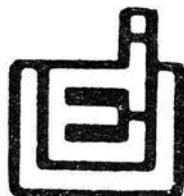




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



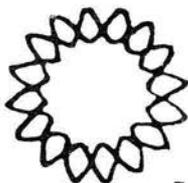
**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA**

**CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA DE
CEPAS BACTERIANAS CAPACES DE PRODUCIR
ENZIMAS LIPASA PARA LA ELABORACION
DE DETERGENTES**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ELSA MARIA TAMAYO LEGORRETA**

**DIRECTOR DE TESIS :
DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO.
DE MEXICO SEPTIEMBRE DE 1989**





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.

La degradación del hombre es la ignorancia.

AGRADECIMIENTOS.

Han sido numerosas las personas que me han prestado su invaluable ayuda sin la cuál, estoy segura, no se hubiera podido llevar a buen término éste trabajo.

Existe, de mi parte, un interés especial por brindar un sincero agradecimiento a la Dra. Gloria Soberón-Chávez, director del proyecto, por su entusiasmo y constante motivación para la realización de éste en el laboratorio a su cargo en el Departamento de Bioingeniería del Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Así mismo, deseo agradecer a la Q.F.B. Myriam Ortiz García su valiosa asesoría, y de manera muy especial a la Bióloga Rebeca Nájera Belford y a la Pasante de Biología Beatriz Palmeros Sánchez, por su amistad y apoyo incondicional y desinteresado durante el desarrollo de éste trabajo.

DEDICATORIAS.

A mi madre Carmen, por brindarme su apoyo y confianza durante todos estos años y por darme la oportunidad de vivir con la responsabilidad de ser libre en la elección de mi propio camino.

A mi hermana Carmen Noemí, uno de los regalos más preciados que la vida me ha hecho.

A mi amiga María Isabel, por conocer y aplicar el verdadero significado de la palabra amistad, por tenderme siempre la mano amiga que jala o empuja en su afán de ayuda que calma y alienta en los momentos de necesidad, que se estrecha y permanece unida a lo largo del tiempo aún en los momentos difíciles.

A mis compañeros de grupo, de cuya compañía disfrute durante varios años y a quienes llegue a apreciar como si fueran parte de mi familia, especialmente a Graciela y Rosa María.

A la persona que me ha dado su cariño desinteresadamente, a René.

A todas esas personas que como yo, enfrentan las dificultades de la vida, con la seguridad de vencerlas y triunfar en un mundo que no comprendemos y no nos comprende.

Con Amor

Elsa María.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	MATERIAL Y METODOS	23
IV.	RESULTADOS	29
V.	DISCUSION	44
VII.	APENDICE	50
VIII.	BIBLIOGRAFIA	54

RESUMEN.

El presente estudio se realizó dado el interés de obtener cepas bacterianas productoras de enzima lipasa, cuya finalidad es emplearlas en la elaboración de detergentes.

Esta enzima para detergentes (lipasa), es una de las menos estudiadas por lo que se partió desde la obtención de cepas capaces de producirla en cantidades considerables y con las características propias para elaborar un detergente; ser termoestables y activas a pH's alcalinos.

Para llevar a cabo lo anterior se realizó un screening en habitats naturales y de algunos lugares como el suelo donde se encontraran grasas acumuladas. A las cepas bacterianas obtenidas (66 cepas) se les hicieron las pruebas necesarias para eliminar aquellas que no cumplieran con los requerimientos de crecimiento necesarios y además que no fueran buenas productoras de lipasas.

Una vez seleccionadas aquellas cepas bacterianas que tuvieron una buena actividad lipolítica a pH 8.5 y a 55°C se procedió a su caracterización microbiológica la cual, se basó en ver si eran Gram (-) o Gram (+) por medio de la Tinción de Gram seguida por las pruebas bioquímicas que consistieron en el crecimiento de las cepas en medio FAM (mínimo) con 11 diferentes fuentes de carbono con el propósito de ver cuales eran los carbohidratos degradados por cada una de las cepas bacterianas; en la determinación del tiempo de duplicación de acuerdo a la velocidad de crecimiento de las cepas; así como la estabilidad

genética de cada cepa para seguir produciendo la enzima lipasa después de 90 generaciones en medio Luria y la determinación de la actividad enzimática específica por medio del método cuantitativo agar-tributirina 5% y por el método de titulación con NaOH 50 mM.

Como resultado de estos estudios se seleccionaron 3 cepas de Pseudomonas aeruginosa que producen una lipasa extracelular termoestable y activa a pH's alcalinos.

INTRODUCCION.

La biotecnología consiste en la utilización y transformación de microorganismos y células vegetales o animales para la obtención de productos benéficos para el hombre. Dentro de esta disciplina se relacionan conocimientos propios de la biología, específicamente los de microbiología, bioquímica, biología molecular e ingeniería genética, con procedimientos industriales.

La obtención de productos tan diversos sólo es posible gracias a una enorme gama de procesos, por lo que normalmente se habla de "las biotecnologías". Por ejemplo, la microbiología industrial requiere del crecimiento de microorganismos en fermentadores, dentro de un determinado medio de cultivo que posee los nutrientes necesarios y los precursores de las sustancias que se desea obtener: alcoholes, antibióticos, vitaminas, vacunas, etc. (5). Esta rama de la Biotecnología envuelve en esencia el entendimiento de 4 disciplinas: microbiología, bioquímica, química orgánica e ingeniería (Fig. 1.) (27).

Todos estos procesos de la biotecnología, aunque muy distintos en apariencia, utilizan sistemas biológicos. Es comprensible que la definición de esta área científico-tecnológica sea tan variada como los procesos a los que se refiere.

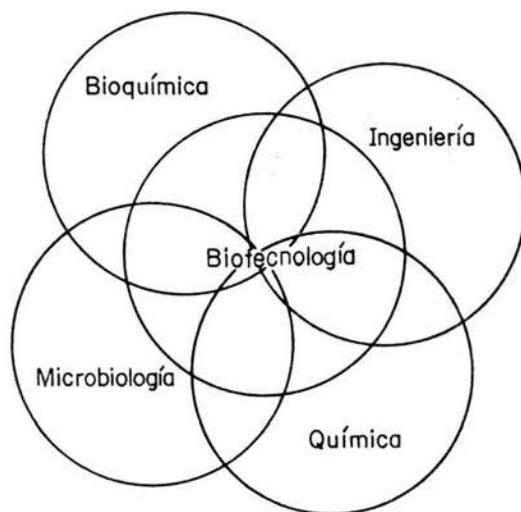


Figura 1. Disciplinas que envuelve la Microbiología Industrial.

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

Actualmente sabemos que la fermentación es un proceso de óxido-reducción, por lo cual bacterias y levaduras obtienen su energía en condiciones anaerobias. Los anaerobios facultativos aprovechan la presencia de oxígeno para oxidar los productos de la fase anaerobia. Como la respiración puede seguir de la fermentación anaerobia, el término fermentación, en un sentido más amplio, puede englobar los procesos por los cuales la materia orgánica (generalmente vegetal) es transformada en compuestos más simples bajo condiciones aerobias y anaerobias. (11).

Por otra parte, los químicos orgánicos dedicaban sus esfuerzos al estudio de los catalizadores biológicos o "fermentos" como se les llamaba entonces. J. Berzalius introdujo

la idea de catálisis en la fisiología hacia 1930. (7). En 1877, Kuhne acuñó el término enzima cuyo aislamiento durante todo el siglo XIX fué básico para el desarrollo de la bioquímica. En 1897 E. Buchner aisló la zimasas: un grupo de enzimas que llevaban a cabo la fermentación alcohólica; sólo 4 años antes, Ostwal había demostrado que las enzimas son catalizadores y E. Fischer en 1894 demostró su especificidad por el sustrato. En 1913 Michaelis y Menten desarrollaron la teoría cinética enzimática. (18).

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

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

El desarrollo de la biotecnología moderna que se dio en los 60's, impulsó el nacimiento de nuevas bioindustrias y la expansión de otras existentes, para los años 70's. (8). Además para mediados de los 80's se han establecido alrededor de 200 bioindustrias en Estados Unidos, lo cual representa un récord en el mundo.

La vía principal de comercialización de los procesos y productos biotecnológicos han sido los grandes emporios industriales capaces de financiar los proyectos y la infraestructura necesaria para cada caso. (8).

En la industria se ha empleado a los microorganismos para la generación de productos: ya sea en la forma de células completas como es en el caso de las fermentaciones alcohólicas, la producción de antibióticos, la producción de lácteos o en forma de biocatalizadores enzimáticos, detergentes con aditivos biológicos, ablandadores de carnes y varios agentes terapéuticos en donde se adicionan enzimas como papaina, tripsina, etc.

Actualmente, el interés industrial se encuentra en aquellos microorganismos y enzimas que puedan funcionar a temperaturas relativamente elevadas, microorganismos termófilos que producen enzimas termoestables. Sin embargo, estos microorganismos no siempre producen enzimas de este tipo y, a su vez, la fuente de las enzimas termoestables no siempre se encuentra en microorganismos termófilos ya que muchos mesófilos son capaces también de producir enzimas estables a temperaturas hasta de 80°C por ejemplo, las enzimas NOVO-amilasas. (2).

La posibilidad de aislar microorganismos termófilos en climas tropicales se eleva, ya que presentan un conjunto de condiciones edafológicas de humedad y climáticas, idóneas para que este tipo de microorganismos se desarrollen en forma natural.

Por otra parte, las enzimas presentan varias ventajas sobre los catalizadores químicos. Sin embargo, el uso de las

enzimas es poco habitual por su estabilidad solamente en condiciones moderadas.

La metodología enzimática para el aislamiento y selección de este tipo de microflora se le ha denominado **SCREENING** y para llevarse a cabo se requiere de la aplicación de distintos enfoques. (Fig. 2). Esta técnica del **SCREENING** se refiere a la búsqueda y aislamiento de microorganismos en este caso, bacterias, levaduras y hongos existentes en una área ecológica definida.

El principal objetivo del **SCREENING** es obtener microorganismos que en su medio ambiente natural presenten un metabolismo que genera sustancias que son de interés industrial o médico (5). Adicionalmente las operaciones importantes del Screening se esquematizan en la fig.3.

De forma general, se puede afirmar que los estudios que se han realizado a nivel internacional con respecto al screening han sido 3:

1) Los realizados por compañías industriales y universidades, quienes buscan microorganismos, principalmente para la obtención de nuevos antibióticos. Desafortunadamente sus resultados se desconocen por ser generalmente confidenciales.

2) El aislamiento de microorganismos adecuados para la producción de combustible alcohólico brasileño, en el norte del trópico de Brasil.

3) El aislamiento de microorganismos de la región del Amazonas, por un grupo de investigadores del Instituto de Cranfield, en 1986.

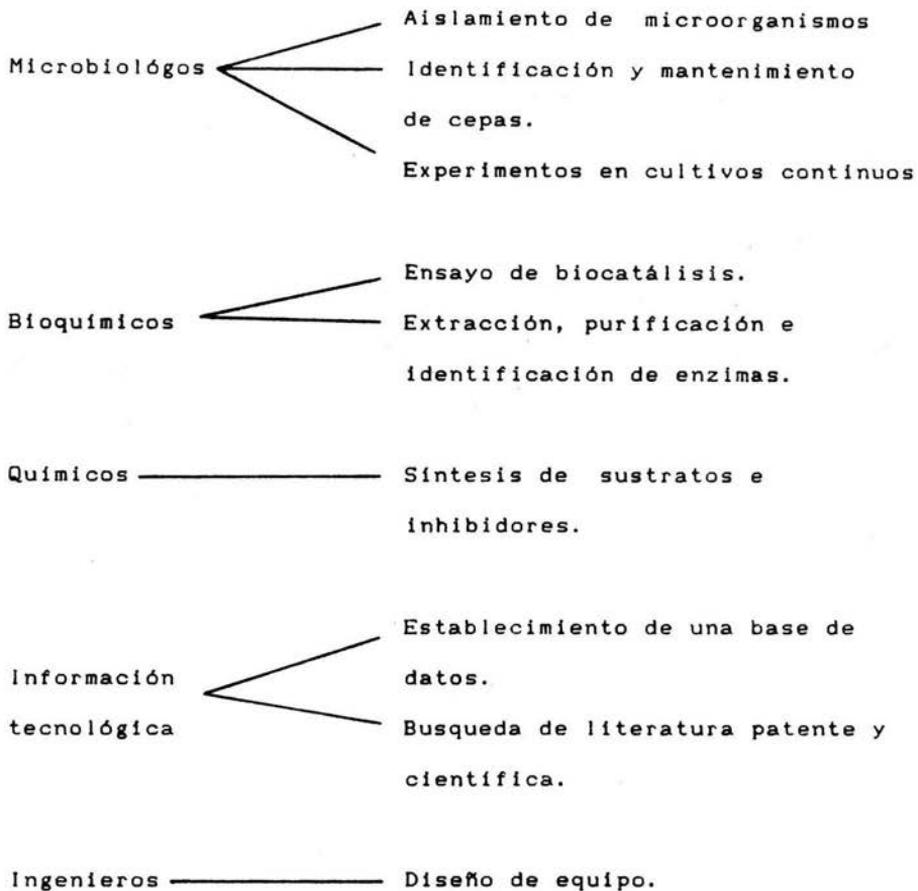


Figura 2. Diferentes contribuciones científicas para elaborar un screening. Tomado de Cheethman, P.S. 1987.(6).

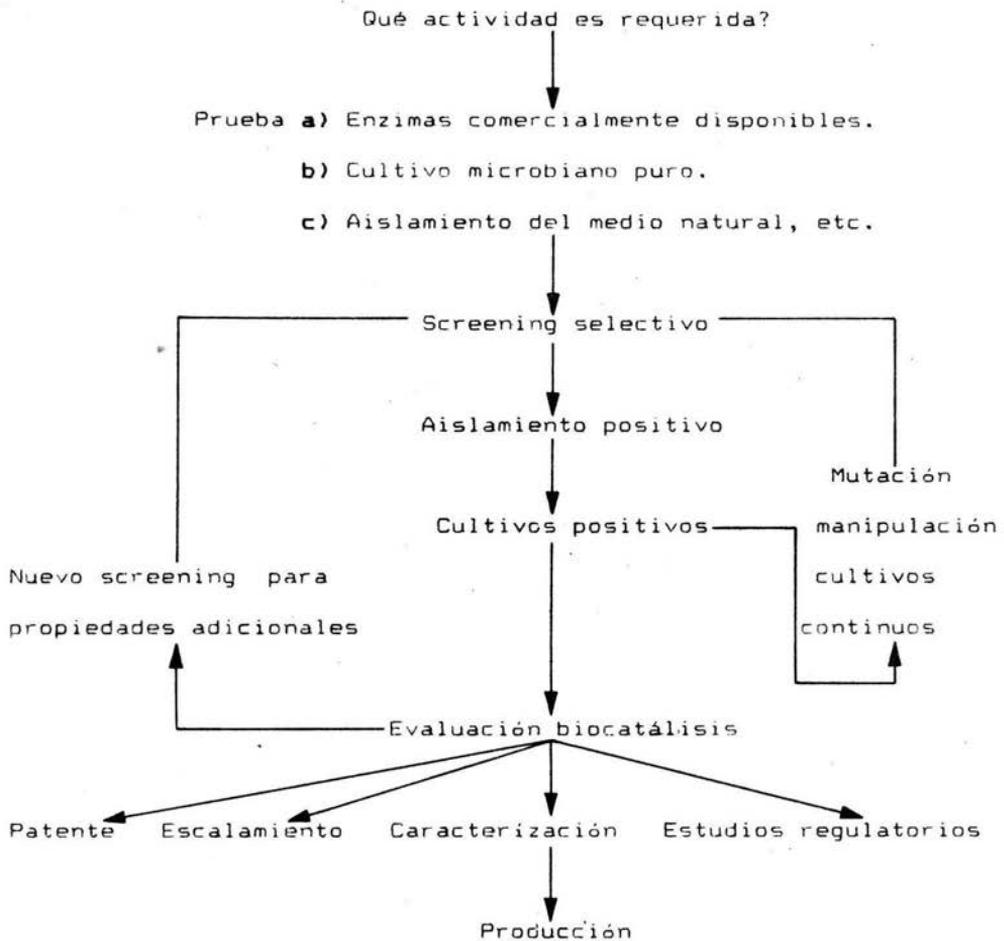


Figura 3. Diagrama de flujo de las operaciones importantes del screening. Tomado de Cheetham, P.S. 1987. (6).

ENZIMAS INDUSTRIALES

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

Analizando las enzimas por uso industrial, tabla 1, se encuentra que las enzimas que más se consumen a nivel mundial son las proteasas (59%), y de ellas el 25% corresponden a las proteasas alcalinas usadas en detergentes (19).

ENZIMAS USADAS EN DETERGENTES

El uso de enzimas en detergentes para remover restos de proteínas depositados en ropa se inició en 1913 en Alemania, cuando O. Rihm adicionó por primera vez pancreatina a formulaciones de detergentes (1), pero fue hasta los años 60's cuando con el aislamiento de una proteasa alcalina termoestable de Bacillus se inició una rápida y permanente penetración del mercado de los detergentes biológicos. (31).

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

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

TABLA 1

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

Tomado de Lopez-Munguía, A. 1985. (19).

TABLA 2

CARACTERISTICAS DE LAS PROTEASAS ALCALINAS EN DETERGENTES.

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

Rango de temperatura: 30-70 °C.

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

Por consiguiente, se ha descrito el aislamiento de algunas bacterias que presentan lipasas que pudieran utilizarse en la producción de detergentes, pero aún no han sido producidas a nivel industrial. Algunas de las cepas productoras de lipasas que pueden ser usadas en la elaboración de detergentes pertenecen al género de las Pseudomonas que incluyen a las bacterias Gram negativas de forma bacilar, aerobios estrictos y móviles, habitantes normales del suelo y agua. (13), (16).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LIPASAS

Las lipasas catalizan la hidrólisis de grasas para darnos ácidos grasos libres y glicerol (fig. 4). Estas enzimas pertenecen al género no específico de las carboxil-éster-hidrolasas (16).

Se sabe bien que la especificidad de las lipasas a un número de carbonos de ácidos grasos varía dependiendo de su origen sin embargo, Okumura et al. (23), encontró que los productos de hidrólisis de treolina difieren sustancialmente dependiendo de la fuente de lipasa. Este fenómeno particularmente es debido a que algunas lipasas cortan con mayor especificidad los ésteres en las posiciones 1 y 3, mientras que otras

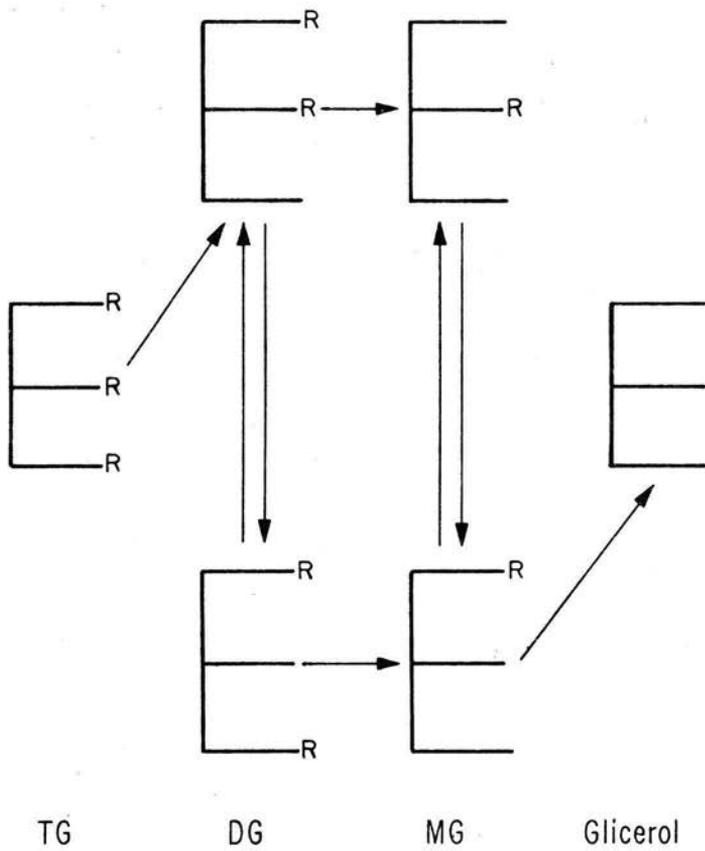


Figura 4.- Reacción catalizada por la enzima lipasa. Tomada de Gormsen, E., et al. 1988. (11).

hidrólizan cualquiera de los 3 enlaces con la misma especificidad y a la diferencia de una reacción esterifica de estas enzimas. De esta forma tenemos lipasas no específicas y lipasas 1,3 específicas. (Fig. 5).

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

- **Fuente de la enzima:** Comercialmente se obtiene de páncreas de cerdo y bovino, de Candida, Aspergillus, Rhizopus y Mucor sp.

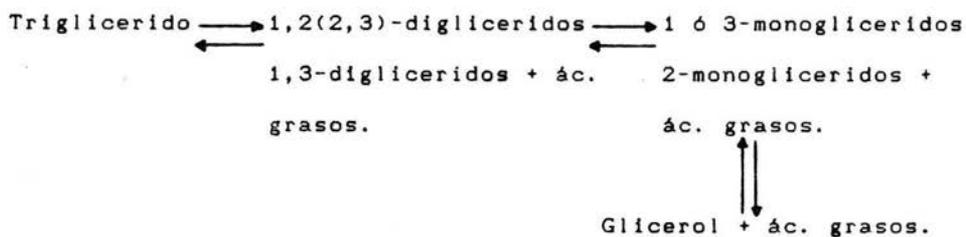
- **Método de producción:** La lipasa microbiana se obtiene en cultivo semisólido preferentemente.

- **Propiedades comerciales:**

<u>Fuente de la enzima</u>	<u>pH óptimo</u>	<u>Temp. óptima (°C)</u>
Páncreas	8.0	50
<u>Candida cylindracea</u>	7.5	50
<u>Rhizopus arrhizus</u>	7.0	40
<u>Aspergillus niger</u>	7.0	45
<u>Mucor lypolyticus</u>	7.5	50

Las lipasas están ampliamente distribuidas en todos los organismos; por consiguiente, se han aislado diversos microorganismos que producen la lipasa como Rhizopus delemar (12), Aspergillus niger (10), Candida cylindracea (30), Pseudomonas fragi (21), Alcaligenes sp. (15) y Chromobacterium viscosum (28), cuyas lipasas han sido

Lipasas no específicas:



Lipasas 1,3-específicas:

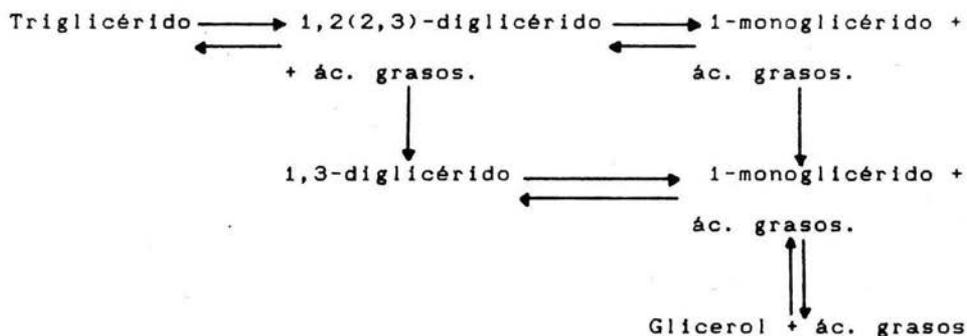


Figura 5.- Reacción enzimática de lipasas no específicas y lipasas 1,3-específicas. Tomado de Okumura, S. et al. 1976 (24).

producidas a nivel industrial. Estas lipasas se usan principalmente en procesos de alimentos y son importantes porque mejoran su sabor y aroma. Las lipasas microbianas industriales (Tabla 3) se usan para la elaboración de productos farmacéuticos o en productos de cosmetología a nivel comercial, en procesos de curtido y de producción de ácidos alifáticos (25). Estas enzimas no presentan las características requeridas para utilizarse en detergentes.

APLICACIONES DE LA ENZIMA LIPASA

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

La producción de alcoholes activos ópticamente y ésteres directamente por esterificación o transesterificación se

TABLA 3

LIPASAS MICROBIANAS COMERCIALES

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

Tomada de Seitz, W.E. 1974 (25).

identificó como una aplicación posible de lipasas en la industria farmacéutica. (17).

Con la evolución de las 2 nuevas aplicaciones en la interesterificación y esterificación la importancia de lipasas como productos industriales es probable que incremente. (17).

En la industria alimenticia, las lipasas son ahora usadas en una variedad de procesos, incluyendo la producción de saborizantes e hidrólisis de grasas. Llamada comercialmente LIPOMOD, la lipasa mezclada se desarrolla por biocatálisis y pueden usarse para la modificación y procesamiento de un espectro completo de grasa animal, incluyendo cadenas cortas y largas de ácidos grasos. Para la industria, las enzimas naturales tienen algunas ventajas significativas sobre catálisis química. Estas incluyen altas potencialidades y especificidades, las cuales detienen las reacciones laterales obteniéndose un altísimo rendimiento. (4).

Las condiciones normalmente usadas en lavanderías no aseguran que los lípidos sean efectivamente removidos por la acción de los agentes presentes en el detergente con un incremento a temperaturas bajas para lavar, en la cual la remoción de los lípidos sólidos por detergentes es menos eficiente.

Las razones y criterios que se usan para el empleo de lipasas en detergentes responde a:

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

composición de detergentes, por ser dicho compuesto un fuerte contaminante del medio ambiente;

2.- La eliminación de grasas en ropa es un problema que los detergentes comunes no tienen resuelto adecuadamente;

3.- La eliminación de grasas en ropa (ej. tintorerías) se hace utilizando solventes tóxicos y de uso restringido, con el consecuente efecto de la contaminación ambiental;

de tal manera que se puede concluir que hay necesidad y mercado para una enzima que pueda eliminar grasas de una manera eficiente y barata, además de que evite o disminuya el uso de productos contaminantes.

Se considera además, que es posible aislar una lipasa, con las siguientes características:

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

OBJETIVOS

Objetivo General:

1. Búsqueda de lipasas de origen bacteriano que puedan ser usadas en la elaboración de detergentes.

Objetivos Particulares:

- 1.1 Seleccionar 1 ó varias cepas bacterianas con actividad lipolítica termorresistentes y activas a pH's alcalinos.
- 1.2 Caracterización microbiana de las cepas.
- 1.3 Determinar la estabilidad de la capacidad de producción de lipasas por las distintas bacterias.
- 1.4 Estudio de la regulación de la actividad lipolítica por distintas fuentes de carbono.

MATERIAL Y METODOS.

a) Cepas bacterianas.

Se partió de una selección de 66 cepas bacterianas crecidas en aceite de oliva como fuente de carbono, las cuales se caracterizaron y seleccionaron las veces necesarias para eliminar aquellas cepas que no tuvieran la actividad lipolítica buscada. Las 11 cepas bacterianas cuyas características se muestran en la tabla 4, fueron con las que iniciamos el trabajo experimental, seleccionandose por su capacidad de producir extracelularmente una lipasa activa a pH 9 y a 55°C.

b) Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas se crecieron en matraces de 125 ml los cuales contenían 20 ml. de medio FAM2 (Apéndice 1) con aceite de oliva 1% como fuente de carbono, Para solidificar los medios se utilizó agar Difco 1.5%.

Las temperaturas de crecimiento fueron a 29°C ó 37°C según la cepa. Los cultivos líquidos se agitaron 24 horas a 200 rpm en baño de temperatura de agua y los cultivos sólidos se incubaron 48 horas hasta obtener colonias aisladas.

c) Obtención de la enzima.

20 ml. de medio FAM2 con aceite de oliva 1% como fuente de carbono se inoculan con 0.8 ml. de un crecimiento bacteriano de 12 hrs. de cada cepa e incubando con agitación en baño de agua por 24 horas a 200 rpm a 29°C ó 37°C.

TABLA 4

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Cepa	Temp. °C	pH	Muestra	Procedencia
3	37	7.5	LM(32)52x	Caldera CFN ¹
4	37	7.5	S. palma	BSJ ² Chiapas
5	37	7.5	Semilla 1	BSJ Chiapas
32	29	7.5	Coco	BSJ Chiapas
52	37	7.5	S. ajonjolí	BSJ Chiapas
53	37	9.5	LM(37)5c*	Caldera CFN
60	37	9.5	LM(37)5c*	Caldera CFN
61	37	9.5	LM(37)5c*	Caldera CFN
73	37	9.5	S. ajonjolí	BSJ Chiapas
80	29	9.5	Coco	BSJ Chiapas
83	29	9.5	Coco	BSJ Chiapas

(1) Centro de Fijación de Nitrógeno.

(2) Barra Sn. José, Chiapas.

(*) Es la misma cepa.

Después del tiempo indicado se centrifuga el cultivo a 3020 X g. (en un rotor JA20 para centrifuga Beckman J2-21) por 15 minutos para bajar células y obtener el sobrenadante en el cual se encuentra la enzima. Este sobrenadante es filtrado a presión a través de una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.22 μm de diámetro recibiendo el filtrado en matraces previamente estériles. Con este sobrenadante obtenido se hicieron las mediciones de actividad enzimática específica; como se muestra en resultados.

d) Crecimiento en caja con diferentes fuentes de carbono.

Se probó el crecimiento de las cepas en 11 diferentes fuentes de carbono (Glucosa, Sacarosa, Succínico, Manitol, Almidón, Lactosa, Maltosa, Citrato, Glicerol, Etanol, Fenol) con medio FAM2 a una concentración de 0.2 % (w/v) para los azúcares y 0.1 % (w/v) para alcoholes. Para ello, se prepararon soluciones stock a 100x de cada fuente de carbono, esterilizando a 15 lb. de presión por 20 minutos a excepción del etanol y fenol que por ser volátiles se agragan al momento de vaciar el medio en cajas. De cada uno de los stock se tomaron 1 ml./100 ml. de medio FAM2 previamente estéril pH 7.5 y 9.5; el cual se vació en cajas petri dejando que solidificara el medio para lo cual se utilizó agar Difco 1.5%.

Posteriormente se estriaron las 11 cepas usadas en este trabajo en cada una de las cajas con diferente fuente de carbono.

Las cajas se incubaron a 29°C ó 37°C según correspondiera a la cepa por 48 hrs. hasta obtener colonias aisladas.

e) Determinación de velocidades de crecimiento.

Se partió de un crecimiento bacteriano de 12 hrs. en Luria (Apéndice 2) pH 7.5 por cepa, el cual se incubó con agitación en baño de agua a 200 rpm a 29°C ó 37°C. Dicho crecimiento bacteriano se lavó con 5 ml. de medio FAM2 pH 7.5 sin fuente de carbono; esto es, se centrifuga la población inicial para bajar células desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en los 5 ml. de medio FAM2. Una vez lavada ésta población se inoculó 0.8 ml. de ésta en un matraz de brazo lateral el cual contenía 20 ml. de medio Luria pH 7.5 incubando en baño de agua con agitación a 200 rpm a 29°C ó 37°C de acuerdo a las condiciones de cada cepa. Previo a las lecturas se preparó un blanco.

Las lecturas de densidad óptica (D₀), se tomarón cada 2 hrs. en un espectro a 540nm. haciendo ciclos de 24 hrs.; tomando como tiempo 0 la primera lectura antes de iniciar la incubación.

f) Estabilidad de la capacidad de producir lipasa.

Se partió de un crecimiento bacteriano seriado durante 3 días diluyéndolo 1:50 cada 12 hrs. en Luria pH 7.5 por cepa. Al término de estos 3 días se hicieron una serie de diluciones (10^{-1} a 10^{-7}) en medio FAM2 sin fuente de carbono de la población obtenida hasta el tercer día; de las cuales sólo se plaquearon las diluciones 10^{-4} y 10^{-7} en cajas con Luria al mismo pH utilizando agar 1.5% para solidificar. Dichas cajas se incubaron 24 hrs. a 29°C ó 37°C, realizando posteriormente el conteo de las colonias crecidas en cada dilución probada.

De lo anterior se seleccionaron 100 colonias al azar las cuales, se picaron con palillos estériles en cajas con medio FAM2-aceite de oliva 1% pH 7.5; usando como control positivo el crecimiento de las cepas en cajas con Luria pH 7.5.

El tiempo de incubación necesario para verificar la estabilidad genética de cada cepa para producir la enzima lipasa fue siempre el mismo.

g) Pruebas de crecimiento en anaerobiosis.

Se estriaron cada una de las cepas en cajas con medio M9 (Apéndice 3) pH 7.0 con glucosa como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno nitrato o amonio agregando agar 1.5% para solidificar el medio, incubando en una jarra de anaerobiosis a 29°C ó 37°C durante 48 hrs.

h) Ensayo de la actividad lipolítica.

1) Método cualitativo agar-tributirina.

En cajas petri se midió el diámetro del halo que se forma con la hidrólisis de la tributirina. Las cajas contienen una emulsión de Tris- HCl 50 mM a pH 7, 8, 8.5, 9, más Tributirina 1% (w/v) solidificado con agar 1.5%.

Después en cada caja se hicieron pozos uniformemente con sacabocados y vacío, en los cuales se adicionaron 10µl de enzima; incubándose a 45°C y 55°C por un periodo de 24 hrs., tiempo en el cual se apreció el halo formado alrededor del pozo.

2) Método cuantitativo por titulación con NaOH 50 mM.

La actividad lipolítica se determinó como lo describe Nahas (1988), con algunas modificaciones.

El ensayo de la lipasa se realizó de la siguiente forma:

Sustrato: se uso una emulsión al 5% de tributirina (v/v) preparado en Tris-HCl 50 mM homogenizando por 20 minutos; el pH fue ajustado a 8.5 .

Solución problema: la reacción contiene 2.5 ml de sustrato, 3.5 de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, y 4 ml del sobrenadante de crecimiento, ajustando el pH a 8.5. La reacción se determinó titulando a pH 8.5 contra NaOH 50 mM después de incubar a 55°C por 30 minutos. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La actividad específica se expreso como unidades de enzima/ ml. Definiendose una unidad de enzima como la cantidad en la cual se libera un μmol de ácidos grasos libres por ml. a 55°C y a pH 8.5.

Solución control: se llevó a cabo el mismo procedimiento que en la solución problema a diferencia de que en este caso se inactivó la enzima a 100°C por 10 minutos.

1) Determinación de proteína.

La determinación de proteína se hizo de acuerdo al método empleado por Lowry et al. (1951) por una parte y por otra se siguió el método de Bradford (1976) con albúmina sérica bovina como standar en ambos casos.

La concentración de proteína se estimó a DO 595nm. para Bradford y DO 625nm. para Lowry.

RESULTADOS.

A.- Caracterización microbiana de las cepas bacterianas,

De la selección de 66 cepas bacterianas 11 de éstas presentaron la actividad lipolítica buscada la cual se determinó en primera instancia con el método de agar-tributirina descrito en Material y Métodos. Con este método se pudo observar que las cepas 80 y 83 expresan mayor actividad de enzima a pH 8.5 y a 55°C, mientras que la actividad de enzima expresada por las cepas 3, 4, 5, 32, 52 es buena, cayendo dentro del rango de las condiciones óptimas para elaborar un detergente (Tabla 5). Cabe hacer mención que según la procedencia de las 11 cepas bacterianas, 3 de éstas representan una misma por consiguiente, se redujo el número de cepas quedando sólo 9 de ellas (3, 4, 5, 32, 52, 61, 73, 80, 83).

Las pruebas microbiológicas con las que se hizo la caracterización se iniciaron con la Tinción de Gram cuya finalidad fue ver si las 9 cepas eran Gram (-) o Gram (+); resultándonos que todas las cepas fueron Gram (-) a excepción de la cepa 5 que resultó ser una mezcla tanto de bacilos Gram (-) como (+).

Posteriormente, se probó el crecimiento de las cepas en 11 fuentes de carbono diferentes como se describe en Material y Métodos. Los resultados que se obtuvieron fue que el 100 % de las cepas creció en Glucosa, Succínico, Citrato, Glicerol y Etanol. Y de esto el 33.33 % de ellas tuvo un excelente crecimiento en

Glucosa, mientras que el 55.55 % lo tuvo en Citrato, Glicerol y Etanol, y sólo, el 11.11 % en Succínico. Sin embargo, en Fenol del 88.89 % de las cepas bacterianas que no crecen sólo el 11.11% crece excelentemente. Con respecto a las restantes fuentes de carbono se puede decir que hubo un buen crecimiento de las 9 cepas en terminos globales (Tabla 6).

Posteriormente, se determinó la velocidad de crecimiento de las 9 cepas para saber cual era el tiempo de duplicación (td) de cada una de ellas en medio Luria pH 7.5. Este tiempo de duplicación fue de un rango de 1.5 a 3 hrs. (Tabla 7); Figuras (6 y 7).

La estabilidad génica de las 9 cepas para seguir produciendo la enzima después de 90 generaciones en medio Luria se verificó, con la frecuencia de aparición de las colonias incapaces de crecer en medio FAM2 con aceite de oliva como fuente de carbono de 200 colonias probadas al azar. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 8, en los que podemos observar que 2 de las 9 cepas (52, 73) fueron 100% inestables debido a que no hubo crecimiento de ninguna colonia, por lo tanto, se descartaron restando 7 cepas a las cuales se les hizo una prueba metabólica en condiciones de anaerobiosis. Los resultados que se obtuvieron se analizaron en base al siguiente criterio:

FUENTE	ANAEROBIOSIS	AEROBIOSIS
Glucosa + NH ₃	-	+ Aerobio estricto
Glucosa + NO ₃	+	+ Nitrificante

Tabla 5.- Contenido de actividad enzimática detectada en las cepas bacterianas a través de la medición del diámetro (mm) de zonas claras por la hidrólisis de la tributirina.

DIAMETRO DE ZONAS CLARAS (mm)										
Temp. °C	pH	Cepas Bacterianas								
55°C		3	4	5	32	52	61	73	80	83
	7.0	0.5	0.4	0.5	0.4	0.2	0.3	0.2	0.4	0.4
	8.0	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4
	8.5	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.5	0.5
	9.0	0.3	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4
Total x		0.37	0.35	0.32	0.37	0.3	0.27	0.27	0.42	0.42

Tabla 6.- Relación del crecimiento en 11 diferentes fuentes de carbono de 9 cepas bacterianas.

Fuente carbono	Cepas bacterianas								
	3	4	5	32	52	61	73	80	83
Glucosa	+++	++++	++++	++++*	++	+++	+++	++++	++++
Sacarosa	++	-	+++	-	+	+	++++	-	-
Succínico	++	++	++++	+	++	+++	+++	++++	++++
Manitol	++++	-	++++	++++*	+++	+++	++++	++++*	++++
Almidón	++	+++	++++	-	-	+++	+++	-	-
Lactosa	++	+	++	-	-	+	++++	-	-
Maltosa	+++	++++	++++	+	+	+++	++++	-	-
Citrato	++	+++	++++	++++	++	++	++++	++++*	++++
Glicerol	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++*	++++
Etanol	++	++++	++++	++++	+	++	++	++++*	++++
Fenol	-	++++	-	-	-	-	-	-	-

* Producción de pigmento azul-verdoso.

++++ Excelente crecimiento.

+++ Buen crecimiento.

++ Regular crecimiento.

+ Deficiente crecimiento.

- Crecimiento nulo.

Tabla 7.- Relación del tiempo que tardan las cepas bacterianas en duplicarse en medio luria pH 7.5 de acuerdo a su temperatura de crecimiento.

CEPA	FUENTE CARBONO	T°C	TIEMPO DUPLICACION (td)*/hrs.
3	Luria	37°C	2.0
4	Luria	37°C	2.0
5	Luria	37°C	1.5
32	Luria	29°C	1.5
52	Luria	37°C	1.5
61	Luria	37°C	3.0
73	Luria	37°C	1.5
80	Luria	29°C	3.01
83	Luria	29°C	3.01

* $td = \ln 2 / u^{**}$

** $u = m$

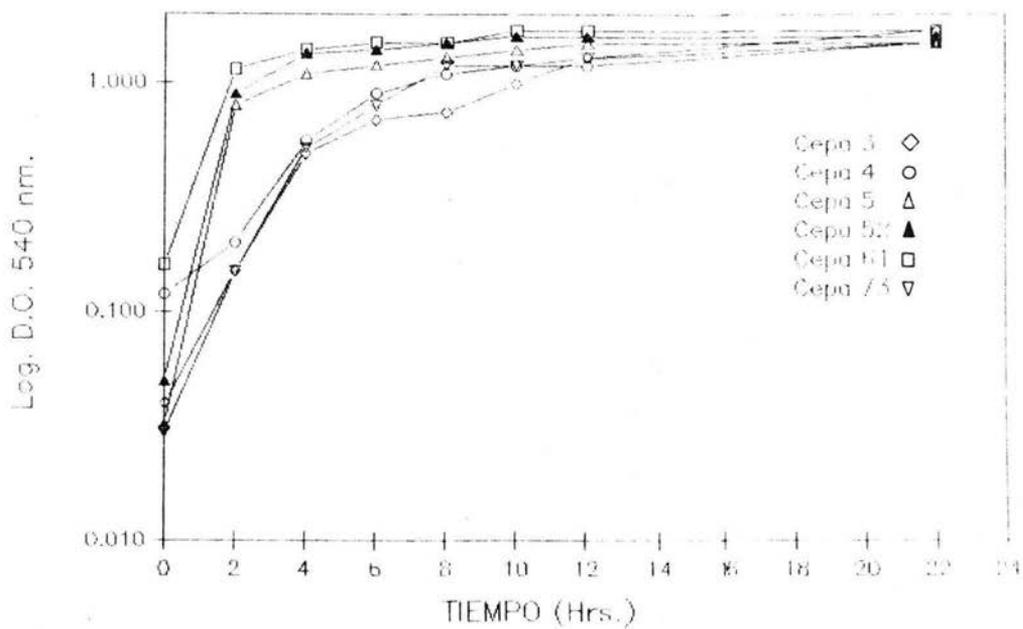


Figura 6.- Velocidad de crecimiento a 37°C, en medio luria pH 7.5. El tiempo de duplicación de cada cepa fué calculado a partir de su pendiente. (Tabla 7).

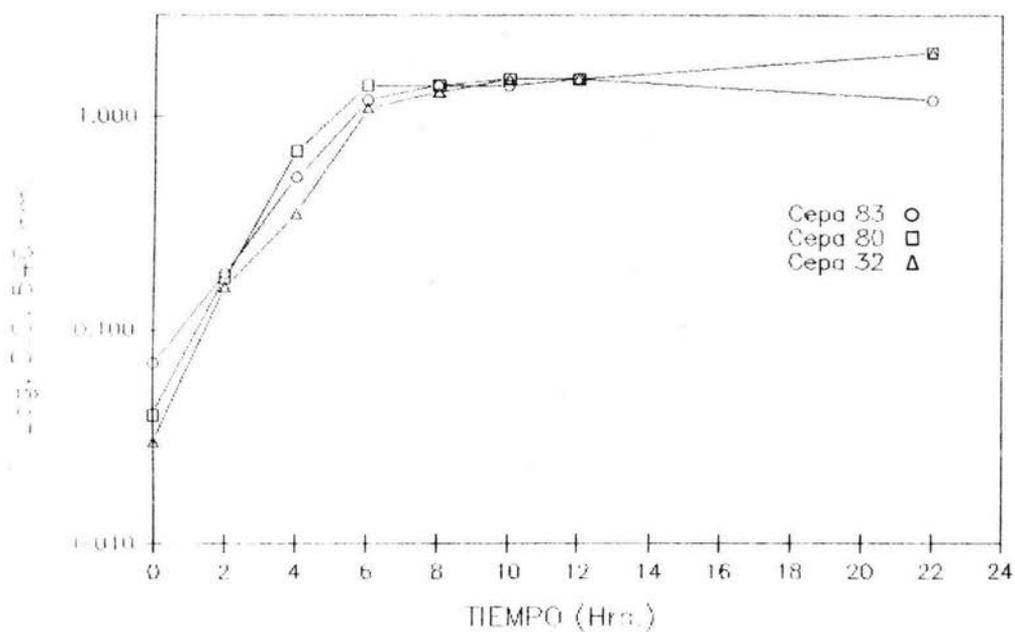


Figura 7.- Velocidad de crecimiento a 29°C, en medio luria pH 7.5. El tiempo de duplicación de cada cepa fué calculado a partir de su pendiente. (Tabla 7).

Tabla 8.- Estabilidad génica de las 9 cepas bacterianas para la producción de la enzima lipasa después de 90 generaciones en medio Luria.

CEPA	ESTABILIDAD GENETICA	
	Número de colonias crecidas	
	Aceite de olivo pH 7 (Colonias crecidas)	Luria pH7.5* (Colonias probadas)
3	200	200
4	200	200
5	200	200
32	200	200
52	0	200
61	200	200
73	0	200
80	200	200
83	200	200

* Se uso como control positivo para comparar las colonias crecidas de las probadas.

De acuerdo al criterio anterior y a los datos de la tabla 9, resulta que las cepas 32, 61, 80, 83 son microorganismos aerobios estrictos nitrificantes mientras que las cepas 3, 4, 5, son microorganismos anaerobios facultativos.

B.- Determinación de la actividad enzimática.

La determinación de la actividad enzimática por el método descrito en **Material y Metodos** se realizó sólo en aquellas cepas que presentaron una mayor actividad de la enzima de acuerdo al diámetro del halo de hidrólisis de la tributirina (Figura 8); siendo las cepas 3, 4, 5, 32, 80, 83 respectivamente. El contenido de proteína encontrada en los sobrenadantes de los cultivos de cada cepa se muestran en la Tabla 10.

La actividad enzimática específica se calculó buscando la concentración de ácido butírico a la que corresponde 1 ml de NaOH 50 mM para titular las muestras dividiendo la concentración entre los ml. del ensayo, reportando los resultados en U de enzima/ml, los cuales se muestran en la Tabla 11

De acuerdo a los datos de actividad obtenidos a pH 9.0 y a 50°C las cepas 3, 4, 5, presentan una actividad de enzima muy por debajo de la deseada, por consiguiente, las siguientes pruebas de actividad se realizaron sólo en la cepa 83 la cual resulto tener una alta actividad enzimática.

Los resultados de actividad enzimática de la cepa 83, obtenidos a pH 8.5 y a 55°C nos sugieren que hay una alta actividad de 2862.5 unidades de enzima/ml usando aceite de oliva como fuente de carbono al igual que el glicerol en donde se

TABLA 9

PRUEBA DE CRECIMIENTO EN ANAEROBIOSIS

Cepa	Anaerobiosis/glucosa-NH ₄	Anaerobiosis/glucosa-NO ₃
3*	++++	++
4*	++++	++
5*	++++	++
32**	-	++++
61**	-	++
80**	-	++++
83**	-	++++

* Anaerobio facultativo.

** Aerobio estricto nitrificante.

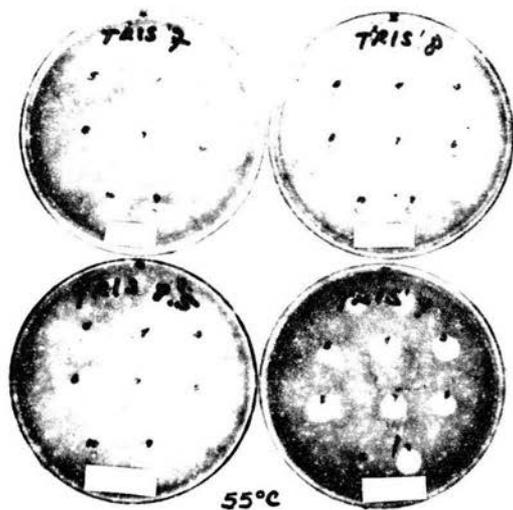


Figura 8.- Representación esquemática de la formación de halos de actividad enzimática en agar-tributirina 5 %.

Tabla 10.- Correlación de datos obtenidos por la determinación de proteína, de acuerdo con la técnica de Lowry (1951) y Bradford (1978).

FUENTE CARBONO	CONTENIDO DE PROTEINA (mg Prot./ml)					
	CEPAS BACTERIANAS					
	3	4	5	32	80	83
Aceite de Oliva	0.25	0.92	1.23	0.86	0.4	0.4*
						0.08**
Glicerol	-	-	-	-	-	0.04**

* Valor obtenido por el método de Lowry (1951).

** Valor obtenido por el método de Bradford (1978).

TABLA 11.- Contenido de actividad enzimática específica detectada en diferentes cepas bacterianas bajo diferentes condiciones.

CEPA	pH	TEMPERATURA °C	ACTIVIDAD ENZIMATICA ESPECIFICA	
			U/ml	U/mg Proteína
3	9.0	50°C	10.93	10.29
4	9.0	50°C	35.93	86.15
5	9.0	50°C	20.83	4.06
32	9.0	50°C	572.91	528.84
80	9.0	50°C	322.91	193.75
83	9.0	50°C	546.87	328.12
	8.5	55°C	2862.5	8082.35
	8.5	55°C	833.33*	454.0
	8.5	55°C	3262.82**	641.02
	8.5	55°C	3181.25***	625.0

* Crecida en Glicerol como fuente de carbono.

** Actividad determinada con tributirina 5% como sustrato y detergente 0.5%.

*** Actividad determinada con Aceite de oliva 5% como sustrato y detergente 0.5%.

obtiene una actividad de 833.33 unidades de enzima/ml. Dichos valores de actividad enzimática obtenidos de ambas fuentes de carbono comparados con los valores de la tabla 12 nos muestran que nuestras unidades de enzima están por arriba de las ahí reportadas.

Posteriormente, también se determinó la actividad de enzima en presencia de detergente comercial a una concentración de 5 mg/ml con tributirina 5% como sustrato y aceite de olivo 5% como sustrato. Los resultados que se obtuvieron fueron de 3262.82 unidades de enzima/ml para tributirina, mientras que para aceite de oliva se obtuvieron 3181.25 unidades de enzima /ml. Por lo tanto, podemos decir que al poner la enzima en presencia de detergente, éste le afecta de una forma positiva dándole una mayor capacidad a la enzima para romper grasas.

Desglosando someramente lo realizado, resulta claro que la clasificación taxonómica, hasta género y especie con ayuda del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (14), sólo fue para la cepa 83 que fue la más activa a pH's alcalinos y termorresistente siendo estas unas de las condiciones para la fabricación de detergentes.

De esta forma, se llegó hasta Pseudomonas aeruginosa, especie que ha resultado ser la más representativa del género y cuyas características más sobresalientes para poder llegar a este género fueron:

- a) Bacilos Gram (-) con flagelo polar, que no producen ni cápsula ni esporas.

- b) Aerobios estrictos y nitrificantes capaces de crecer en condiciones de laboratorio desde 4°C hasta 60°C.
- c) Presencia de un pigmento azul-verdoso llamado **piocianina** el cual fue el responsable de que los medios presentaran una coloración azulosa. Dicho pigmento es soluble en cloroformo y agua.

Cabe hacer mención que la cepa 80 tiene características muy parecidas a la cepa 83 incluyendo la producción de pigmento por lo que también se dedujo que se trata de Pseudomonas aeruginosa.

DISCUSION Y CONCLUSION.

Los resultados presentados en términos globales se circunscriben a la caracterización microbiológica de las cepas bacterianas productoras de enzima lipasa la cual, se basó principalmente en hacer una selección de 1 ó más cepas que presentaran una actividad lipolítica específica a pH's alcalinos y a temperaturas hasta de 55°C.

Esta selección se inició con 66 cepas originales a las cuales se les midió actividad enzimática a través de zonas claras por la hidrólisis de la tributirina a diferentes pH's y temperaturas, resultando que de estas 66 cepas sólo 11 de ellas fueron las que tuvieron una mayor actividad a pH's alcalinos y a altas temperaturas. Sin embargo, de acuerdo a su procedencia 3 de estas (32,80,83) son una misma cepa, por lo tanto, el presente trabajo se hizo con 9 cepas en primera instancia a las cuales se les practico la Tinción de Gram resultando Gram (-) todas a excepción de una de ellas que posteriormente fue purificada.

Una de las características más sobresaliente de estas cepas bacterianas fue la gran variedad de compuestos orgánicos que pueden utilizar como fuente de carbono y energía; esto debido a la prueba de crecimiento en 11 diferentes fuentes de carbono de las cuales, las mejores fueron Citrato, Glicerol y Etanol, mientras que la fuente de carbono que más inhibió el crecimiento fue el Fenol.

Posteriormente, se obtuvo una curva de velocidad

crecimiento para cada cepa en luria, a partir de los datos obtenidos por densidad óptica a 540 nm. Dichas curvas presentan las diferentes fases que ocurren en un cultivo con las condiciones adecuadas de temperatura, pH y concentración de nutrientes; estas fases reflejan cambios en la biomasa y en el medio ambiente. Por consiguiente, se puede apreciar que en las curvas de dicho crecimiento, éste ocurre a la máxima rapidez y finalmente cesa ya sea por carencia de algún nutriente o por la acumulación de un producto inhibitorio o algún cambio en el ambiente fisicoquímico. Durante éste crecimiento se observa una fase lineal o logarítmica la cual, se caracteriza por el hecho de que el crecimiento bacteriano mantiene un ritmo constante de reproducción, es decir, que el aumento del número de células se verifica en progresión logarítmica. El tiempo de generación o duplicación de la célula es mínimo en esta fase y depende de varios factores (especie bacteriana, medio de cultivo, temperatura, etc.). En relación con la especie bacteriana, se observa un tiempo de duplicación que va de 15 a 30 minutos para los bacilos por ej. Salmonella typhi y Escherichia coli y hasta de 1 a 3 hrs. para Pseudomonas aeruginosa y Mycobacterium tuberculosis. Respecto a la temperatura, existe una temperatura óptima para el desarrollo, por debajo o sobre la cual el tiempo de duplicación aumenta: en general es más rápido con las temperaturas superiores y más lento con las inferiores. En cuanto al medio de cultivo, éste puede influir en relación con su composición química (más o menos idónea para el desarrollo del

germen en estudio), pH, grado de aereación, etc. (25). Después de esto, aparece generalmente una fase estacionaria durante la cual la biomasa es constante; más adelante ésta disminuye como consecuencia del metabolismo de mantenimiento o autólisis.

Por consiguiente éste crecimiento microbiano se ve afectado por:

1.) **Efecto de la temperatura:** está afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada sólo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas, por ej. los organismos termófilos los cuales, presentan un rango de temperatura de 45° a 60°C teniendo por lo tanto un gran potencial de utilización pues la alta temperatura, permite una mejor transferencia de calor, velocidades de reacción mayores y menor posibilidad de contaminación.

2.) **Efecto del pH:** tiene también un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento; ya que al igual que en el punto anterior, cada especie de microorganismos presenta generalmente un máximo denominado pH óptimo. En bacterias el pH óptimo varía entre 6.0 y 8.0.

3.) **Efecto de nutrientes:** en este caso se deben tener todos los elementos necesarios para el crecimiento, pero conviene señalar que las relaciones entre ciertos elementos son de particular importancia. Así, el oxígeno merece mención especial pues su ausencia o abundancia nos permite una selección tanto de microorganismos como de productos del metabolismo. De esta forma se realizó una prueba metabólica a nuestras cepas bacterianas;

donde, cuando el cultivo se produjo en presencia de oxígeno molecular la fermentación fue aeróbica y cuando éste carece de oxígeno, anaeróbica. Sin embargo, cuando la fermentación fue anaeróbica la mayor parte del carbono se empleó como energía y sólo un 2% se asimiló como material celular (27).

Una segunda base para la selección de estas cepas fue el verificar su estabilidad génica para seguir produciendo la enzima lipasa después de 90 generaciones en medio Luria, presentando una inestabilidad genética las cepas 52 y 73 debido a que se perdió la capacidad para seguir produciendo la enzima después de las generaciones indicadas. Esto se corroboró con el nulo crecimiento de estas cepas en el medio indicado para la expresión de la enzima (FAM2 más aceite de oliva 1% pH 7.0).

Otro punto que nos interesa tocar, es el relacionado a la determinación de la actividad enzimática, la cual se determinó primeramente por el método de agar-tributirina 5% midiendo el diámetro de las zonas claras formadas alrededor de los pozos hechos en las cajas a consecuencia de la hidrólisis de la tributirina; pudiéndose observar que la mayor actividad expresada en un rango de pH's de 7.0 a 9.0 a 55°C fue en las cepas 3, 4, 5, 32, 80, 83, a las cuales, posteriormente, se les determinó la actividad por el método de titulación con NaOH 50 mM. Resultando para este caso que las cepas 3, 4, 5, presentan una actividad de enzima mucho menor que las cepas 32, 80, 83, que por cuestiones de caracteres microbiológicos se consideraron una misma especie las 2 últimas cepas y, en base a éste criterio se seleccionó a la

cepa 83 para posteriores pruebas de actividad enzimática en la cual, se obtuvieron 2862.5 U/ml. usando aceite de oliva como fuente de carbono a pH 8.5 y a 55°C, mientras que en, glicerol se obtienen 833.33 U/ml. Cabe señalar que no existe una correlación para medir la actividad enzimática entre el método cualitativo por agar-tributirina 5 % y el método cuantitativo por titulación con NaOH 50 mM. ya que, el método cualitativo muestra ciertas discrepancias al darnos una actividad enzimática que pudiera ser inespecífica por la presencia de proteasas.

Por consiguiente, si se comparáran estos resultados con los obtenidos para un cultivo batch de Pseudomonas aeruginosa (30) para la cual se reportan 1980 U/ml. con las condiciones de cultivo, pH (6.5) y temperatura (23°C) optimizados e induciendo con aceite de oliva la producción y secreción de la lipasa. Por lo tanto, se puede decir que la actividad enzimática que se obtuvo a nivel de laboratorio y sin la optimización de las condiciones de cultivo, pH y temperatura es alta, mientras que está comparada con la actividad de una lipasa comercial (LIPOLASA) altamente purificada y caracterizada para la cual se reportan 4-5000 U/mg Prot. (11), se considera aún alta la actividad de nuestra enzima ya que reportada en estas unidades se obtuvieron 8082.35 U/mg. Prot.

La actividad de enzima, al igual que el crecimiento microbiano, también se ve afectada por la temperatura siendo ésta un factor crítico que debe mantenerse sin fluctuaciones durante el periodo de incubación. Así mismo, las enzimas actúan dentro de

una gama limitada de cifras de pH, por lo cual es necesario soluciones amortiguadoras apropiadas para mantener un pH constante. Las alteraciones que se pudieran manifestar en el pH son el resultado de un cambio en la temperatura; por lo tanto los cambios de pH a cualquier lado del límite óptimo - que en este caso fue de 8.5 a 55°C -, resultan en una disminución de la actividad enzimática.

Por lo tanto, la importancia de muchas enzimas extracelulares principalmente las lipasas en el contexto de lavandería ha sido reportada y demostrada por Fujii, T. (1986). Aunque cabe mencionar, que las técnicas desarrolladas en éste estudio podrían ser aplicables no sólo a los procesos de producción de las enzimas extracelulares, sino también a varios otros procesos microbianos obteniéndose una alta producción selectiva de los metabolitos deseados.

A través de este trabajo, hemos podido establecer la metodología para determinar la actividad enzimática específica y la caracterización microbiológica de las cepas seleccionadas para ello. Obteniéndose 3 cepas de Pseudomonas aeruginosa que producen una lipasa extracelular termoestable y activa a pH's alcalinos.

La obtención de una lipasa con las características antes señaladas pudiera permitirnos utilizarla en detergentes llegando a ser una de las enzimas de mayor uso industrial a nivel mundial.

APENDICE 1

MEDIO FAM2

Sales	100 ml
Trazas	2.5 ml
Agar	1.5 gr

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

SALES

Se preparó una solución 10X.

NaNO ₃	8.5 gr
KH ₂ PO ₄	5.6 gr
Na ₂ HPO ₄	21.7 gr
K ₂ SO ₄	1.7 gr
MgSO ₄	0.37 gr
CaCl ₂	0.07 gr
EDTA + Fe ⁺⁺⁺	0.04 gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

TRAZAS

ZnSO ₄	0.232 gr
MnSO ₄	0.178 gr
H ₃ BO ₃	0.056 gr
CuSO ₄	0.1 gr
Na ₂ MoO ₄	0.039 gr
CoCl ₂	0.042 gr
KI	0.066 gr
EDTA + Fe ⁺⁺⁺	0.1 gr
FeSO ₄	0.04 gr
NiCl ₂	0.4 gr
H ₂ SO ₄ 0.1 M	8 ul

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

APENDICE 2

MEDIO LB (Luria-Bertani)

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

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

APENDICE 3

MEDIO M9

Na ₂ HPO ₄	6 gr
KH ₂ PO ₄	3 gr
NaCl	0.5 gr
NH ₄ Cl	1 gr
Agar	1.5 gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.1 N, esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión por 20 minutos y adicionar:

1 M MgSO ₄	2 ml
20% Glucosa	10 ml
1 M CaCl ₂	0.1 ml

La Glucosa puede esterilizarse separadamente por filtración.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Andree, H., Müller, R.W. and Schmid, D.R. (1980). Lipases as Detergent Components. Journal of Appl. Biochem. 2:218-229
- 2.- Ahern, T.J. and Klibanou, M. (1985). The Mechanism of Irreversible Enzyme Inactivation at 100°C. Science 228:1280- 1284.
- 3.- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitative of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- 4.- Customizing lipases for Industrial Processing. Biotechnology Bulletin vol.6 No.1. February (1987).
- 5.- Cárdenas, R. (1987). Curso de Microbiología. Folleto para la Facultad de Ciencias/U.N.A.M.
- 6.- Cheetham, P.S. (1987). Screening for Novel Biocatalysts. Enzyme Microbiol. Technol. 9 :194-213.
- 7.- Coleman, W. (1985). La Biología en el Siglo XIX. Editorial Fondo de Cultura Económica. México. pp. 219-220; 229-230.
- 8.- Douzou, P. (1986). Las Biotecnologías. Editorial Fondo de Cultura Económica. México. pp. 93-95.
- 9.- Fujii, T., Tatara, T. and Minagawa, M. (1986). Studies on Application of Lipolytic Enzyme in Detergency I. J. American Oil Chemists' Society. 63:(6):796.

- 10.- Fukumoto, J.; Iwai, M. and Tsujisaka, Y. J. Gen. Appl. Microbiol. (1963) 9:353-
- 11.- Gormsen, E., Høge-Jensen, B., Christensen, T., Boel, E. and Stentebjerg-Olesen, B. (1988). Lipolase. A Microbial Lipase for Detergents, Developed by Application of r-DNA Technique. Novo Industri A/S. BS0/A1R D-881372. (Patente. USA)
- 12.- Haehu, H. (1956). Bioquímica de las Fermentaciones. Aguilar Madrid, España. págs. 26, 28, 31, 35-37.
- 13.- Iwai, M. and Tsujisaka, Y. (1974). The Purification and the Properties of three Kinds of Lipases from Rhizopus delemere. Agr. Biol. Chem. 38:(6):1241-1247.
- 14.- Jäger, E.K. and Winkles, V.K. (1983). The Effect of Native and Modified Hyaluronate upon the Formation of Exolipase by Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett. 19:(1):59-63.
- 15.- Krieg, R.N. and Holt, G.J. (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1, Williams & Williams. U.S.A. pp. 140-199.
- 16.- Kokusho, Y.; Machida, H. and Iwasaki, S. (1982). Studies on Alkaline Lipase: Isolation and Identification of Lipase Producing Microorganisms. Agr. Biol. Chem. 46:(5):1159-1164.
- 17.- Kugimiga, W.; Otani, Y.H. and Takagi, Y. (1986). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Lipase Gene from Pseudomonas fragi. Biochem. Biophys. Res. Commun. 141:(1):185-190.

- 18.- Lazar, G. (1985). Estersynthesen Mit Lipasen. Fette Seifen Anstrichm. 87:(10):394-400.
- 19.- Lehninger, A. (1985). Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España. pp. 1075.
- 20.- López-Munguía, A. (1985). En Prospectiva de la Biotecnología en México, Fundación Javier Barros Sierra/CONACYT. México.
- 21.- Lowry, O.H. (1951). Protein Measurement with the Folin Physiol Reagent. Journal Biol. Chem. 193:265.
- 22.- Lu, J.Y.; Liska, J.B. (1969). Lipase from Pseudomonas fragi. II Properties of the Enzyme. Appl. Microbiol. 18:(1):108-113.
- 23.- Nahas, E. (1988). Control of Lipase Production by Rhizopus oligosporus Under Various Growth Conditions. Journal of General Microbiol. 134:227-233.
- 24.- Okumura, S.; Iwai, M. and Tsujisaka, Y. (1976). Positional Specificities of Four Kinds of Microbial Lipases. Agr. Biol. Chem. 40:(4):655-660.
- 25.- Portoles, A.A. (1959). La Célula Bacteriana. Editorial Aguilar. Madrid. pp. 279-289.
- 26.- Seitz, W.E. (1974). Industrial Applications of Microbial Lipases: A Review. J. American Oil Chemists' Society. 51:1216.
- 27.- Quintero, R.R. (1981). Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicación. Editorial Alhambra. México. pp. 27-37.

- 28.- Sikita, B. (1983). Methods in Industrial Microbiology. Ellis Horwood Limited. pp. 13-14.
- 29.- Sugiura, M. and Isobe, M. (1974). Studies on the Lipase of Chromobacterium viscosum. Biochim. Biophys. Acta. 341:195-200.
- 30.- Suzuki, T., Mushiga, Y., Yamane, T. and Shimizu, S. (1988). Mass Production of Lipase by Fed-batch Culture of Pseudomonas fluorescens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:417-422.
- 31.- Tomisuka, N.; Ota, Y. and Yamada, K. (1966). Studies on Lipase from Candida cylindracea. Agr. Biol. Chem. 30:(6):576-584.
- 32.- Winkhans, H.D. The Detergent and Cleanser Market in Europe. Chimica oggi. Octobre 1987. pp. 41-46.