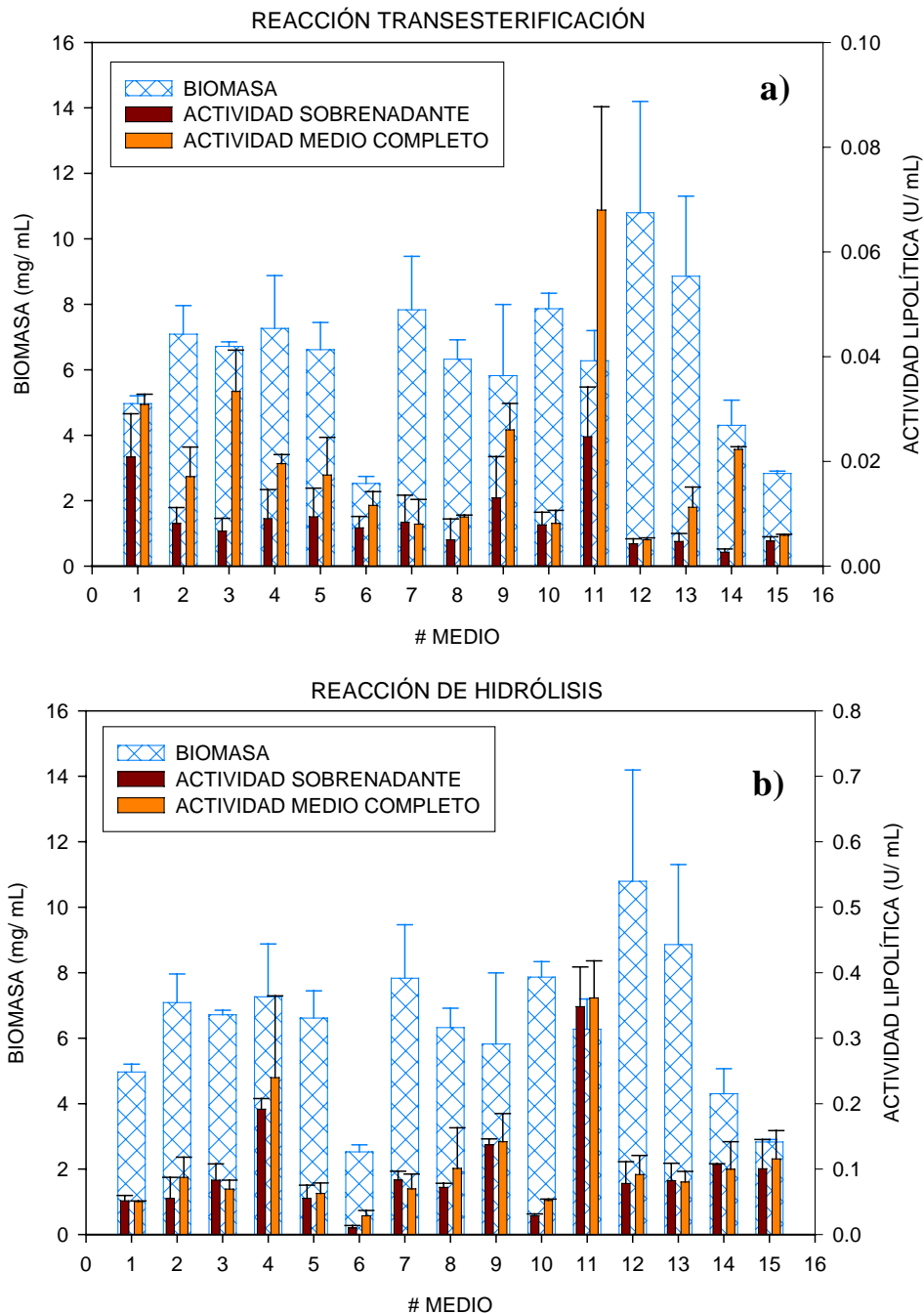


Figura 16. Comparación de la actividad lipolítica en el medio de cultivo y en el sobrenadante, relacionada con la biomasa producida. a) Reacción de transesterificación y b) Reacción de hidrólisis.

6.3 Efecto del oxígeno disuelto (OD) sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* a nivel fermentador (5L).

Hasta ahora son pocos los estudios reportados relacionados con el efecto del oxígeno sobre la producción de las lipasas. Sin embargo, en algunos se ha encontrado que el oxígeno puede ser un sustrato limitante para la producción de las lipasas de algunos microorganismos. Aunque en la mayoría de los casos se ha visto que el oxígeno favorece la producción de las lipasas, también ha sido reportado que bajos niveles de aireación incrementan la producción de algunas de estas enzimas. Lee y Rhee (1993) produjeron *Pseudomonas putida* bajo condiciones de aireación y agitación controladas. Chen *et al.*, (1999) encontraron que comparando con el crecimiento, la producción de la lipasa de *Acinetobacter radioresistens* estuvo más influenciada por el oxígeno, principalmente por la velocidad de transferencia del oxígeno. Sin embargo, para *Syncephalastrum racemosum*, Chopra y Chander (1983), encontraron que un cultivo estático genera una mayor actividad de la lipasa que un cultivo agitado. También para la producción de la lipasa de *Rhizopus arrhizus* ha sido reportado que la concentración de OD no es el factor intrínseco que afecte su productividad (Elibol y Ozer, 2000). En el caso de *Candida antarctica* la demanda de oxígeno podría ser crítica, ya que su crecimiento sólo ocurre en la presencia de aire, debido a que es una levadura no fermentativa. Sin embargo, no se encontró ningún reporte en este sentido durante la revisión bibliográfica.

Después de establecer a la glucosa como la fuente de carbono más adecuada para la producción de las lipasas de *Candida antarctica* y la inutilidad de emplear inductores, el estudio se enfocó a estudiar el efecto de la agitación y de la saturación del oxígeno disuelto (OD) a nivel fermentador de 5L, con el objetivo de incrementar el rendimiento y la productividad lipolítica y además conocer mejor el metabolismo de esta levadura. La velocidad de aireación, la concentración de OD y la transferencia de oxígeno, generalmente son parámetros clave para el estudio de las fermentaciones aerobias. En esta parte de la investigación, se determinó el efecto del OD bajo dos modos de operación, concentración de OD controlado y agitación controlada (Figura 17 y Figura 18). En todas las fermentaciones se determinó la actividad lipolítica en el sobrenadante, mediante la reacción de transesterificación.

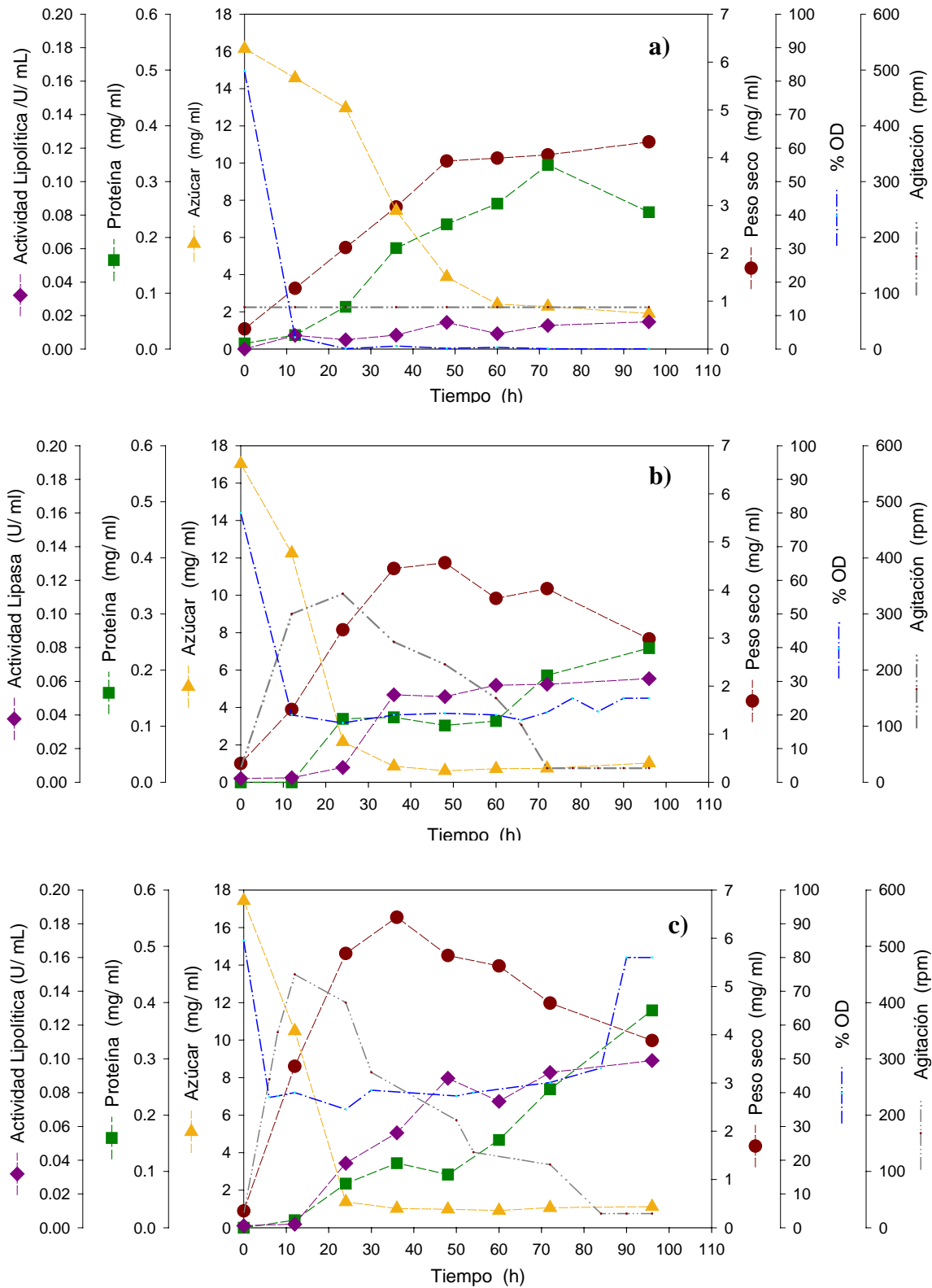


Figura 17. Producción de las lipasas de *Candida antarctica* en un fermentador de 5L, con 4L de medio YM (1% de glucosa), 30°C, aireación de 1.08 vvm y diferentes saturaciones de oxígeno disuelto: a)0%, b)20% y c) 40%. Para poder mantener la concentración de OD constante a cada una de las saturaciones estudiadas la agitación fue modificada automáticamente por el fermentador.



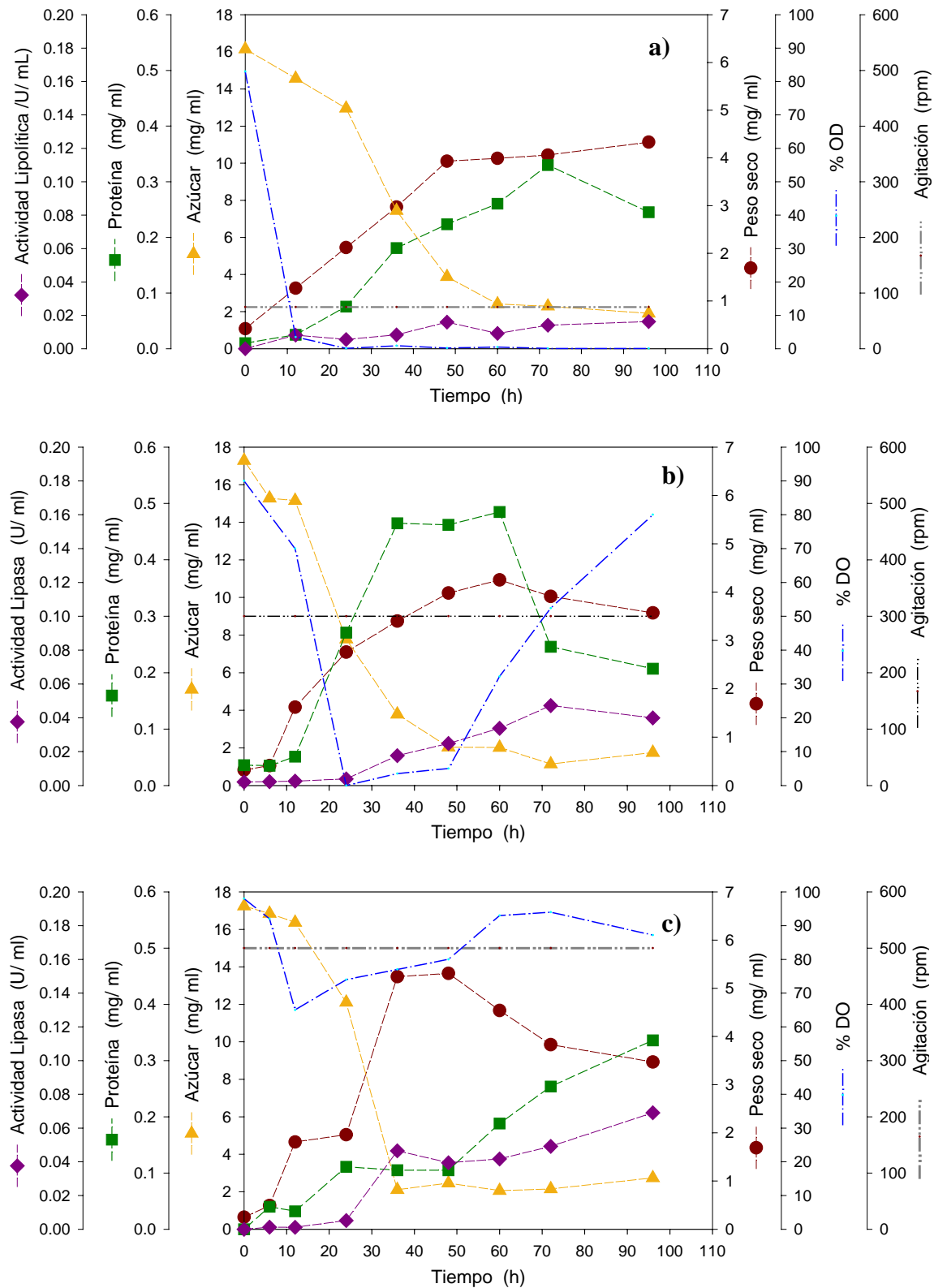


Figura 18. Producción de las lipasas de *Candida antarctica* en un fermentador de 5l, con 4L de medio YM (1% de glucosa), 30°C, aireación de 1.08 vvm y diferentes velocidades de agitación: a) 75 rpm, b) 300 rpm y c) 500 rpm.



La concentración de OD en el fermentador pudo mantenerse constante mediante variaciones automatizadas en la velocidad de agitación, el flujo de aire siempre se mantuvo constante a 10.8 vvm. La Figura 17 muestra que la producción de biomasa y la producción de las lipasas estuvieron afectadas por la concentración de OD en el medio de cultivo. Se pudo mejorar considerablemente la actividad lipolítica al mantener una saturación de OD arriba del 20% en el fermentador, en comparación con la actividad obtenida a nivel matraz. A nivel matraz la mayor actividad específica se obtuvo a las 96 h y fue de 0.203 U/mg de proteína y a nivel fermentador con 40% de saturación de OD la mayor actividad específica se obtuvo a las 48 h y fue de 0.9368 U/mg (datos obtenidos de la Figura 14 y 19c). Este incremento en la actividad lipolítica a nivel fermentador pudo deberse principalmente a que el OD disponible no limitó el crecimiento de la levadura, ya que se encuentra a una concentración mayor del nivel demandado. Además, comparado con un fermentador, los matraces tienen una agitación menos eficiente, lo cual limita la transferencia de masa de los sustratos.

Al utilizar una velocidad de agitación constante de 75 rpm (Figura 17a) se limitó el nivel de oxígeno durante casi todo el transcurso de la fermentación. El porcentaje de saturación de OD se mantuvo en 0% a partir de las 10 h, indicando una velocidad de consumo de oxígeno mayor al suministrado. Esto limitó el crecimiento de la levadura y la producción de las lipasas. En este caso, la fase estacionaria de crecimiento se alcanzó a las 48 h de incubación y no se observó una fase de muerte en la cinética de crecimiento. El consumo total de los azúcares se alcanzó a las 60 h de fermentación y fue más rápido comparado con los experimentos nivel matraz. La producción de las lipasas y el crecimiento fueron similares a lo obtenido a nivel matraz, ya que a las 96 h la actividad lipolítica a 75 rpm fue de 0.0163 U/mL y a nivel matraz fue de 0.0193 U/mL, pero la proteína secretada fue mayor en el fermentador. Las actividades específicas máximas fueron diferentes y se obtuvieron en tiempos diferentes, en matraz fue de 0.203 U/mg a las 96 h y en el fermentador fue de 0.073 U/mg a las 24 h, después de este tiempo la actividad lipolítica se mantuvo casi constante en los dos casos (Figura 14 y 19a).

Para mantener una saturación de OD al 20% (Figura 17b) se incrementó gradualmente la agitación hasta alcanzar una velocidad de 300 rpm a las 24 h de

fermentación. Posteriormente se observó un decremento lento y gradual de la agitación hasta alcanzar una velocidad de agitación constante a partir de las 72 h de fermentación. Después de las 36 h de fermentación la concentración de azúcares en el medio de cultivo fue cercana a cero y también a partir de este tiempo se obtuvo un aumento significativo de la actividad lipolítica (0.052 U/mL). La mayor actividad específica se obtuvo a las 60 h de fermentación y fue de 0.5284 U/mg (Figura 19b). En el estudio reportado por Ionita *et al.* (2001), encontraron que las condiciones óptimas para obtener una elevada actividad lipolítica para *Yarrowia lipolítica* se alcanzan cuando se incrementa gradualmente la velocidad de agitación (400-600-800-900 rpm) durante las diferentes fases de crecimiento del microorganismo, más no reportaron el OD alcanzado.

Para lograr mantener la saturación de OD a un 40%, a partir de las 12 h de fermentación se incrementó automáticamente la agitación hasta alcanzar una velocidad de casi 500 rpm (Figura 17c). Después de este tiempo se observó una rápida disminución de la agitación, lo cual pudo deberse a que se comienza a perder la viabilidad de las células y también al hecho de que al aumentar la agitación se provoca estrés mecánico en las células. El consumo total de los azúcares se alcanzó a las 24 h de fermentación. La producción de la biomasa y principalmente el incremento en la actividad lipolítica fue superior al mantener la saturación de OD en un 40% (0.0990 U/mL a las 96 h de fermentación), comparado con las demás condiciones estudiadas. También se observó un incremento en la proteína extracelular, pero no se correlacionó con la actividad lipolítica, por lo que la actividad específica más alta fue de 0.9368 U/mg a las 48 h de fermentación (Figura 19c).

Es importante resaltar que el efecto del oxígeno puede ser diferente para cada microorganismo. Gulati *et al.* (2000) estudiaron el efecto del oxígeno sobre la producción de la lipasa de *Aspergillus terreus* y observaron que un incremento en el nivel de OD de un 20% hasta un 40% de saturación no mejoró la producción de la lipasa y concluyeron que es suficiente mantener el nivel de OD hasta un valor crítico o limitante y que no es necesario alcanzar un porcentaje elevado de saturación de OD para mejorar la producción de ésta enzima. Posiblemente estas diferentes respuestas hacia la concentración de oxígeno son una consecuencia de las diferencias morfo-

fisiológicas entre los microorganismos, reflejando diferentes requerimientos de oxígeno para el mantenimiento de sus funciones metabólicas. Chen *et al.* (1999) estudiaron la influencia del oxígeno sobre la producción de la lipasa de *Acinetobacter radioresistens* bajo dos condiciones de operación diferentes, a concentración de OD controlado y a velocidad de aireación controlada. Los resultados demostraron un efecto más significativo del oxígeno sobre la producción de la lipasa que sobre el crecimiento celular. Mejoras en la transferencia de oxígeno mediante aireación o agitación provocaron un incremento en la productividad de la lipasa.

La Figura 18 muestra que la velocidad de agitación también tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento y producción de las lipasas de *Candida antarctica* pero en menor medida que cuando se mantiene el OD controlado. Al aumentar la velocidad de agitación, se obtuvieron ligeros incrementos en la producción de la lipasa y se pudo observar un mayor efecto sobre la producción de biomasa. A 75 rpm (Figura 18a) el crecimiento y producción de las lipasas es muy similar a lo obtenido a nivel matraz, la fase estacionaria se alcanzó a las 48 h y la producción de la lipasa fue muy baja. Al incrementar la velocidad de agitación a 300 rpm (Figura 18b), la fase estacionaria de crecimiento también se alcanzó entre las 48 h y 60 h, pero la producción de las lipasas fue mayor después de las 72 h de fermentación, obteniéndose una actividad específica de 0.1919 U/mg, que posteriormente se mantuvo constante. Esta velocidad de agitación limitó por un período corto de tiempo la concentración de oxígeno que requiere la levadura para su crecimiento, ya que a las 24 h la saturación de OD fue de 0%. Después de este tiempo se observó un aumento en la concentración de OD, la cual presentó dos etapas: la primera fue lenta, donde posiblemente las células comienzan a dañarse, y en la segunda etapa el incremento fue mucho más rápido, lo cual sugiere que las células ya estaban muy dañadas, además de no tener fuente de carbono disponible, observándose una disminución en la determinación de peso seco. En esta fermentación la proteína secretada al medio de cultivo tampoco presentó una correlación con la lipasa producida.

La velocidad de agitación de 500 rpm (Figura 18c) permitió mantener durante toda la fermentación una saturación de OD por arriba del 65%. A las 96 h se obtuvo una actividad lipolítica de 0.0690 U/mL, la cual fue muy parecida a la obtenida a una saturación del 20% y fue ligeramente mayor a la obtenida para una agitación de

300 rpm. Comparando con la fermentación a 300 rpm, la actividad específica fue mayor (0.4426 U/mg) y se obtuvo a un menor tiempo (36 h). Esto se debe a que la proteína secretada fue menor que en la fermentación a 300 rpm. La fase estacionaria se alcanzó a las 36 h y después de las 48 h se observó una caída en la curva de crecimiento debida a una disminución en el peso seco. En esta etapa es muy probable que las células se encuentren mucho más dañadas, debido a las condiciones de fermentación, ya que la agitación podría provocar la ruptura de las células por estrés mecánico, y por otro lado la elevada oxigenación podría provocar estrés oxidativo. El consumo completo de los azúcares se alcanzó a las 36 h de fermentación, al igual que lo observado con un 20% de OD. Comparando con lo obtenido al utilizar una velocidad de agitación de 75 y 300 rpm, el crecimiento de la levadura fue mayor y más rápido.

Como sucede con una saturación de oxígeno disuelto controlada, el efecto de la agitación también depende de la fisiología de cada microorganismo. Aunque al igual que en este estudio, generalmente se ha encontrado que velocidades bajas de agitación pueden limitar los niveles de oxígeno requeridos por algunos microorganismos y velocidades de agitación muy altas pueden provocar estrés mecánico en las células. Alonso *et al.* (2005) estudiaron el efecto de la agitación sobre la producción de la lipasa de *Yarrowia lipolytica* y encontraron que una agitación de 100 rpm limitó los niveles de oxígeno, obteniendo una actividad mayor a 200 rpm. Cuando incrementaron la agitación a 300 y 400 rpm, no sólo se redujeron los niveles de actividad sino también fue más bajo el crecimiento celular, lo cual fue atribuido a estrés mecánico y/ú oxidativo. Resultados similares también fueron reportados para *Aspergillus terreus* (Gulati *et al.*, 2000), *Rhizopus arhizus* (Elibol y Ozer, 2000) y *Penicillium restrictum* (Freire *et al.*, 1997). Es importante mencionar que el estrés mecánico en un hongo va a ser mayor en comparación con una levadura, esto se debe a las características morfológicas que presentan los hongos, esto se revisa más a detalle en el apartado 7.5.

Las representaciones gráficas que se muestran en las Figura 19 y Figura 20 permitieron realizar una mejor comparación del efecto de la saturación de OD y de la velocidad de agitación sobre la producción de biomasa y de la actividad lipolítica. Se pudo definir claramente que en todas las fermentaciones la producción de las lipasas comenzó entre las 12 y 24 h de fermentación y se observó un incremento con respecto

al tiempo de fermentación. La concentración de OD fue el factor intrínseco que afectó de manera más significativa el crecimiento y la producción de las lipasas de *Candida antarctica*. Al utilizar un 40% de OD el efecto fue más pronunciado. Bajo estas condiciones de fermentación, después de 48 h, se obtuvo la mayor actividad específica y productividad, 0.9368 U/mg y 0.00184 U/mL.h respectivamente (Figura 19). Los rendimientos también fueron mayores al mantener constante la concentración de OD a un 40%. Los resultados muestran que es necesario un control preciso del OD, ya que es una variable de operación crítica para la producción de las lipasas.

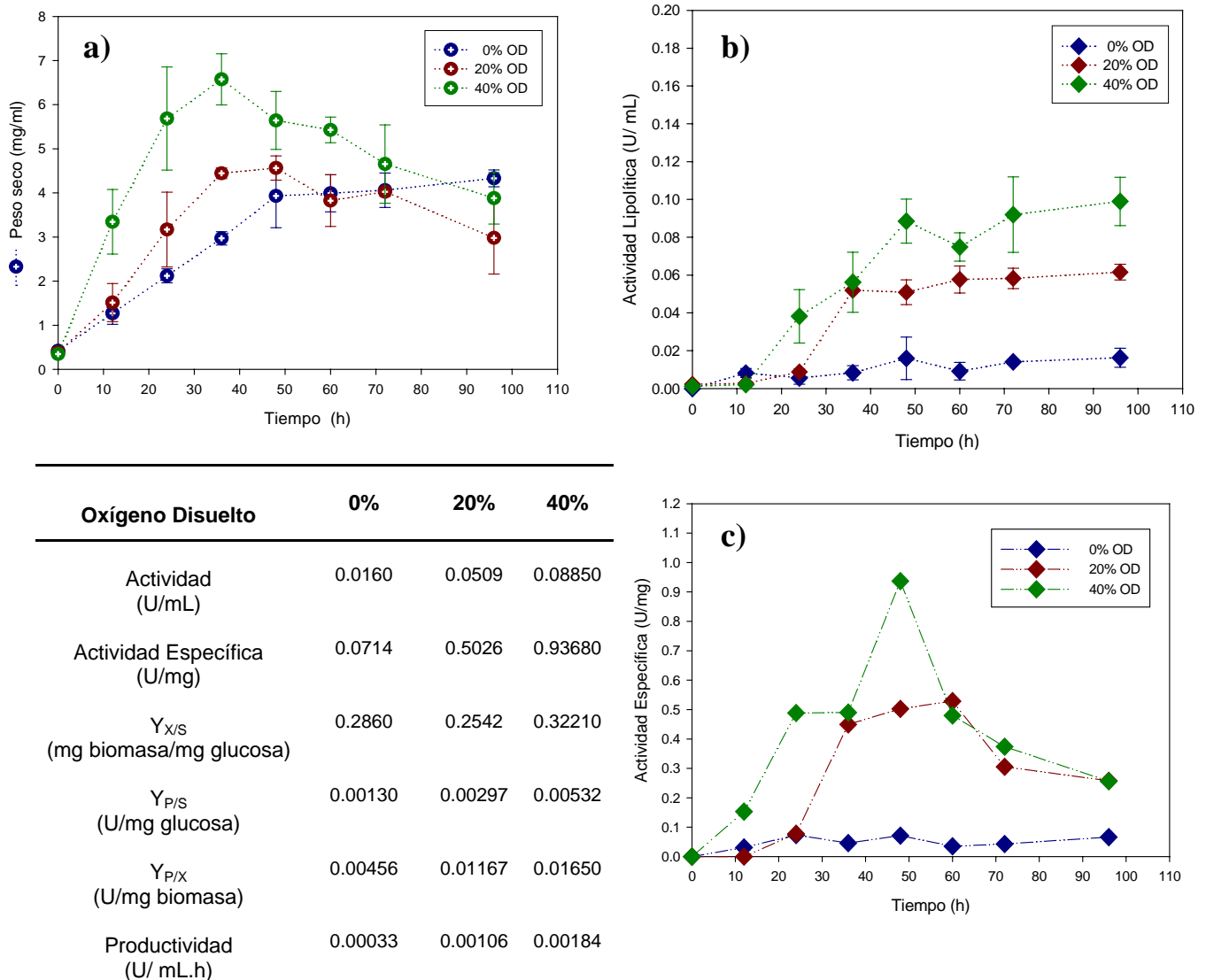


Figura 19. Efecto de la saturación de OD sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* a 30°C (a) Biomasa producida, (b)Actividad Lipolítica y (c)Actividad Específica.

Por otra parte se observó un incremento en la productividad lipolítica al aumentar la velocidad de agitación (0.00093 U/mL.h), pero el efecto fue menos significativo en comparación con lo obtenido para un 40% de OD (0.00184 U/mL.h). Para una agitación de 500 y 600 rpm el incremento en la actividad lipolítica fue más significativo a partir de las 36 h de fermentación, después de este tiempo se observaron diferencias entre éstas dos velocidades de agitación. Para una agitación de 75 y 600 rpm se obtuvo una actividad lipolítica de 0.008 U/mL y 0.053 U/mL respectivamente, a las 36 h de fermentación, posteriormente se mantuvo casi constante en los dos casos. Los resultados también demostraron un efecto más significativo tanto de la agitación como del OD sobre la producción de las lipasas que sobre el crecimiento celular.

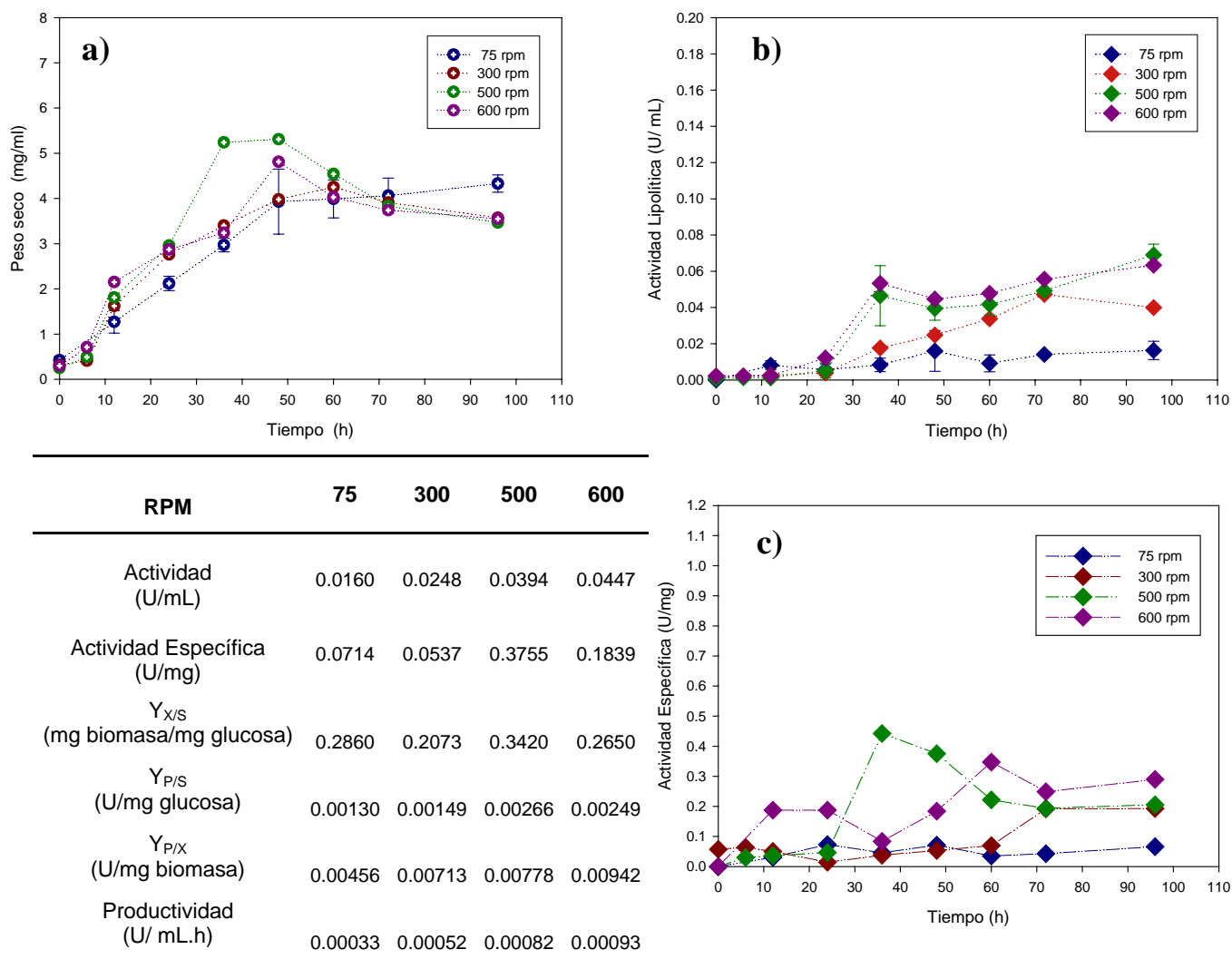


Figura 20. Efecto de la agitación sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica* a 30°C (a) Biomasa producida, (b)Actividad Lipolítica y (c)Actividad Específica.



6.4 Efecto de las condiciones de fermentación sobre la morfología de *Candida antarctica*

El crecimiento de microorganismos filamentosos en cultivos sumergidos posee una serie de características morfológicas que los hacen muy diferentes de los cultivos de bacterias o levaduras. Las características reológicas de los cultivos de microorganismos filamentosos están estrechamente relacionados con la morfología que presentan, la cual puede variar desde filamentos creciendo de forma dispersa hasta estructuras compactas formadas por filamentos enredados denominadas pellets. El tamaño de los pellets puede variar desde pocos cientos de micras hasta varios centímetros según las condiciones del cultivo. La figura 22 representa las morfologías encontradas en fermentaciones industriales.

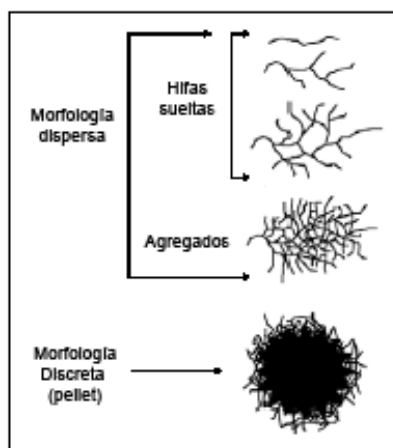


Figura 21. Morfologías observadas en fermentaciones de microorganismos filamentosos.

La productividad de un microorganismo filamentosos está estrechamente ligada a la morfología y a las condiciones de cultivo (Makagiansar *et al.*, 1993; Jüsten *et al.*, 1998; Amanullah *et al.*, 1999). La morfología está influenciada por gran cantidad de factores en el cultivo, que a la vez están condicionados por la morfología del microorganismo.

Durante el transcurso de las fermentaciones se realizaron observaciones en el microscopio con el fin de tener evidencia del daño generado a las células como consecuencia de las diferentes condiciones de fermentación estudiadas. En la Figura

22 se presentan las imágenes al microscopio obtenidas para las muestras de una fermentación mantenida a un 40% de saturación de OD. A partir de las 12 h de fermentación se observó el crecimiento en forma de filamentos con formación de agregados y de pellets. El daño físico y la ruptura del micelio comenzó a partir de las 36 h de fermentación, lo cual concuerda con un decaimiento en la curva de crecimiento (Figura 20b). Después de 72 h de fermentación las células se observaron significativamente dañadas y ya no retuvieron el colorante de contraste (safranina) en la pared celular. Es posible que este daño provoque la liberación de las lipasas que se encuentran en el interior de las células y de las que se encuentran asociadas a la membrana. Pero a pesar de esto la actividad lipolítica determinada en el medio de cultivo completo fue mayor. Por lo que seguramente todavía hay algunas lipasas que se quedan retenidas en la superficie de las células.

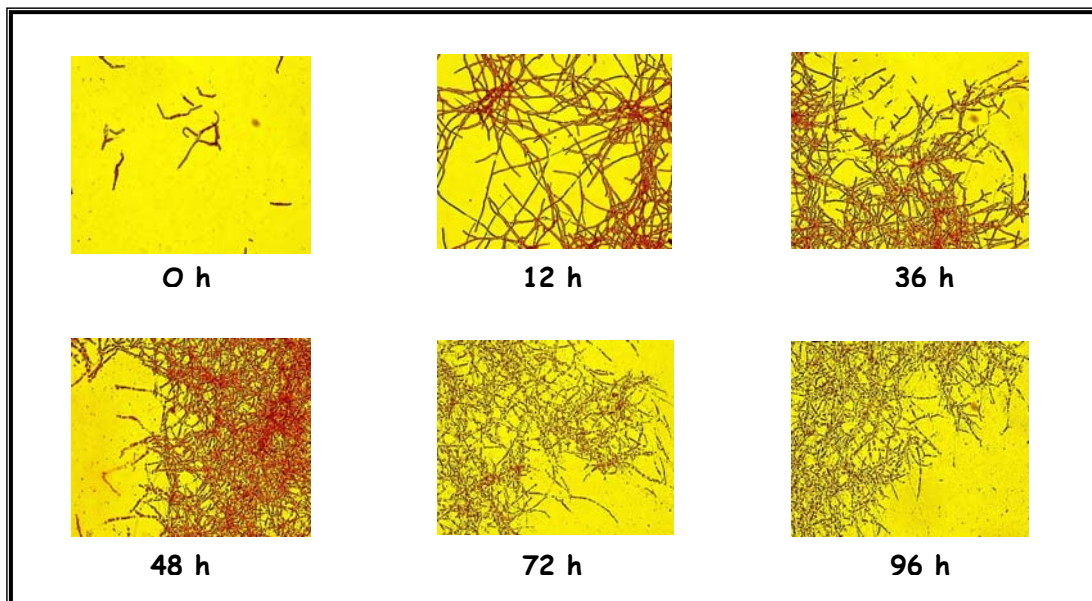


Figura 22. Morfología de *Candida antarctica* en una fermentación con un 40% de OD. (Observaciones al microscopio 40X).

En todas las fermentaciones se observó a las células en suspensión, generalmente formando agregados de hifas. Se observó formación de pellets principalmente cuando la agitación fue baja (75-300 rpm). Tras la inoculación del fermentador, se observaron distintas evoluciones del crecimiento y fragmentación de los pellets en función de la intensidad de agitación y también de la edad del cultivo. Se

conoce que el tamaño de los agregados celulares (micelios) y de los pellets de hongos se reduce al aumentar la velocidad de agitación (Cui *et al.*, 1998). Los mecanismos de reducción del tamaño incluyen la erosión superficial de las hifas exteriores y la ruptura del pellet por estrés mecánico.

Las distintas morfologías que pueden presentar los microorganismos generan grandes diferencias en las condiciones de cultivo. Los cultivos en forma de filamentos sueltos poseen una distribución homogénea de la biomasa, sustrato y producto y produce fermentaciones más viscosas. Este tipo de cultivos tienen un comportamiento reológico de tipo pseudoplástico, presentado bajas viscosidades en zonas fuertemente agitadas y altas viscosidades en zonas poco agitadas, debido a las fuertes interacciones entre los filamentos. Este comportamiento reológico genera grandes problemas de transferencia de materia requiriendo mayor potencia en la agitación para asegurar la mezcla, dando lugar a daños celulares en las zonas cercanas al agitador. En el otro extremo morfológico, los cultivos en forma de pellets discretos presentan importantes ventajas desde el punto de vista reológico ya que poseen comportamientos cercanos al newtoniano, caracterizado por tener buenas propiedades de transferencia de materia y energía. Los cultivos en forma de pellets presentan homogeneidad de las propiedades reológicas en todas las zonas del reactor. Otra ventaja radica en que se facilitan los procesos post-reactor al poder separar de forma sencilla la biomasa en forma de pellets del medio de cultivo. A escala microscópica los pellets tienen heterogeneidad debido a las distintas densidades de hifas que presentan.

La existencia de una fuerte resistencia a la transferencia de nutrientes y oxígeno a través del pellet hace que el crecimiento de un pellet esté limitado a su zona más externa. La estructura de un pellet se puede dividir en tres zonas diferenciadas en función de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno y consecuentemente en función de su crecimiento. La zona más externa contiene filamentos en contacto directo con el medio de cultivo representando la zona de crecimiento. La siguiente zona corresponde a la de crecimiento limitado en la que el aporte de nutrientes y oxígeno es suficiente para mantenerse pero no suficiente para crecer, la tercera corresponde a la zona de muerte celular en la que no llegan nutrientes ni oxígeno suficientes para mantenerse reproduciendo y se dan fenómenos de autólisis.

6.5 Producción de las lipasas de *Candida antarctica* en el sobrenadante y en el medio de cultivo completo.

Al estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad lipolítica, se encontró que una cantidad apreciable de las lipasas no son secretadas al medio de cultivo y que posiblemente se quedan retenidas o asociadas a las células (Figura 16). Debido a esto, se consideró importante realizar una fermentación bajo las mejores condiciones obtenidas (40% de saturación de OD) y poder determinar la actividad lipolítica tanto en el sobrenadante como en el medio de cultivo completo, mediante las dos reacciones estudiadas: transesterificación e hidrólisis. Además de poder definir de esta forma si tales condiciones permiten la mejor secreción de las lipasas hacia el medio de cultivo (Figura 23).

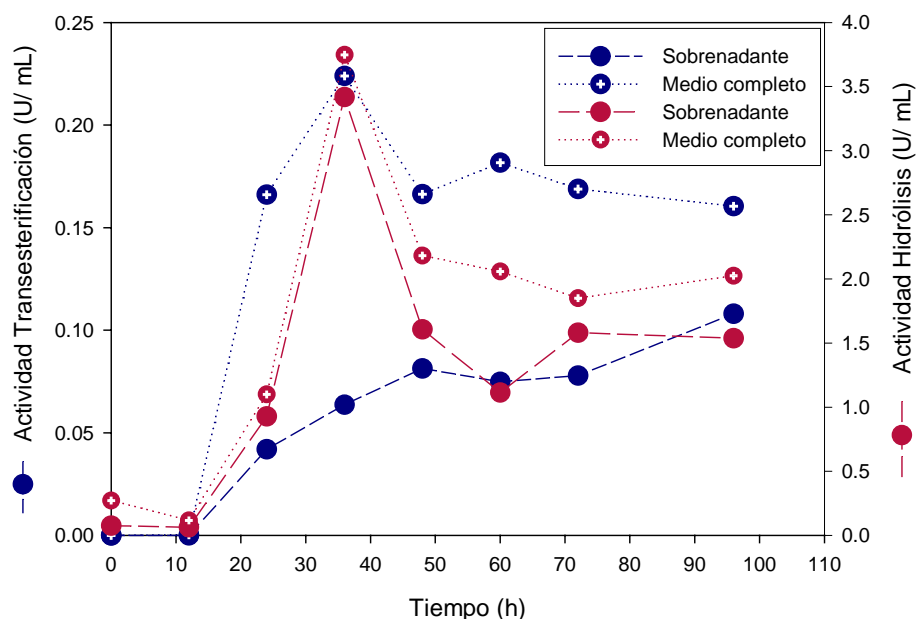


Figura 23. Producción de las lipasas de *Candida antarctica* en el sobrenadante y en medio de cultivo completo. A nivel fermentador de 5L a una saturación de OD de 40%, 30°C y una aireación de 1.08 vvm.

La Figura 23 muestra que no toda la lipasa producida es secretada al medio de cultivo, ya que una cantidad considerable se queda retenida en las células. Posiblemente este comportamiento este relacionado con la morfología de esta levadura,

ya que al crecer como hongo filamentoso, formando agregados de micelio, hace que parte de las lipasas producidas se queden retenidas en el micelio. Mediante la reacción de transesterificación se logró detectar una actividad mayor en el medio de cultivo completo que en el sobrenadante, esto fue más significativo a las 36 h de fermentación donde la actividad en el medio de cultivo completo fue de 0.224 U/mL y en el sobrenadante de 0.0637 U/mL. A partir de las 36 h, la actividad en el medio completo comenzó a disminuir; seguramente también se secretan algunas proteasas que actúan sobre las lipasas, provocando esta disminución en la actividad. A las 96 h de fermentación se obtuvo una actividad de 0.160 U/mL. En el sobrenadante, la actividad continuó aumentando y se obtuvo la actividad lipolítica más alta a las 96 h (0.108 U/mL).

Cuando se determinó la actividad mediante la reacción de hidrólisis, la tendencia fue muy parecida en el medio completo y en el sobrenadante. La actividad obtenida en el medio completo fue ligeramente mayor que en el sobrenadante. En ambos casos, la máxima actividad se obtuvo a las 36 h de fermentación, periodo en el cual se observó un incremento considerable en la actividad, que posteriormente comenzó a disminuir. Cabe recalcar, tal y como se explicó anteriormente, que mediante la reacción de hidrólisis posiblemente se determine la actividad de algunas otras esterasas y no solo la de las lipasas, y como se explicó la distribución de estas enzimas es diferente.

6.6 Efecto del Tritón X-100 sobre la secreción de las lipasas de *Candida antarctica*

Después de observar que no toda la lipasa es secretada al medio de cultivo, se consideró la posibilidad de utilizar un tensoactivo que ayudara a la liberación de las lipasas que se quedan asociadas a las células. Existen estudios en los que se ha reportado su efecto sobre la producción de algunas lipasas. La adición de tensoactivos (por ejemplo: SPAN, Tween, SDS, PEG, Tritón) al medio de cultivo generalmente provoca un incremento en la actividad lipolítica. Por ejemplo, Lin *et al.* (1995) encontraron que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* puede producir de manera óptima su

lipasa en la presencia de 2 g/L de Tritón X-100. Este fenómeno ha sido atribuido a que se mejora la dispersión de los aceites en el medio y a que provoca cambios en la permeabilidad de la célula o a un efecto tensoactivo sobre las lipasas unidas a las células (Dominguez *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003). Sin embargo, no siempre se obtiene un efecto positivo de estos compuestos sobre la producción y secreción de las lipasas, por lo que su efecto está en función del tipo de tensoactivo y del microorganismo en estudio. Por lo tanto, antes de considerar su adición al medio de cultivo se requieren estudios preliminares para cada caso en particular. Decidimos estudiar el efecto del Tritón X-100 sobre la secreción de las lipasas. Se utilizó una fermentación con OD controlado a un 40% de saturación, a la que después de 72 h de incubación se le adicionó 1% de Tritón X-100. En la Figura 24 se presentan los resultados obtenidos.

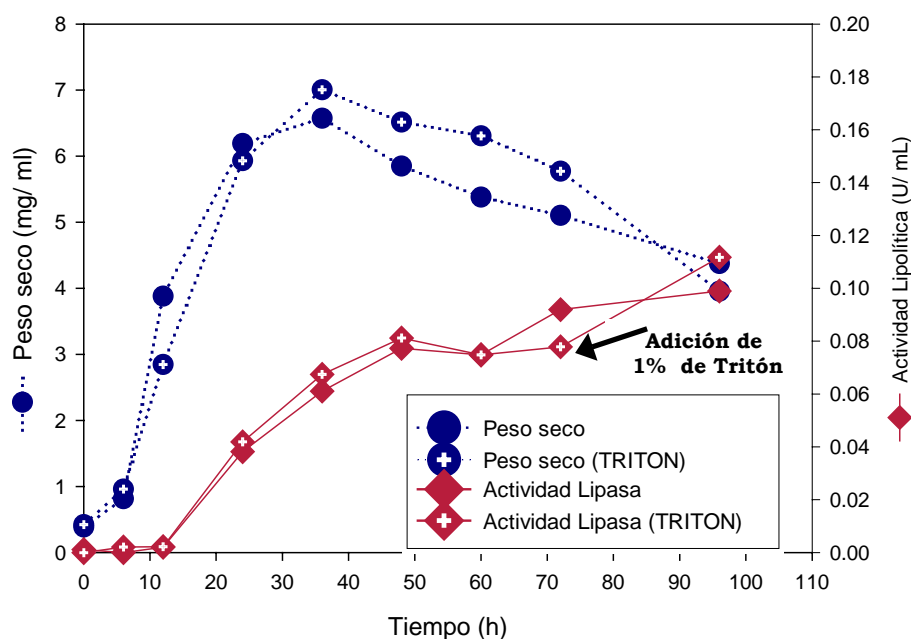


Figura 24. Efecto del Tritón sobre la secreción de las lipasas, en una fermentación con 72 h de incubación, a un 40% de OD controlado.

La adición del Tritón no incrementó de manera significativa la secreción de las lipasas al medio de cultivo. Después de 24 h de adicionar el tensoactivo, el incremento en la actividad fue de 0.0339 U/mL. La producción de biomasa presentó la misma tendencia en ambas fermentaciones, la mayor producción de biomasa se obtuvo a las 36 h fermentación y posteriormente no se observó una fase estacionaria sino que

comenzó un declive en la cinética de crecimiento. La tendencia que se obtuvo para la producción de las lipasas también es muy similar en las dos fermentaciones. Sólo al final de la fermentación, se observó un ligero incremento en la actividad lipolítica al adicionar el Tritón. Se decidió adicionar el Tritón a las 72 h de fermentación para evitar problemas de generación de espuma durante todo el transcurso de la fermentación. Posiblemente hubiera sido conveniente adicionarlo a partir de las 24 h, ya que a partir de este tiempo (Figura 23) es cuando se presentó un incremento sustancial en la actividad lipolítica en el medio de cultivo completo, comparado con la actividad obtenida en el sobrenadante (20 veces más pequeña). Es necesario realizar más estudios para determinar si en algún momento de la fermentación es factible o no la adición del tritón para mejorar la recuperación de las lipasas.

6.7 Purificación de las lipasas de *Candida antarctica*

La purificación de las lipasas de *Candida antarctica* se realizó a partir de una fermentación de 4 L con 72 h de incubación, mantenida a 40% de OD y utilizando 1% de glucosa como fuente de carbono, ya que bajo estas condiciones de fermentación fue posible obtener una buena actividad lipolítica, el valor promedio de actividad obtenido mediante la reacción de transesterificación fue de 0.1 U/mL.

6.7.1. Obtención del extracto crudo de las lipasas

Previo al inicio de las etapas de purificación, se obtuvo el extracto crudo de las lipasas. El medio de cultivo primero se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 min para separar las células y el sobrenadante. Posteriormente se extrajeron las lipasas retenidas en la biomasa, según lo descrito en el capítulo de métodos **(5.3.5)**. Experimentos previos demostraron que mediante un lavado con agua destilada desionizada es posible recuperar una mayor cantidad de las lipasas asociadas a las células **(anexo IV)**. Para este fin, las células se mezclaron y lavaron con 300 mL de agua destilada desionizada y después se volvieron a centrifugar para recuperar el sobrenadante. El extracto crudo de las lipasas se obtuvo juntando esta agua de lavado con el sobrenadante de la fermentación. Posteriormente, para verificar si es posible

mejorar la recuperación de estas enzimas, se determinó la actividad lipolítica antes de juntar estas muestras y también después de mezclarse; además se realizó una electroforesis para conocer el perfil de las proteínas obtenidas (Figura 25). También se realizó un zimograma al extracto crudo (sobrenadante de fermentación más lavado de las células) para poder detectar la presencia de las lipasas (Figura 26).

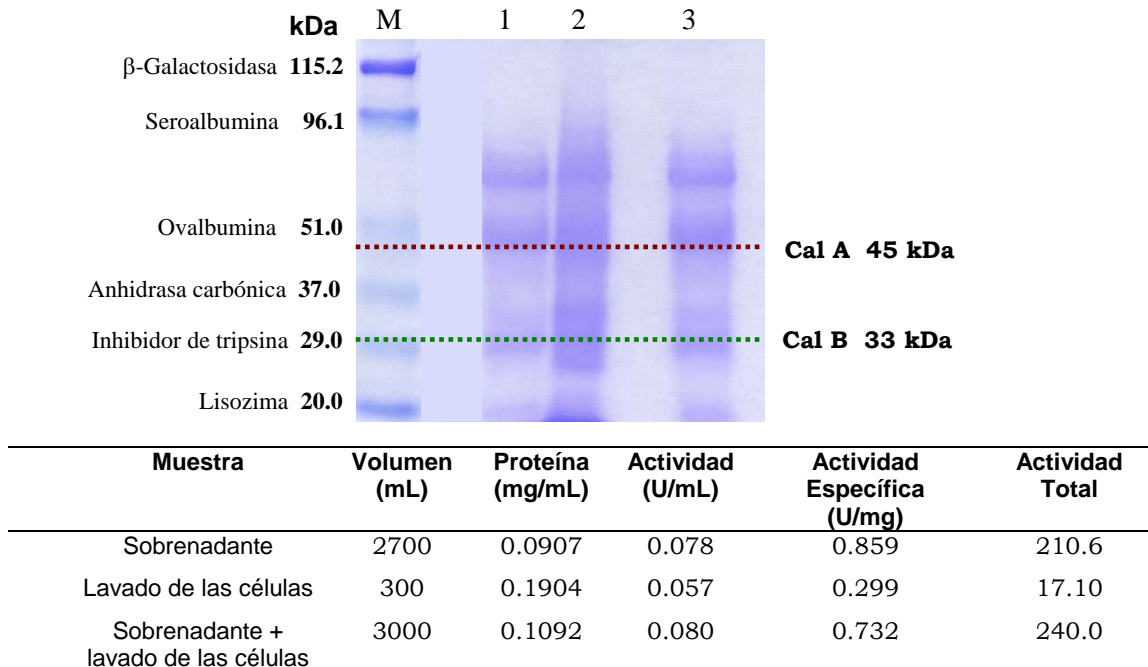


Figura 25. Recuperación de las lipasas unidas a las células mediante un lavado con agua destilada desionizada. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular, el 1 al sobrenadante de la fermentación, el 2 al lavado de las células y el 3 al extracto crudo de la enzima que corresponde al sobrenadante más el lavado de las células.

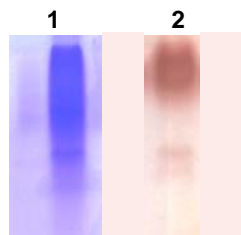


Figura 26. Zimograma del extracto crudo de las lipasas, para demostrar la actividad de las lipasas de *Candida antarctica* hacia la hidrólisis de α -naftol. El carril 1 corresponde al extracto crudo de las lipasas en una electroforesis nativa, tiñendo las proteínas con azul de coomassie. El carril 2 también corresponde al extracto crudo de las lipasas, después de incubar el gel nativo en una solución de α -naftol y revelar con una solución de fast red.

Al lavar las células con agua y mezclar el agua de lavado con el sobrenadante, se pudo mejorar la recuperación de las lipasas. La actividad lipolítica se incrementó de 210.6 UT a 240 UT. Además el perfil de las bandas en la electroforesis no fue modificado (Figura 25).

6.7.2 Purificación de las lipasas

Los resultados obtenidos para cada paso de purificación se presentan en la Tabla 13. La actividad específica de las lipasas recuperadas en el extracto crudo fue de 0.382 U/mg. La purificación tuvo como primera etapa una cromatografía de intercambio aniónico. Se tomaron 3000 mL del extracto crudo y se pasaron por una columna empacada con la resina QAE Toyopearl, pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM (pH 7.2). La muestra que no se retuvo en la columna fue recuperada (volumen muerto). El porcentaje de recuperación de esta primera etapa de purificación fue de 85.33% con un factor de purificación de 3.11. En este paso de purificación las lipasas no presentaron afinidad por esta matriz, pero otras proteínas pudieron unirse fuertemente, siendo ésta resina útil como filtro para la eliminación de otras proteínas.

Se confirmó lo reportado por Patkar *et al.*, 1993, quienes mencionan que las dos lipasas de *Candida antarctica* no se unen a resinas de intercambio aniónico y catiónico en un rango de pH de 7 a 9. Este mismo comportamiento fue observado por Snellman *et al.* (2002) durante la purificación de la lipasa de *Acinetobacter sp.* RAG-1. Estos últimos investigaron la capacidad de unión de esta lipasa a resinas de intercambio iónico y encontraron que presentaba poca afinidad (alrededor de un 10%) a estas matrices, sin embargo, otras proteínas pudieron unirse fuertemente incrementando la purificación de la enzima significativamente.

Antes de utilizar como primer paso de purificación una técnica cromatográfica, también se realizaron pruebas mediante precipitación con sulfato de amonio, sin embargo los porcentajes de recuperación no fueron satisfactorios y finalmente se decidió omitir esta técnica de purificación (**anexo V**).

Posteriormente la muestra se concentró a 560 mL mediante ultrafiltración, utilizando un tamaño de corte de 5 kDa. Como segundo paso de purificación se utilizó una cromatografía de interacción hidrofóbica, ya que en muchos estudios se ha reportado la purificación de las lipasas mediante este tipo de cromatografía (Snellman *et al.*, 2002; Patkar *et al.*, 1993; Nawani y Kaur, 2000; Brush *et al.*, 1999; Mayordomo *et al.*, 2000). La muestra concentrada se pasó por una columna empacada con 50 mL de resina fenil sefarosa CL4B, pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8.0) con 0.5 M de NaCl. La columna se eluyó con decrementos en la molaridad y posteriormente con etanol al 25 y 50%. Se encontraron tres picos con actividad lipolítica (Figura 27) y por lo tanto las fracciones obtenidas se dividieron en tres muestras, a las cuales se les verificó su pureza mediante electroforesis (Figura 28).

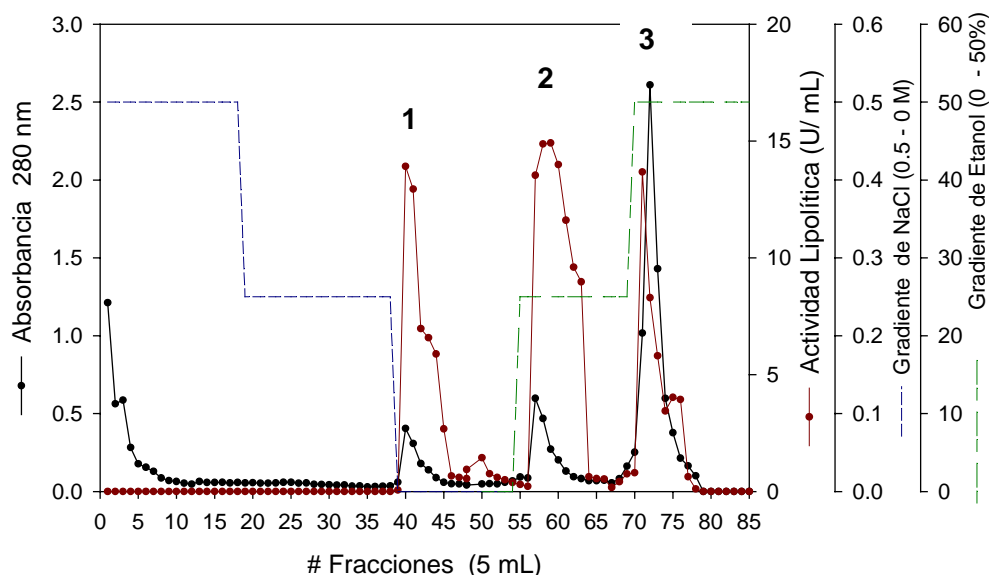


Figura 27. Cromatografía de las lipasas de *Candida antarctica* sobre Fenil Sefarosa CL4B. Se colectaron fracciones de 5 mL. Se determinó la actividad mediante la hidrólisis de p-nitrofenil laurato. Se obtuvieron tres picos de actividad. Uno al lavar la columna con buffer Tris-HCl 5mM (pH 8), otro al utilizar el mismo buffer más 25% de etanol y otro al utilizar 50% de etanol.

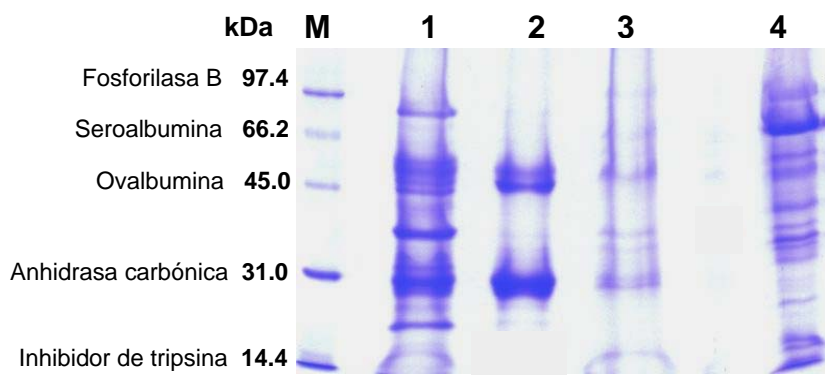


Figura 28. Electroforesis SDS/PAGE, de las fracciones obtenidas de la Cromatografía de interacción hidrofóbica. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular, el 1 de la fracción 40 a la 45, el 2 de la fracción 57 a la 63, el 3 de la fracción 74 a la 76 y el 4 corresponde al efluente de la resina. después de pasar la muestra.

Como se muestra en las figuras 27 y 28, ambas lipasas se recuperaron en las fracciones 57 a la 63, esto fue al eluir la resina con etanol al 25 %. Con este tipo de cromatografía se logró obtener un buen porcentaje de recuperación (67.12 %) y se incrementó considerablemente el factor de purificación a 117.14 (Tabla 11). Pero no se logró separar a las dos lipasas y por lo tanto la actividad lipolítica determinada corresponde a la actividad conjunta de la lipasa A y B (Figura 29). También se realizó un isoelectroenfoco a la muestra obtenida a partir de la columna hidrofóbica para verificar si el punto isoelectrico de estas proteínas corresponde a los reportados para las dos lipasas de *Candida antarctica* (**anexo VI**).

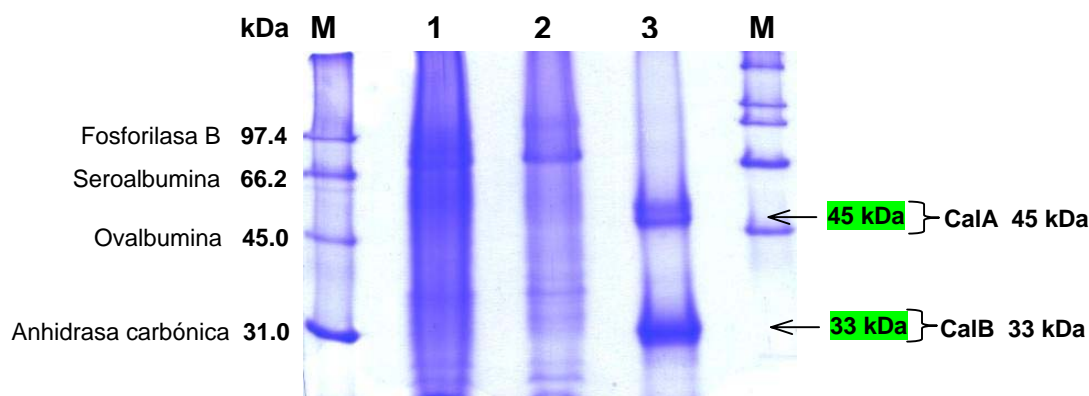


Figura 29. Electroforesis SDS/PAGE para los primeros dos pasos de purificación. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular, el 1 al extracto crudo de la lipasa, el 2 después de la cromatografía de intercambio aniónico y el 3 después de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Posterior a este paso de purificación, se intentó separar a las dos lipasas mediante una cromatografía de intercambio catiónico, según lo reportado por Patkar *et al.* (1993). Se utilizó la resina CM-Sefarosa pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM (pH 5.0). La columna fue eluida con un gradiente creciente de NaCl. Al verificar la actividad lipolítica del efluente (volumen muerto) y de las fracciones obtenidas de la elución de la resina, casi toda la actividad lipolítica fue recuperada en el efluente y sólo se obtuvo un pequeño pico de actividad cuando se eluyó la resina, por lo que se había considerado que ninguna de las dos lipasas había presentado afinidad (Tabla 11). Pero al verificar la pureza mediante electroforesis se encontró que la lipasa B fue recuperada en las fracciones obtenidas de la elución de la resina y que la lipasa A se recuperó en el efluente (Figura 30). El porcentaje de recuperación fue de (~8%) y el factor de purificación disminuyó considerablemente, por lo que éste fue el paso crítico de purificación. Es necesario realizar más estudios que permitan encontrar las condiciones ideales para la utilización de esta columna y que sea factible su aplicación como último paso de purificación

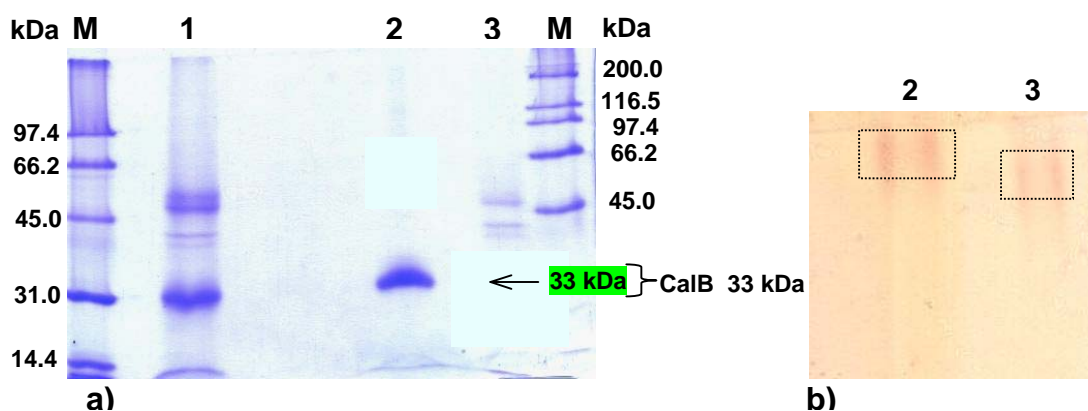


Figura 30. a) Electroforesis SDS/PAGE de las fracciones obtenidas de la Cromatografía de intercambio catiónico. La carril M corresponde a los marcadores de peso molecular, el 1 antes de pasar la muestra, el 2 a las fracciones obtenidas de la elución de la resina y el 3 al efluente de la resina (volumen muerto). b) Zimograma de las dos muestras obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico. El carril 2 y 3 corresponden a las muestras 2 y 3 de a).

Es importante mencionar que antes de determinar esta metodología para la purificación de las lipasas se estudiaron otros pasos de purificación, como la filtración en gel, pero los porcentajes de recuperación fueron muy bajos y tampoco se logró una separación efectiva de ambas lipasas. Estos resultados se presentan en el **anexo VII**.

Tabla 11. Purificación de las lipasas de *Candida antarctica*

	Volumen Total	Actividad (U/ ml)	Actividad Total ^[1]	Proteína (mg/ ml)	Proteína Total ^[2]	Actividad Específica ^[3] (U/ mg)	Factor Purificación ^[4]	% Recuperación ^[5]
Extracto crudo de la lipasa	3000	0.064	192	0.167	501.60	0.382	1	100
QAE Toyopearl (Intercambio aniónico)	2900	0.056	163.85	0.047	138.04	1.186	3.107	85.33
Ultrafiltración	560	0.283	158.48	0.239	133.84	1.184	3.099	82.54
Fenil Sefarosa CL4B (Interacción hidrofóbica)	180	0.716	128.88	0.016	2.88	44.75	117.14	67.12
CM Sefarosa (Intercambio catiónico)								
Elusión (CALB)	15	0.150	2.250	0.0219	0.328	6.85	17.93	1.117
Efluente (CALA)	15	0.874	13.110	0.1392	2.088	6.20	16.24	6.828

[1] El volumen total (mL) entre la actividad (U/mL)

[2] El volumen total (mL) entre la proteína (mg/mL)

[3] La actividad total (U) entre la proteína total (mg)

[4] La actividad específica de cada paso de purificación por 1 (factor de purificación inicial) y dividida entre la actividad específica inicial (Define el numero de veces que se purifica una proteína).

[5] La actividad total de cada paso de purificación por 100 y dividida entre la actividad total inicial (Define el porcentaje de actividad que se recupera).

7. CONCLUSIONES

- Contrario a lo planteado en la hipótesis, los sustratos lipídicos no mejoraron la producción de las lipasas de *Candida antarctica*. Se obtuvo un mejor rendimiento ($Y_{p/x}$) y actividad específica al utilizar glucosa como única fuente de carbono. Lo anterior demuestra que en *Candida antarctica* no se presenta el fenómeno de represión por carbono.
- Mediante estudios de actividad lipolítica se determinó que no toda la lipasa producida por *Candida antarctica* es secretada al medio de cultivo. La lipasa asociada a las células representa alrededor de un 40% de la producida durante las fermentaciones.
- La producción de las lipasas estuvo influenciada principalmente por el oxígeno disuelto (40% de saturación). Al mantener una velocidad de agitación constante también se mejoró la producción de las lipasas pero el efecto fue menos significativo. El aumento en la oxigenación mediante una agitación elevada promueve la síntesis de la enzima, pero afecta la integridad celular por estrés mecánico.
- Se logró establecer una metodología de purificación para ambas lipasas. La cual consistió en diferentes pasos cromatográficos: a) cromatografía de intercambio aniónico sobre QAE Toyopearl, b) cromatografía de interacción hidrofóbica sobre Fenil Sefarosa CL4B y c) cromatografía de intercambio catiónico sobre CM Sefarosa

8. RECOMENDACIONES

- ▶ En el presente trabajo se encontró que no existe un efecto inductor de los sustratos lipídicos sobre la producción de las lipasas de *Candida antarctica*. Sería conveniente estudiar el efecto de diferentes fuentes de carbono principalmente carbohidratos que pudieran mejorar la producción de las lipasas.
- ▶ Estudiar el efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento y producción de las lipasas de *Candida antarctica* a nivel fermentador. Encontrar la concentración de glucosa a la cual se obtiene la velocidad máxima de crecimiento y la mayor producción de las lipasas.
- ▶ En las fermentaciones que se realizaron se observó un incremento del pH (de 6.2 a 8.5), el cual pudo afectar la integridad de las células y por lo tanto la producción de las lipasas. Sería factible estudiar el efecto del pH sobre la producción de las lipasas a nivel fermentador así como su efecto sobre la actividad catalítica de las enzimas a causa del efecto “memoria del pH” que pudiesen conservar.
- ▶ Estudiar la secreción de proteasas durante el transcurso de la fermentación, ya que estas pueden degradar a las lipasas que se están secretando al medio de cultivo. Se podría determinar si es necesaria la adición de algún inhibidor de proteasas en un momento en particular de la fermentación.
- ▶ Es necesario realizar más estudios para tratar de recuperar las lipasas que se quedan asociadas a las células. Estudiar el efecto tensoactivo del Tritón X-100 en diferentes etapas de la fermentación o bien buscar la forma más idónea de recuperar estas lipasas.
- ▶ Es necesario buscar otros métodos de purificación que permitan separar a ambas enzimas de manera diferenciada y sin pérdidas importantes de actividad. Se podría estudiar una separación por puntos isoeléctricos, mediante un Rotofor, realizar más estudios con resinas hidrofóbicas. Mejor aún, se podrían aplicar técnicas de biología molecular para expresar los genes que codifican a las dos lipasas en algún microorganismo, además de incrementar su producción se podría realizar una purificación más fácil y por separado. Existen algunas investigaciones en las que se ha realizado la expresión de los genes de estas dos lipasas en microorganismos como *E. coli*, *Picchia pastoris* y *Aspergillus oryzae* (Hoegh *et al.*, 1995; Blank *et al.*, 2006; Pfeffer *et al.*, 2006).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso F.O.M., Oliveira E.B.L., Dellamora-Ortiz G.M. and Pereira-Meirelles F.V. (2005). Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Braz. J. Chem. Eng.* 22: 9-19.
- Amanullah A., Blair R., Nienow A.W. and Thomas C.R. (1999). Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 434 – 446.
- Anderson E.M., Karin M. and Kirk O. (1998). One biocatalyst-many applications: The use of *Candida antarctica* B-Lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotrans.* 16: 181-204.
- Blank K., Morfill J., Gump H. and Gaub H.E. (2006). Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 4-10.
- Benjamin S. and Pandey A. (1998). *Candida rugosa* lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast* 14:1069-1087.
- Boekhout, T. (1995). *Pseudozyma Bandoni* emend. Boekhout, a genus for yeast-like anamorphs of ustilaginales. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 4: 359-366.
- Bornscheuer, U.T., Bessler C., Srinivas R. and Hari Krishna S. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application . *Trends Biotechnol.* 20: 433-437.
- Brush, T.S., Chapman R., Kurzman R. and Williams D.P. (1999). Purification and Characterization of Extracellular Lipases from *Ophiostoma piliferum*. *Bioor. Med. Chem.* 7: 2131-2138.
- Chen J.Y., Wen C.M. and Chen T.L. (1999). Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol. Bioengin.* 62: 311-316.
- Chopra A.K. and Chander H. (1983). Factors affecting lipase in *Syncephalastrum racemosum*.. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 163-169.
- Conesa A., Punt P.J., Van Lwijk N and Hondel C.A.M.J.J. (2001). The secretion Pathways in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genet. Biol.* 33: 155-171.
- Corzo G. and Revah S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Biores. Technol.* 70: 173-180.
- Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M. and Luyben K.C.A.M. (1998). Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 409–419.
- Dalmau E., Montesinos J.L., Lotti M. and Casas C. (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enz. Microb. Technol.* 26: 657-663.
- Domínguez A., Deive F.J., Sanromán M.A. and Longo M.A. (2003). Effect of lipids and surfactans on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78: 1166-1170.

- Domínguez de María P., Carboni-Oerlemans C., Tuin B., Bargeman G., van der Meer A. and van Gemert R. (2005). Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 37: 36–46.
- Domínguez de María P., Sánchez-Montero J., Sinisterra J.V. and Alcántara A.R. (2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24:180–196.
- Elibol M. and Ozer D. (2000). Influence of oxygen transfer on lipase production *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.* 36: 325-329.
- Fadiloglu S. and Erkmen O. (2002). Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Turkish. J. Eng. Env. Sci.* 26: 249-254.
- Fickers P., Nicaud J.M., Gaillardin C., Destain J. and Thnart P. (2004). Carbon and Nitrogen sources Modulate Lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microb.* 96: 742-749.
- Freire D.M.G., Teles E.M.F., Bon E.P.S. and Sant Anna G.L. (1997). Lipase production by *Penicillium restrictum* in a Bench-scale Fermenter. Effect of Carbon and Nitrogen Nutrition, Agitation and Aeration. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 409-421.
- Genovefa Z. Wenzig E. and Mersmann A. (1994). Improvement of Lipase Production by Addition of Catalase During Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40(5): 650-652.
- Giuseppin M.L.F. (1984). Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delemar*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 161-165.
- Gordillo A., Sanz A., Sánchez A., Valero F., Montesino J.L, Lafuente J. and Solá C. (1998). Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. *Biotechnol. Bioen.* 60: 156-168.
- Goto S., Sugiyama J. And Iizuka H. (1969). A taxonomic study of Antarctic yeasts. *Mycologia*, 61: 748-774.
- Gotor-Fernández V., Busto E. and Gotor V. (2006). *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Adv. Synth. Catal.* 348:797–812.
- Gultati R., Saxena R.K. and Gupta R. (2000). Fermentation and Downstream Processing on Lipase from *Aspergillus Terreus*. *Process Biochem.* 36: 149-155.
- Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S. (2003). Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 63-71.
- Gupta R., Gupta N. and Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbial Biotechnol.* 64: 763-781.
- Hemachander C., Bose N. and Puvanakrishnan R. (2001). Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem* 36: 629–33.
- Hoegh I., Patkar S., Halkier T. and Hansen M.T. (1995). Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Bot.* 73: S869- S875.

- Hong M.C. and Chang M.C. (1998). Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. *Biotechnol. Lett.* 20: 1027–1029.
- Houde A., Kademi A., Leblanc D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118: 155-170.
- Ionita A., Moscovici M., Dragolici A., Eremia M., Buca C., Albulescu R., Pavel I. and Vamanu M.C. (2001). Lipase production in discontinuous operation system using a *Candida lipolytica* strain. *Roum. Biotechnol. Lett.* 7: 547-552.
- Ito T., Kikuta H., Nagamori E., Honda H., Ogino H., Ishikawa H. and Kobayashi T. (2001). Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 245–50.
- Jaeger KE. and Reetz M. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16: 396-403.
- Jaeger KE., Dijkstra B.W. and Hertz, M.T. (1999). Bacterial Biocatalyst: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological Applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jaeger KE. and Eggert T. (2002) Lipases for biotechnology. *Cur. Op. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Jüsten P., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. (1996). Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.* 52: 672–684.
- Kirk O. and Christensen M.W. (2002). Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Org. Proc. Res. Dev.* 6: 446-451.
- Klibanov A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409: 241-246.
- Lee S.Y. and Rhee J.S. (1993). Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enz. Microb. Technol.* 15: 617-623.
- Lima M.G.V., Krieger N., Sarquis M.I., Mitchel A., Ramos L. and Fontana J. (2003). Production of lipase by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.* 41: 105-110.
- Lin S.F., Chiou C.M. and Tsai, Y.C. (1995). Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Lett.* 17: 959-962.
- López C, Guerra N.P. and Rúa M.L. (2000). Characterization of two isoforms from *Candida rugosa* lipase B. *Biotechnol. Lett.* 22: 1291-1294.
- Lotti M., Monticelli S., Montesinos J.L., Brocca S., Valero F. and Lafuente J. (1998). Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem Phys Lipids*, 93: 143-8.
- Makagiansar H. Y., Shamalou P. A., Thomas C. R. and Lilly M.D. (1993). The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioproc. Eng.* 9: 83–90.

- Martinelle M., Holmquist M. and Hult K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase-a and lipase-b as compared with *humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1258: 272-276.
- Mayordomo I., Rande-Gil T. and Priteo J.A. (2000). Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 105-109.
- Michiyo I. (1993). Thermally stable and positionally non-specific lipase isolated from *Candida* .(Novo Nordisk A/S). US Patent 5273898. <http://www.wikipatents.com/5273898.html>.
- Muralidhar R.V., Chirumamilla R.R., Marchant R., Ramachandran V.N., Ward O.P. and Nigam P. (2002). Understanding lipase stereoselectivity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 81-97.
- Nahas E. (1988). Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.* 134: 227-234.
- Nawani N. and Kaur J. (2000). Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol Cell Biochem.* 206:91-96.
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N. and Soccol V.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131.
- Patkar S.A., Bjorking F., Zundel M., Schlein M., Svendesen A., Heldt-Hansen H.P. and Gormsen E. (1993). Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Ind. J. Chem* 32B: 76-80.
- Pernas M.A., López C., Pastrana, L. and Rúa M.L. (2000). Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *J. Biotechnol.* 84: 163-174.
- Pfeffer J., Richter S., Nieveler J., Hansen C.E., Rhlid R.B., Schmid R.D. and Rusnak M. (2006). High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 931-938.
- Rantwijk F.V., R. Madeira L. and Sheldon R.A. (2003). Biocatalytic transformations in ionic liquids. In: *Trends in Biotechnol.* 21: 131-138.
- Raza S., Fransson L. and Hult K. (2001). Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Sci.* 10: 329-338.
- Reetz M.T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 145-150.
- Sailas B. and Pandey A. (1997). Enhancement of lipase production during repeated batch culture using immobilized *Candida rugosa*. *Process Biochem.* 32: 437-440.
- Saxena R.K., Sheoran A., Giri B. and Davidson W.S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods,* 52: 1-18.
- Saxena R.K., Ghosh P.K., Gupta R., Sheba W., Bradoo S. and Gulati R. (2006). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. <http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles18>.

- Schmid R.D. and Verger R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.
- Sharma R., Chisti Y. and Banerjee U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
- Snellman E.A., Sullivan E.R. and Colwell R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acetobacter sp.* RAG-1. *Eur. J. Biochem.* 269: 5771-5779.
- Tan T., Zhang M., Wang B., Ying C. and Deng L. (2003). Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. *Process Biochem.* 7: 459-465.
- Tan T., Zhang M., Xu J. and Zhang J. (2004). Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camemberti* Thom PG-3. *Process Biochem.* 39:1495-1502.
- Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S. and Jones T.A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2: 293-308.
- Uppenberg J., Øhrner N., Norin M., Hult K., Patkar S., Waagen, V., Anthonsen, T. and Jones T.A. (1995). Crystallographic and molecular modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochem.* 34: 16838-16851.
- Vadehra D.A. and Harmon L.G. (1969). Factors affecting production of staphylococcal lipase. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 147-150.
- Vakhlu J. and Kour A. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning . *Elec. J. Biotechnol.* 9: 69-85.
- Veeraragavan K. and Gibbs B.F. (1989). Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Lett.* 11: 345-348.
- Wei Y.J., Lee F.L., Hsu W.H., Chen S.R., Chen C.C., Wen C.Y., Lin S.J., Chu W.S., Yuan G.F. and Liou G.Y. (2005). *Pseudozyma antarctica* in Taiwan: a description based on morphological, physiological and molecular characteristics. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 223-229.

10. ANEXOS

ANEXO I

FERMENTADOR BIOFLO III

En algunos experimentos el cultivo de *Candida antarctica* se llevó a cabo en un fermentador de 5 litros de capacidad (New Brunswick Scientific Bioflo III), provisto de los elementos de control de pH, oxígeno disuelto, agitación, temperatura, suministro de nutrientes y antiespumante. En la figura 31 se ilustra la disposición de cada uno de estos elementos.

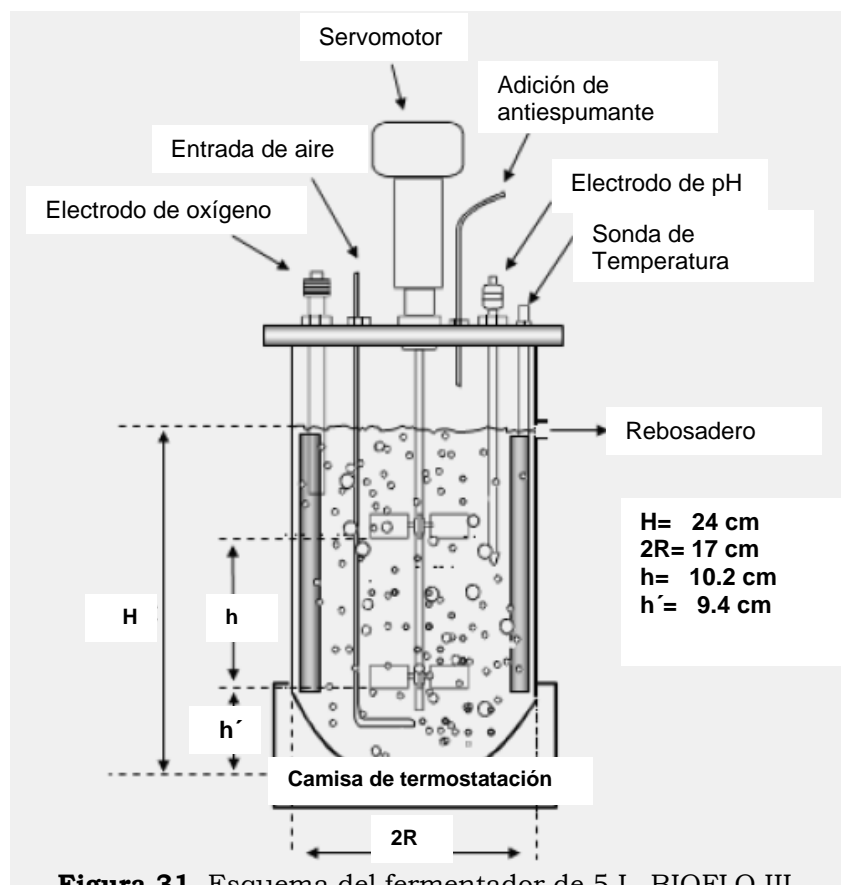


Figura 31. Esquema del fermentador de 5 L BIOFLO III.

Descripción del Biorreactor

El biorreactor consiste en un cuerpo cilíndrico de vidrio de 17 cm de diámetro interno y 24 cm de profundidad, encamisado en su parte inferior con acero inoxidable donde se aloja el

circuito de termostatación por el que circula agua de temperatura controlada. La pared de vidrio dispone en su parte superior de cuatro conexiones esterilizables de polipropileno, para permitir la adición de antiespumante o nutrientes, o bien como rebosadero para la salida de cultivo. El cuerpo cilíndrico está cerrado superiormente por un disco de acero inoxidable en el que se encuentran los orificios necesarios para la inoculación, suministro de antiespumante, adición de ácido ó base para control del pH, vaina metálica para colocar la sonda de temperatura (Pt-100), distribuidor de gas, dispositivo para la toma de muestra, condensador de humedad para el aire efluente, electrodos de oxígeno disuelto y de pH. Asimismo, se encuentran incorporados el eje del agitador y su rodamiento, montados sobre una junta estanca que garantiza el aislamiento del exterior a fin de hacer posible la esterilidad del cultivo.

Cultivos sin control de oxígeno disuelto

En estos cultivos la aireación se lleva a cabo con aire comprimido que proviene de compresora. Antes de entrar en el reactor pasa por un filtro Millipore Millex FG50 de 0,22 micras que lo esteriliza previamente para evitar contaminaciones. El burbujeador consiste en un tubo abierto de 5 mm de diámetro con una curvatura en su parte final quedando la salida de aire justo debajo de la turbina inferior. La medida del caudal de aire se realiza mediante un rotámetro OMEGA. El caudal de aire utilizado fue de 5.4 L min⁻¹ equivalente a 1.08 vvm.

Cultivos con control de oxígeno disuelto

El sistema de medida y control de oxígeno disuelto con el que está equipado el fermentador controla el nivel de oxígeno disuelto actuando sobre la velocidad de agitación. El oxígeno disuelto en el medio de cultivo se midió utilizando un electrodo polarográfico Mettler toledo InPro® 6000 Series O2 conectado a un transmisor de oxígeno disuelto Crison Mettler toledo O2 4100e, siendo la medida facilitada los porcentajes de saturación respecto al equilibrio agua-aire a la temperatura de trabajo. Para evitar problemas en las medidas, debidos al envejecimiento del electrodo, previo a la puesta en marcha del fermentador se renueva el electrolito y se comprueba el estado de la membrana, reemplazándola al aparecer algún deterioro. La calibración del electrodo se realizó al inicio de cada experimento, antes de la inoculación, siendo ya estable la temperatura de operación (30° C) y el caudal de aireación.

Agitación

La agitación es producida por un servomotor desmontable, colocado sobre el engranaje del eje del agitador en el disco de cubierta del reactor. Puede retirarse y colocarse fácilmente para las labores de lavado y esterilizado del recipiente. La velocidad de agitación puede regularse entre 25 y 1000 (± 1) rpm. Sobre el eje están fijadas dos turbinas Rushton de 6 paletas (figura 32), colocadas, la inferior a un diámetro de turbina desde el fondo del recipiente, y la superior a un diámetro y medio sobre la turbina inferior. El diámetro de las turbinas es de 6,5 cm, y las paletas tienen 1,7 cm de largo y 1,2 cm de alto. El reactor está provisto de cuatro tabiques deflectores de 20,3 x 1,6 cm separados 0,3 cm de la superficie interna.



Figura 32. Turbina Rushton de seis palas planas

Medida y control de temperatura

La temperatura a la que se realiza el cultivo puede seleccionarse en el intervalo de 4 a 80 °C ($\pm 0,1$ °C), medida en el seno del fermentador con una sonda de resistencia (Pt-100), y es controlada por un controlador PID que actúa sobre el caudal y la temperatura del agua contenida en la camisa de termostatación. El fermentador dispone de una resistencia interna que es capaz de calentar el agua que baña la camisa termostaticadora cuando la temperatura fijada para el sistema es mayor que la del cultivo. En el caso contrario, el sistema necesita de un aporte de agua de refrigeración. La presión de entrada de agua al circuito de refrigeración del fermentador se mantiene constante mediante una bomba centrífuga provista de un circuito de derivación con válvula regulable para aliviar el exceso de carga.

Medida y control de pH

La medida del pH se realiza mediante un electrodo combinado Ingold esterilizable mediante autoclave. El control, en el intervalo de 2,00 a 12,00 $\pm 0,01$) unidades de pH, se ejerce mediante un controlador PID que opera sobre dos bombas peristálticas conectadas a los orificios de adición de ácido ó base. El controlador actúa manteniendo la bomba peristáltica correspondiente funcionando una fracción del ciclo de tiempo, que es proporcional a la desviación del punto de consigna (proporcional), a su velocidad de variación en el tiempo (derivada) y a la persistencia de la desviación en el tiempo (integral). Así, la proporcionalidad del control no se ejerce variando el caudal de inyección, lo que requiere un equipo complejo, sino el porcentaje de tiempo de actuación de las bomba, con lo cual se hace posible el control con elementos de respuesta todo/nada como lo son las bombas peristálticas instaladas en el fermentador.

Detección y control de espuma

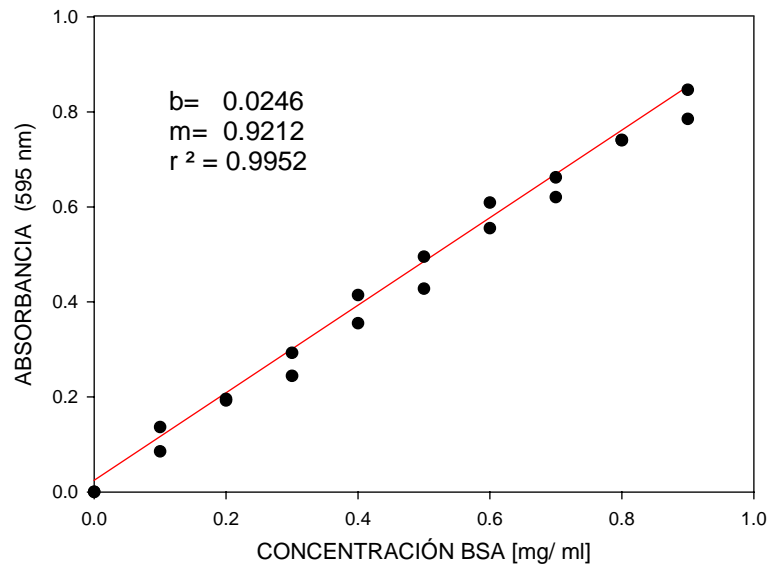
El fermentador está equipado con un detector de espuma consistente en dos bornes situados en la tapadera del fermentador y separados uno del otro. En presencia de espuma se produce contacto eléctrico entre los bornes actuando sobre una bomba peristáltica que adiciona antiespumante. El antiespumante utilizado fue polímero de silicón (antifoam A de SIGMA).

Operación del fermentador

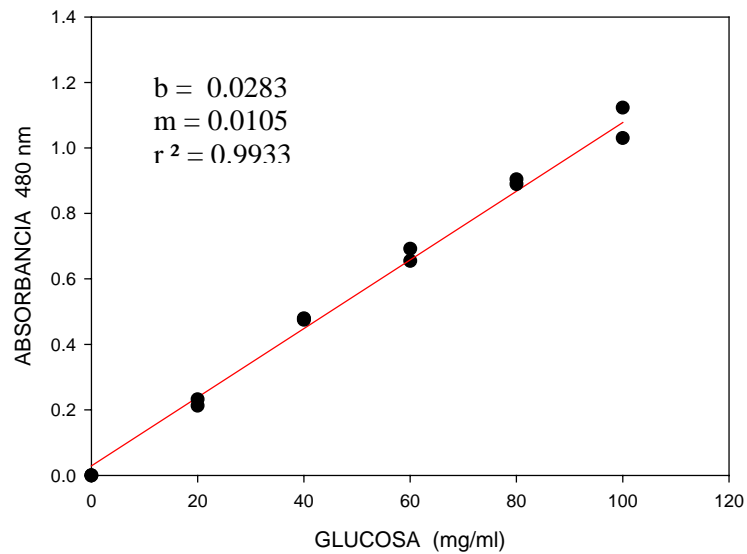
Los cultivos llevados a cabo en el fermentador se realizaron en modo discontinuo a partir de pre-cultivos con 48 horas de edad. El biorreactor en conjunto, incluido el medio de cultivo y el electrodo de oxígeno disuelto se esteriliza mediante autoclave a 121 °C durante 25 minutos. También se esterilizan las gomas de silicona, tubos de adición, filtros de aire, etc. Una vez esterilizado, todas las manipulaciones se realizan en condiciones estériles. La inoculación se realiza una vez que se ha enfriado el medio de cultivo y las condiciones están estabilizadas. El fermentador está equipado con un sistema especial de toma de muestras que evita la contaminación consistente en un tubo en U, provisto de válvula de cierre y alojamiento de rosca en el que encaja el frasco receptor y pera de goma para succionar. La toma de muestras se realizó con la ayuda de un automuestreador que permitía la recirculación del medio, el volumen de muestra fue de 25 mL.

ANEXO II

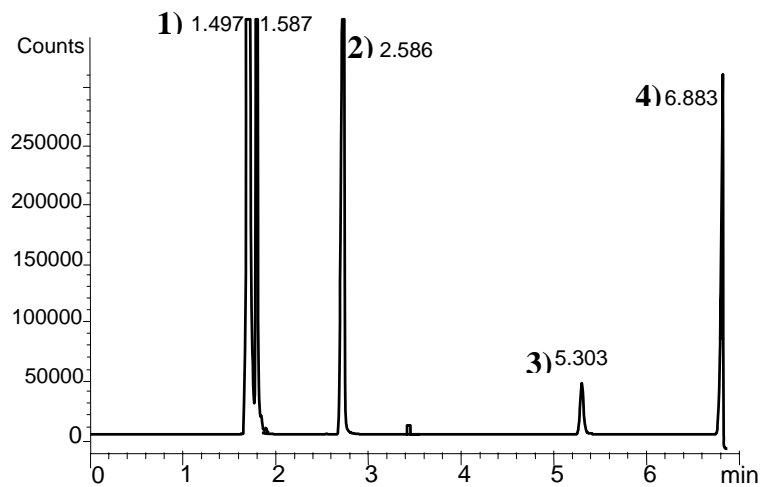
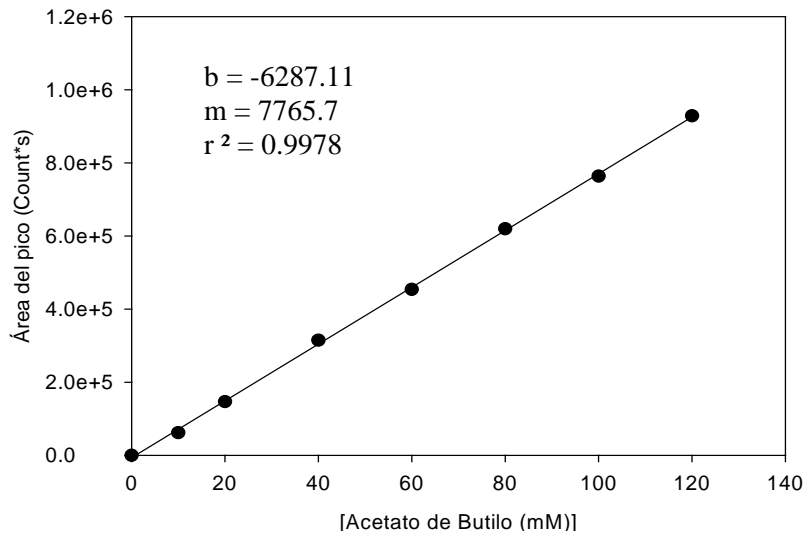
1a) Curva patrón para Proteína



1b) Curva patrón para Azúcares



1c) Curva patrón de acetato de butilo

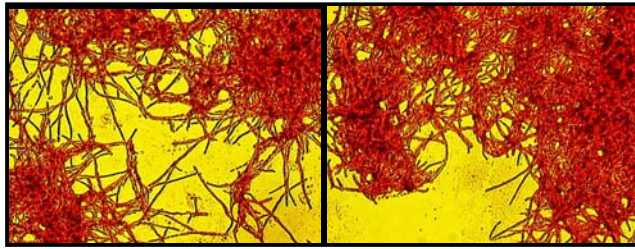


- 1) 1.497 y 1.587 min: Hexano (medio de reacción)
- 2) 2.586 min: Acetato de vinilo (uno de los sustratos)
- 3) 5.303 min: Acetato de butilo (producto formado)
- 4) 6.883 min: 1-Butanol (uno de los sustratos)

Figura 33. Cromatógrama característico de la reacción de transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol. Los picos que se observan son:

ANEXO III

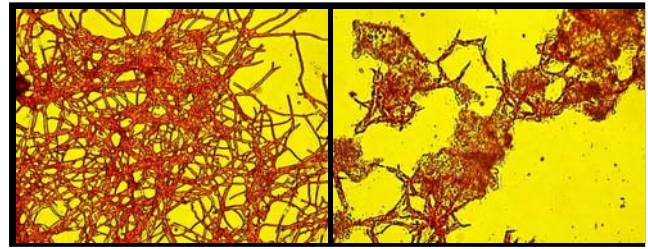
MEDIO YM



1.0% Glucosa

2.0% Glucosa

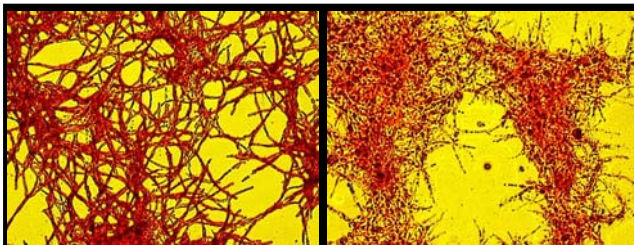
MEDIO YM (1% glucosa) más:



0.5% aceite oliva

1.0% aceite oliva

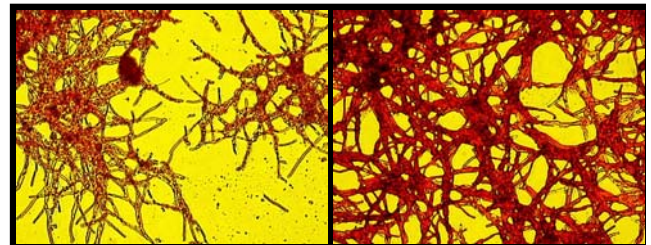
MEDIO YM (1% glucosa) más:



0.5% ácido oleico

1.0% ácido oleico

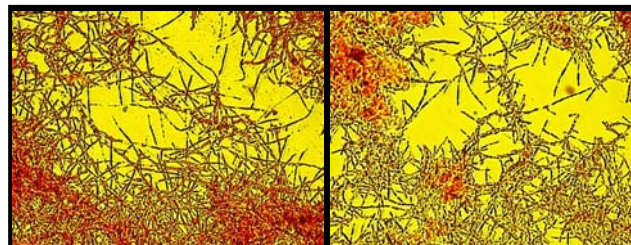
MEDIO YM (1% glucosa) más:



0.5% ácido palmítico

1.0% ácido palmítico

MEDIO YM (1% glucosa) más:



0.5% aceite de soya

1.0% aceite de soya

Figura 34. Efecto de la glucosa y de los diferentes sustratos lipídicos sobre la morfología de *Candida antarctica*. (Observaciones al microscopio 40x). Crecimiento a nivel matraz de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo a 165 rpm y 30°C durante 96 h.

La levadura siempre creció formando agregados de hifas y en algunos casos pellets (de acuerdo a lo esquematizado en la figura 21). Se observaron ligeros cambios en la morfología de las hifas dependiendo de la composición del medio de cultivo. Generalmente al utilizar más de 1% de algunos de los sustrato lipídicos se observó daño en las células y ruptura del micelio.

ANEXO IV

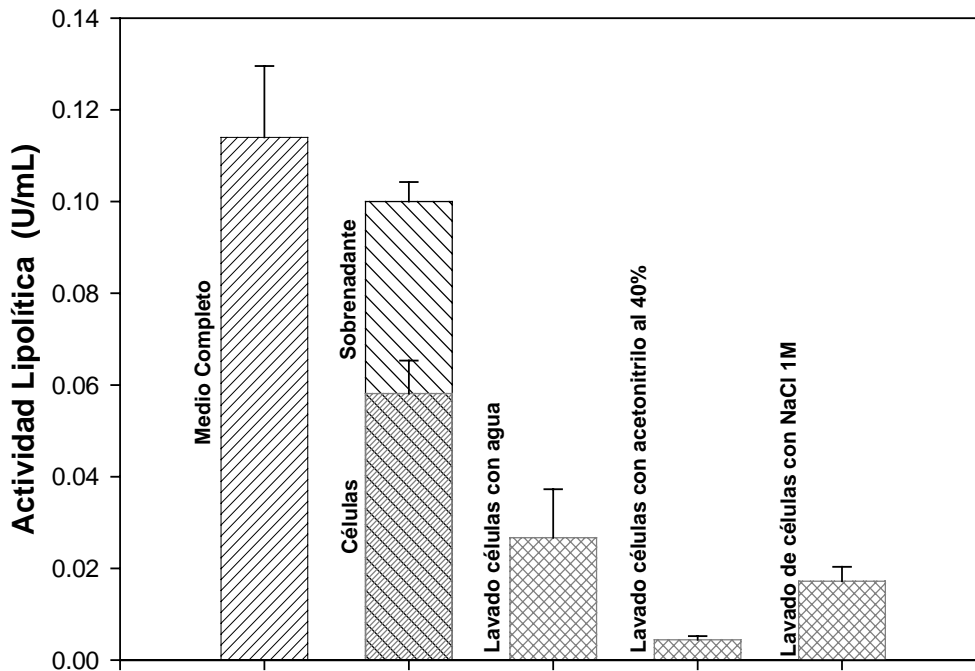


Figura 35. Recuperación de las lipasas asociadas a las células, mediante lavados con diferentes soluciones. La actividad medida es de transesterificación.

Como se puede observar alrededor de un 50% de las lipasas se queda asociada a las células. Debido a esto, se utilizaron tres soluciones (agua destilada, acetonitrilo al 40% y NaCl 1M), para recuperar las lipasas que se quedan retenidas en la biomasa y así poder incrementar la actividad lipolítica en el extracto crudo de la enzima. Se encontró que el agua destilada desionizada era la mejor solución para la recuperación de estas lipasas.

ANEXO V

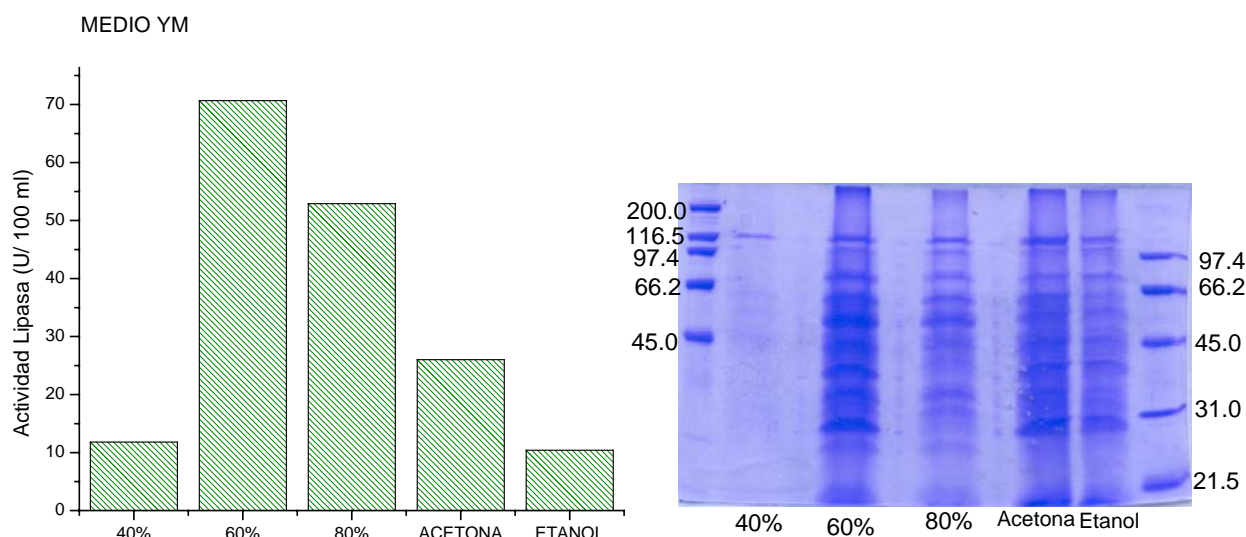


Figura 36. Purificación de las lipasas de *Candida antarctica* mediante precipitación con sulfato de amonio, acetona y etanol.

Los primeros estudios que se realizaron para la purificación de las lipasas de *Candida antarctica* fueron en volúmenes pequeños (100 mL) y utilizando precipitación con sulfato de amonio, acetona y etanol, como un posible primer paso de purificación. Bajo estas condiciones de experimentación, se obtuvo la mayor actividad lipolítica mediante una precipitación con sulfato de amonio al 60%. En la Tabla 12 se observa que se obtuvo un buen porcentaje de recuperación (72%) y un incremento en el factor de purificación de 2.9, al utilizar una precipitación con sulfato de amonio al 60%. Pero al aumentar el volumen del extracto crudo a 1000 mL, disminuyó considerablemente el porcentaje de recuperación (Tabla 13), además de que se requerían cantidades muy grandes de sulfato de amonio para la precipitación, por lo que se concluyó que este paso no era viable para la recuperación de las lipasas.

Tabla 12. Purificación de las lipasas de *Candida antarctica* mediante precipitación con sulfato de amonio al 60% .

	Volumen Total (ml)	Actividad U/ml	Actividad total (U)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	% de recuperación
Extracto crudo	80	0.0154	1.232	0.234	18.72	0.0658	1	100
Precipitación (60% sulfato de amonio)	8	0.1097	0.887	0.577	4.616	0.192	2.92	72

Tabla 13. Purificación de las lipasas de *Candida antarctica* mediante precipitación con sulfato de amonio al 60%.

	Volumen Total (ml)	Actividad U/ml	Actividad total (U)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	% de recuperación
Extracto crudo	1000	5.06	5060	0.176	176	28.75	1	100
Precipitación (60% sulfato de amonio)	35	30.31	1060.8	1.066	37.31	28.43	0.988	20.96

ANEXO VI

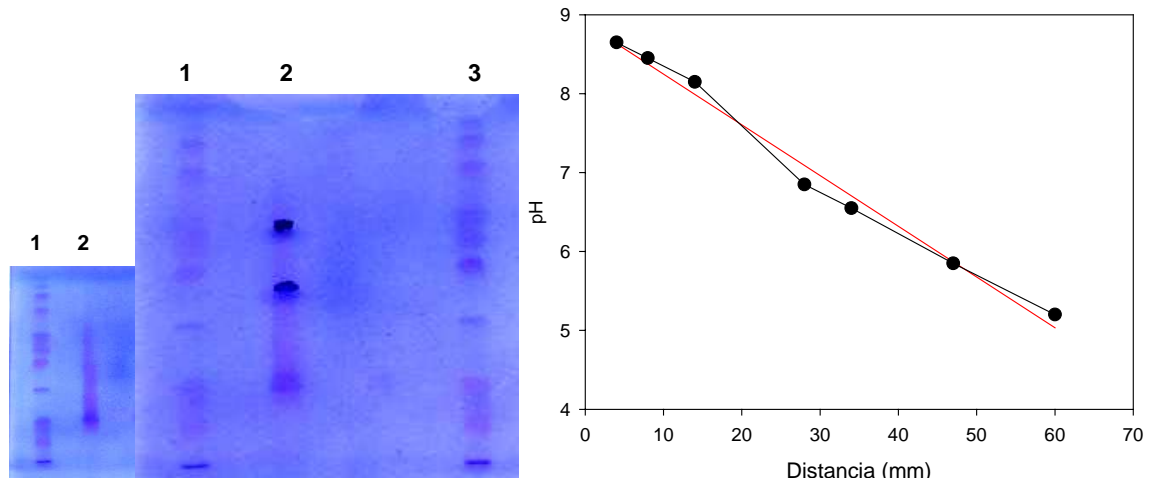


Figura 37. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. La línea 1 y 3 corresponde a los marcadores de punto isoelectrico y la línea 2 a la muestra obtenida después de realizar la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Se identificaron 2 proteínas con un punto isoelectrico de 7.16 y 6.3, respectivamente. Los reportados para las lipasas de *Candida antarctica* son 7.5 para CALA y 6.0 para CALB (Patkar *et al.*, 1993).

ANEXO VII

Purificación de las lipasas de *Candida antarctica*

Antes de determinar la metodología de purificación descrita en los resultados, se estudió otra secuencia de purificación:

Como primer paso se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico, bajo las mismas condiciones señaladas en los resultados (apartado 5.7.2). Como segundo paso de purificación, se volvió a utilizar la misma columna, pero ahora pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8.0). Las lipasas sí presentaron afinidad por la resina, se obtuvo un buen porcentaje de recuperación (45.98%) y se incrementó el factor de purificación a 24.73 (Tabla 14); pero no permitió separar a las dos lipasas. En la tercera etapa de purificación se aplicó una cromatografía de filtración en gel. Se utilizó una columna empacada con la resina Sephacryl 200-HR, pre-equilibrada con buffer Tris-HCl 5 mM (pH 8.0). De la elución de la resina se obtuvieron tres muestras. Mediante un zimograma se encontró que las tres presentaban actividad lipolítica hacia la hidrólisis de α -naftol y mediante electroforesis se observó que cada una presenta bandas con pesos moleculares muy parecidos (33 y 37 kDa) (Figura 38).

Lo anterior podría explicarse mediante el estudio reportado por Hoegh *et al.*, 1995, ya que encontraron que ambas lipasas de *Candida antarctica* son codificadas como pre-proenzimas. El tratamiento con endoglicosidasa F redujo el peso molecular de estas lipasas. La secuencia N-terminal encontrada para la lipasa A madura es precedida por 31 residuos de aminoácidos, los cuales forman un péptido señal típico de 21 residuos de aminoácidos, seguida por una prosequencia corta de 10 residuos de aminoácidos con dos residuos de arginina, precediendo al amino terminal de la lipasa madura, formando así un sitio de reconocimiento para la endopeptidasa tipo KEX2. Para la lipasa A encontraron dos sitios de N-glicosilación y al menos uno parece ser glicosilado por *Candida antarctica*. En cuanto a la lipasa B, sólo encontraron un sitio de glicosilación en su secuencia de aminoácidos. En base a esto, es posible que las lipasas purificadas y recuperadas se encuentren principalmente en sus formas glicosiladas.

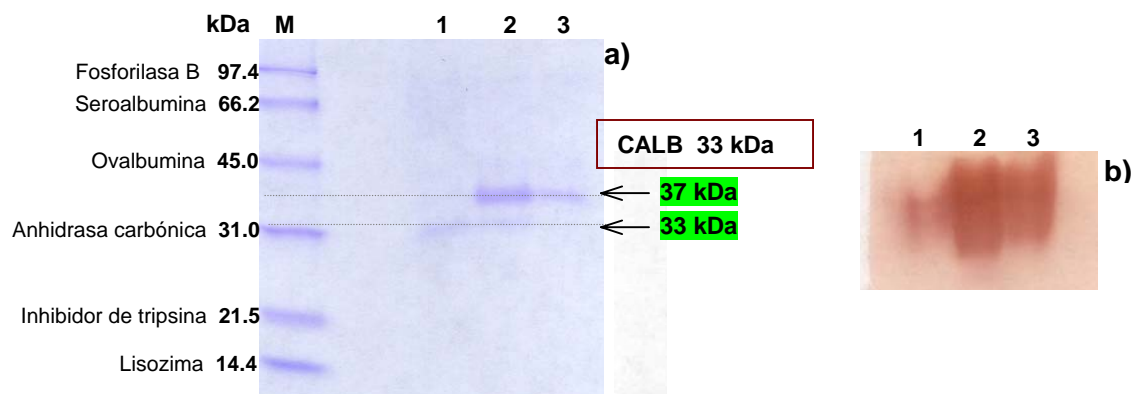


Figura 38. a) Electroforesis SDS/PAGE de las fracciones obtenidas de la filtración en gel. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular, el 1 de la fracción 1 a la 6, el 2 de la fracción 8 a la 13 y el 3 de la fracción 14 a la 21. **b)** Zimograma de las 3 muestras obtenidas de la filtración en gel, para demostrar su actividad hacia la hidrólisis de α -naftol.

Sólo se pudo recuperar y purificar la lipasa B debido a una mala elución de la resina pero el porcentaje de recuperación disminuyó considerablemente (<1 %) así como el factor de purificación (<1) (Tabla 14). Existen dos factores que pudieron causar ambos decaimientos. El primero es que no se recuperó la lipasa A y en todos los pasos de purificación anteriores se había estimado la actividad lipolítica global de las dos lipasas. En segundo lugar, mediante este tipo de cromatografía se pueden purificar proteínas, pero no permite una buena recuperación de las mismas.

Tabla 14. Purificación de las lipasas de *Candida antarctica* utilizando filtración en gel.

	Volumen Total	Actividad (U/ ml)	Actividad Total	Proteína (mg/ ml)	Proteína Total	Actividad Específica (U/ mg)	Factor Purificación	% Recuperación
Extracto crudo de la lipasa	1500	0.0798	119.70	0.1092	163.8	0.730	1	100
QAE Toyopearl (Intercambio aniónico)	1500	0.0708	106.20	0.0164	24.60	4.31	5.91	88.72
QAE Toyopearl (Intercambio aniónico, baja molaridad)	100	0.5504	55.04	0.0304	3.049	18.05	24.73	45.98
Liofilización	30	1.024	30.72	0.1091	2.727	11.25	15.41	25.66
Sephacryl 200HR (filtración en gel)								
Muestra 1	5	0.0082	0.041	0.0218	0.109	0.376	0.510	0.034
Muestra 2	5	0.0288	0.144	0.1763	0.881	0.163	0.223	0.120
Muestra 3	5	0.0376	0.188	0.1322	0.661	0.284	0.389	0.157