



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO
PARA LA OBTENCIÓN DE LIPASA DE
Bacillus pumilus GMA1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

AIDEÉ PAOLA IBÁÑEZ GARCÍA



MÉXICO DF. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesora: Rosa María Ramírez Gama

VOCAL Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero

SECRETARIA Profesora: Amelia Farrés González-Saravia

1er SUPLENTE Profesor: Agustín Reyo Herrera

2º SUPLENTE Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa

Este trabajo se realizó en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E. Facultad de Química. UNAM.

Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Asesora del Tema

M. en C. Carolina Peña Montes
Supervisora Técnica

Aideé Paola Ibáñez García
Sustentante

Dedicado....

A Dios por darme la vida y su infinito amor.

A mis padres Amelia y Oscar, por el gran esfuerzo que hacen para brindarme lo mejor, por sus consejos y apoyo en los momentos más difíciles. Por todas sus enseñanzas y sobre todo por todo su amor. Este logro es de ustedes.

Los quiero mucho...!

A todos mis hermanos, por apoyarme, creer en mí y brindarme su cariño. Los quiero mucho.

Agradecimientos...

A mi amada UNAM, por darme una formación académica y personal de las mejores que se pueden recibir en el mundo. (Realmente de las 100 mejores del mundo...!)

A la Dra. Amelia Farrés, por permitirme realizar esta tesis, por su apoyo, comprensión, consejos y tanta paciencia.

A Idalia por su apoyo técnico y por enseñarme muchas cosas, y sobre todo por su amistad

A la M. en C Rebeca Ramírez Carrillo por su ayuda con los diseños experimentales, tratamiento estadístico de datos, y por brindarme siempre un ratito de su tiempo.

A Caro y Dénis por ser como mis hermanas mayores en esta tesis, por sus consejos, compartir su experiencia en el tema y por su amistad

Y por supuesto...

A Dios, por su infinito amor

A mi amada UNAM, por darme una formación académica y personal de las mejores que se pueden recibir en el mundo. (Realmente de las 100 mejores del mundo...!)

A mi hermana Yaz, aunque este en la tierra de las salchichas y cervezas sé que no me olvida. -Gracias por darme todo tu apoyo y comprensión, y por ser tu consentida-

A mi hermano Gabriel que probablemente se encuentra en la “hora del té” allá en Bristol, por sus sabios consejos y apoyo incondicional

A mi hermano Adrián por apoyarme en todo momento y también por ser su “conse”. A mi nueva hermana quien pronto será mamá: Erika por su cariño y apoyo.

A mi deporte favorito, el Judo, por dejarme no sólo varios dedos rotos y esguinces, sino una gran satisfacción, enseñanza y formación de carácter; y claro a todos los que “hacen el Judo”; Yeri, Ulises, Arturo, Lalo, Toño, Roxy, Licha, Kike, Silvia, Bollo, Los Marcos, Elisa, Mi retoño, Eric, Ana y claro a mi profe Hilario por que sin ustedes hubiese enloquecido en la carrera, por tantos ratos divertidos, viajes, competencias, goyas y sobre todo por su amistad.

A mis amigos de la Fac: Las Teres, Andy, Nakis, Fernando, Mago, Chispis, Sandra, Caludia, Chivis, Sonia, Alejandro, Juan Carlos, Rubén, Carmen, Güémez, Omar, y perdón por los que omita

A mi clan de Viborildas: “La sra.”. Dari, Almuchis, Mit y Katy

A mis compañeros del 312, por su apoyo y amistad: Norma, Gaby, Roberto, Paloma, Paty, Mirna, Bere, Abraham, Isa Carmen, Denis, Caro, y claro a mis súper-amiguís: Bele, Isra y Katy (again)

A toda mi familia, mis tíos, tías, primos (sí Ale, aquí vas) y sobrinitos por apoyarme y creer en mi.

A Marco, por revisar tantos puntos y comas, por tu paciencia, tu compu., tu tiempo y sobretodo por tu amor.

.



Contenido

Abreviaturas	9
Índice de tablas y figuras	10
1 Resumen	13
2 Introducción	15
3. Marco Teórico	17
3.1 El género <i>Bacillus</i>	17
3.1.1 Características del género <i>Bacillus</i>	17
3.1.2 Clasificación taxonómica de <i>Bacillus. pumilus</i>	17
3.1.3 Antecedentes del microorganismo.....	18
3.2 Lipasas.....	19
3.2.1 Características generales.....	19
3.2.2 Estructura.....	20
3.2.3 Clasificación.....	21
3.2.4 Determinación de actividad lipolítica.....	24
3.2.5 Fuentes de obtención de lipasas.....	26
3.2.6 Aplicación industrial e importancia económica.....	28
3.3 Factores que afectan la producción de enzimas.....	31
3.3.1 Fuentes de carbono y lípidos.....	31
3.3.2 Fuentes de nitrógeno.....	33
3.4 Regulación genética.....	34
3.4.1 Modelo del operón.....	35
3.4.2 Enzimas bacterianas, constitutivas e inducidas.....	36
3.4.3 Represión enzimática.....	36
3.4.4 Represión catabólica (represión por glucosa).....	37
3.5 Diseño estadístico de experimentos.....	37
3.5.1 Generalidades.....	37
3.5.2 Diseño factorial fraccionado a 2 niveles.....	37



3.5.3 Box-Wilson.....	38
4. Objetivos.....	39
5.-Material y Métodos.....	40
5.1 Reactivos.....	40
5.2 Generalidades de los experimentos.....	41
5.2.1 El microorganismo y su conservación.....	41
5.2.2 Morfología del microorganismo.....	41
5.2.3 Pruebas bioquímicas.....	42
5.2.4 Confirmación de actividad lipolítica.....	42
5.2.5 Preparación de inóculo.....	42
5.2.6 Determinación del crecimiento.....	43
5.2.7 Determinación del pH.....	43
5.2.8 Determinación de proteína.....	43
5.2.9 Estandarización del método de cuantificación de actividad lipolítica.....	44
5.3 Etapa I: optimización del medio de cultivo “uno a la vez”.....	45
5.3.1 Generalidades de experimentos.....	46
5.3.2 Efecto del aceite de olivo.....	46
5.3.3 Efecto de la agitación.....	46
5.3.4 Formulación de un medio similar a BHI.....	47
5.3.5 Efecto de la glucosa.....	47
5.3.6 Efecto de fuentes de carbono.....	47
5.3.7 Efecto de fuentes de nitrógeno.....	48
5.4 Etapa II concentraciones de fuentes de carbono y aceite de olivo.....	49
5.4.1 Generalidades.....	49
5.4.2 Niveles de aceite de olivo.....	50
5.4.3 Niveles de concentración de las fuentes de carbono.....	50
5.5 Etapa III: Diseño estadístico de experimentos.....	50
5.5.1 Diseño factorial fraccionado a 2 niveles 2^{7-4}	50
5.6 Electroforesis.....	51
5.6.1 Geles TSDS – PAGE.....	51
5.6.2 Precipitación de proteínas con TCA	52



5.6.3 Tratamiento con DTT.....	52
5.6.4 Actividad <i>in situ</i> (zimogramas).....	52
6.-Resultados y Discusión.....	54
6.1 Verificación de actividad lipolítica y caracterización morfológica de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	54
6.2 Pruebas bioquímicas.....	55
6.3 Estandarización del método de cuantificación de actividad lipolítica.....	57
6.4 Crecimiento del microorganismo.....	57
6.5 Etapa I exploración de componentes en el medio “uno a la vez”.....	57
6.5.1 Efecto de presencia de aceite de olivo.....	57
6.5.2 Efecto de la agitación.....	59
6.5.3 Medio formulado.....	60
6.5.4 Efecto de glucosa.....	61
6.5.5 Efecto de fuentes de carbono.....	64
6.5.6 Efecto de fuentes de nitrógeno.....	66
6.6 Etapa II variación de concentraciones.....	67
6.6.1 Efecto de la concentración de aceite de olivo.....	67
6.6.2 Niveles de fuentes de carbono.....	70
6.7 Etapa III Diseño estadístico.....	72
6.7.1 Diseño factorial fraccionado 2^{7-4}	72
6.7.2 Diseño estadístico Box Wilson.....	74
6.8 Perfil de proteínas y actividad <i>in situ</i> (identificación de la proteína de interés).....	75
6.8.1 Perfil de proteínas en T-PAGE, T-SDS-PAGE.....	76
6.8.2 Actividad <i>in situ</i> (zimogramas).....	76
7 Conclusiones.....	79
8 Perspectivas.....	81
Apéndice I.....	82
Apéndice II.....	83
Bibliografía.....	84



Abreviaturas

ABS	Albúmina Bovina Sérica
BHI	Infusión Cerebro Corazón
Da	Daltones
DO	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitól
G	Gramos
H	Horas
kDa	Kilodaltones
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
N-	Amino
<i>p</i> -NF	Paranitrofenol
<i>p</i> -NFA	Paranitrofenil-acetato
<i>p</i> -NFL	Paranitrofenil-Laurato
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PM	Peso Molecular
Rpm	Revoluciones por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TCA	Ácido Tricloro Acético
TSDS	Tris-Tricina- SDS
T-PAGE	Tris-Tricina-PAGE
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
λ	Longitud de Onda
μ L	Microlitros



Índice de Tablas y Figuras

Tabla 3.1 Clasificación de <i>Bacillus pumilus</i> de acuerdo al ICNB.....	8
Tabla 3.2 Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 según Bustos 1995.....	9
Tabla 3.3 Ensayos espectrofotométricos más utilizados en la cuantificación de actividad lipolítica.....	26
Tabla 3.4 Microorganismos productores de lipasas.....	27
Tabla 3.5 Aplicación industrial de lipasas.....	28
Tabla 3.7 Efectores probados en la producción de lipasas del género <i>Bacillus</i>	34
Figura 3.8: Modelo del Operón, Jacob y Monod.....	36
Figura 5.1: Estrategia seguida para llegar a la optimización del medio de cultivo para la obtención de lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	44
Tabla 5.2. Variables consideradas en la estandarización del método para cuantificación de la actividad lipolítica.....	45
Tabla 5.3 Composición del medio formulado y BHI Difco.....	47
Tabla 5.4. Fuentes de carbono utilizadas en la optimización del medio de cultivo.....	48
Tabla 5.5. Fuentes de nitrógeno utilizadas.....	49
Tabla 5.6. Diseño factorial fraccionado 2^{7-4}	50
Tabla 5.7. Detalles del diseño factorial fraccionado 2^{7-4}	51
Tabla 5.8 Composición de geles TSDS-PAGE.....	54
Figura 6.1 Halo translúcido alrededor de las colonias indicador de actividad lipolítica; 24 horas. Cultivado a 37°C.....	54
Tabla 6.2 Características de las colonias de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en medio sólido, agar con tributirina al 0.5%.....	55
Tabla 6.3 Pruebas bioquímicas realizadas a <i>Bacillus. pumilus</i> GMA1 Con el Kit API/CHB/E.....	55
Tabla 6.4 Solubilidad y estabilidad de diferentes <i>p</i> -Nitrofenil ésteres en concentración 5mM.....	56



Figura 6.5 Curva de crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en medio BHI, condiciones estáticas a 50°C.....	57
Figura 6.6 Curva de crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 y cambio de pH de en medio BHI y BHI adicionado con 1% de Aceite de olivo en función del tiempo.	58
Figura 6.7 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica en los, medios BHI y BHI adicionado con 1% de Aceite de olivo cultivado a 50°C en función del tiempo.....	59
Figura 6.8 Curva de crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 y cambio de pH de en medio BHI, con y sin agitación, en función del tiempo.....	59
Figura 6.9 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica en los medios BHI y BHI adicionado con 1% de aceite de olivo.....	60
Figura 6.10 Curva de crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 y cambio de pH en medio BHI y medio Formulado en función del tiempo.....	60
Figura 6.11 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica en los medios BHI y formulado en función del tiempo.....	61
Figura 6.12 Curva de crecimiento, efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre crecimiento en función del tiempo.....	62
Figura 6.13 Efecto de glucosa en diferentes concentraciones respecto al pH en función del tiempo.....	62
Figura 6.14 Proteína soluble y actividad lipolítica en medio formulado con diferentes concentraciones de glucosa en función del tiempo.....	63
Tabla 6.15. Actividad lipolítica en diferentes concentraciones de glucosa en función del tiempo....	64
Figura 6.16 Crecimiento de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 con diferentes fuentes de carbono en función del tiempo.....	64
Figura 6.17 Proteína soluble producida por <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en presencia de fuentes de carbono en función del tiempo.....	65
Figura 6.18 Actividad lipolítica con las diferentes fuentes de carbono en función del tiempo.....	65
Figura 6.19 Curva de crecimiento en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno nitrógeno.....	66
Figura 6.20 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno respecto al cambio de pH en función del tiempo.	67
Figura 6.21 Proteína soluble producida por <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en presencia de fuentes de nitrógeno en función del tiempo	67
Figura 6.22 Actividad lipolítica en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno en función del tiempo.....	67
Figura 6.23 Curva de crecimiento y cambio de pH en el medio de cultivo de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en presencia de diferentes concentraciones de aceite de olivo en función del tiempo.....	69
Figura 6.24 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 en presencia de diferentes concentraciones de aceite de olivo en función del tiempo.....	69
Figura 6.25 Actividad lipolítica máxima de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 a las 24 h en presencia de las	



4 mejores fuentes de carbono.....	70
Figura 6.26 Actividad lipolítica máxima de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 a las 24h de cultivo en 8 corridas del diseño factorial fraccionado 2^{7-4}	71
Tabla 6.27 Actividad lipolítica (Y) determinada después de 24h de cultivo y coeficientes de contraste (b) para cada componente.....	71
Figura 6.28 Ensayo de actividad lipolítica con α -Naftil Acetato como sustrato en las 8 corridas (medios) del diseño factorial 2^{7-4}	71
Figura 6.29 Actividad lipolítica a las 24 h de cultivo en 5 corridas del diseño Box-Wilson comparados con el medio BHI Difco.....	73
Tabla 6.30 Composición de los 5 medios propuestos según el diseño Box-Wilson.....	73
Figura 6.31 Ensayo de actividad lipolítica con α -Naftil Acetato como sustrato en los 5 medios propuestos como óptimos.....	73
Figura 6.32 Comparación de actividad lipolítica máxima de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 contra lipasa comercial inmovilizada de <i>Candida antarctica</i>	75
Figura 6.33 Perfil de proteínas en gel TSDS-PAGE, al 15%, teñido con azul de coomassie.....	77
Figura 6.34 Perfil de proteínas TSDS-PAGE 15%, Teñido con azul de coomassie.....	77
Figura 6.35 Gel SDS PAGE 15% renaturalizado y acoplado con α -Naftil Acetato.....	78
Figura 6.36 Gel T-PAGE nativo, acoplado con α -Naftil Acetato.....	78
Tabla 7.1 Medio Optimizado para la producción de lipasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	80
Figura 8.1 Curva patrón de ABS para cuantificación de proteína por el método de Lowry modificado.	82
Figura 8.2 Curva patrón de <i>p</i> -Nitrofenol.....	83



Capítulo 1

Resumen

Las lipasas son ampliamente utilizadas en áreas como la tecnología de alimentos, medicina, farmacología e industria química. En particular, las lipasas microbianas han recibido mucha atención en los últimos años para su uso en biotecnología.

Se aisló un microorganismo proveniente de aguas termales en Los Azufres Michoacán por miembros del grupo de trabajo ^[10]. Dicho microorganismo, identificado como *Bacillus pumilus* GMA1, posee actividad lipolítica en intervalos de pH y temperatura adecuados para ciertos procesos biotecnológicos; el pH óptimo de la actividad lipolítica se encontró en 10.5, mientras que la temperatura ideal fue de 50°C, además se encontró que la lipasa posee mayor afinidad por ácidos grasos de cadena corta.

El presente trabajo tiene por objetivo encontrar las condiciones ideales en las que el microorganismo *Bacillus pumilus* GMA1 produzca la mayor cantidad de lipasa, variando formulaciones del medio, tales como fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno, además de estudiar las condiciones de aireación y probar los efectos de la presencia de aceite de olivo como presunto inductor.

Se formuló un medio con componentes similares al utilizado en los experimentos previos (BHI, Difco) a fin de determinar individualmente el efecto de los componentes considerados. Se evaluó el efecto inductor del aceite de olivo en concentraciones de 1% sobre la producción de lipasa y se encontró que ejerce un



efecto positivo. Se demostró que la glucosa ejerce un efecto negativo sobre la producción de lipasa en concentraciones alrededor de 1g/L.

Con la información anterior se evaluaron por separado nuevos componentes del medio de cultivo: doce fuentes de carbono y cuatro de las mejores de ellas en diferentes concentraciones, cinco mezclas de fuentes de nitrógeno, y aceite de olivo en diferentes concentraciones. En seguida se realizó un diseño estadístico experimental factorial fraccionado 2^{7-4} , para así encontrar las concentraciones y/o niveles adecuados de los componentes que habían mostrado efectos positivos.

Se observó que las mejores fuentes de carbono fueron los polialcoholes como glicerol, manitol y sorbitol, siendo el glicerol el de mayor efecto. En cuanto a las fuentes de nitrógeno, se obtuvo un incremento notable causado por el extracto de carne (OXOID) al interaccionar con los demás componentes. También se encontró que la concentración de aceite de olivo puede disminuirse de 1% utilizado ^[73], hasta un 0.14 % presentando el mismo efecto inductor en la producción de lipasa. De este modo se llegó a la formulación de un medio de cultivo optimizado, que presenta doce veces mayor actividad lipolítica volumétrica y alrededor de 33 veces más actividad lipolítica específica, que en el medio utilizado originalmente (BHI Difco).



Capítulo 2

Introducción

Las lipasas son producidas por diversos seres vivos como animales, plantas y microorganismos. Las lipasas microbianas, a diferencia de las producidas por animales y plantas, pueden ser producidas en grandes cantidades por fermentación ^[11] y se sabe que las lipasas fúngicas requieren de un largo tiempo de producción a diferencia de las de origen bacteriano ^[24].

Las lipasas (triacilglicerol alquilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles bajo condiciones naturales. Las lipasas se diferencian de las esterasas por su actividad que es mayor en sustratos no solubles en agua y es óptima en la interfase de emulsiones agua-aceite, fenómeno al que se le llama “activación interfacial”. La máxima actividad de estas enzimas se obtiene en sistemas de emulsión, donde se amplía el área de contacto. Las lipasas no solo son activas en interfases de sistemas aceite en agua (o/w), sino también lo son en la interfase del sistema inverso, es decir en emulsiones agua en aceite (w/o). Otra característica es que son activas aún en fases orgánicas. Por dichas razones, las lipasas son muy versátiles, pueden catalizar reacciones de transesterificación, que pueden ser estereoespecíficas para producir diversos ésteres, así mismo pueden actuar sobre una gran gama de sustratos ^[1].

En los últimos años se ha incrementado el interés en las lipasas, como lo muestra la creciente tendencia en las publicaciones científicas acerca del tema, esto se debe a su gran potencial en las aplicaciones comerciales de estas enzimas en áreas como la biomedicina, industria farmacéutica, química, cosmética, y de alimentos ^[24].



Existe interés en el estudio y aplicación de la lipasa producida por la bacteria *Bacillus pumilus* GMA1, ya que posee características particulares como presentar actividad a altas temperaturas y altos valores de pH ^[73] (alrededor de 50°C y 10 a 10.5, respectivamente). Por dichas razones esta enzima tiene el potencial para emplearse en reactores industriales, en los que las enzimas termoactivas son más estables, además de que se pueden reducir tiempos de producción y hacer el medio selectivo para evitar contaminación microbiana, parámetros que otras enzimas no soportarían pues suelen desnaturalizarse antes de alcanzar estos valores de pH y temperatura.

En proyectos realizados en la Facultad de Química se ha trabajado con la lipasa producida por *Bacillus pumilus* GMA1. Los objetivos primordiales de estos trabajos (Wong,2001 ^[73], Zúñiga,2004 ^[76]), fueron la evaluación de la termoestabilidad de la lipasa e inmovilización de la misma, además de proponer diferentes técnicas para cuantificar la actividad lipolítica de la enzima. Los resultados obtenidos en dichos proyectos obligan a seguir explorando acerca del tema, ya que no se han establecido las mejores condiciones de producción, lo que constituye una de las limitantes del estudio de esta enzima.



Capítulo 3

Marco Teórico

3.1 El género *Bacillus*

3.1.1 Características del género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*. Está conformada por bacilos aerobios capaces de formar endosporas que pueden ser termorresistentes; presentan un gran número de especies y son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos gracias a sus enzimas hidrolíticas [5]. Esta característica les permite colonizar una gran variedad de ambientes con características extremas de temperatura y pH. Por dichas razones se considera al género *Bacillus* como un agente contaminante pero a la vez una fuente de enzimas con interés biotecnológico, debido a que la gran mayoría de sus especies no se consideran patógenas para el ser humano. Una desventaja de trabajar con *Bacillus subtilis*, que ha sido la especie del género más utilizada a nivel industrial, es que produce al menos siete proteasas extracelulares, lo que puede ocasionar degradación del sustrato así como de las mismas lipasas producidas; para evitar ese fenómeno se han utilizado inhibidores de proteasas [23] [5].

3.1.2 Clasificación taxonómica de *Bacillus pumilus*

Las bacterias del género *Bacillus* son bacilos largos, Gram positivo, forman endosporas y son catalasa positivo. Un criterio importante para su clasificación consiste en el tamaño, forma y posición de las endosporas [10]. La



clasificación taxonómica de *Bacillus pumilus*, de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica (ICNB), se muestra en la tabla 3.1

Tabla 3.1 Clasificación de *Bacillus pumilus*, de acuerdo al ICNB ^[62]

CLASE	<i>Firmicutes Gram +</i>
SUBCLASE	<i>Bacilli</i>
ORDEN	<i>Bacillales</i>
FAMILIA	<i>Bacillaceae</i>
GENERO	<i>Bacillus</i>
ESPECIE	<i>pumilus</i>

3.1.3 Antecedentes del microorganismo

El microorganismo estudiado, *Bacillus pumilus* GMA1 fue aislado de un ambiente extremo en aguas termales mexicanas en Los Azufres, Michoacán ^[10]. Este bacilo presenta características interesantes respecto a su termoactividad, y la cepa como tal fue considerada atractiva, ya que presenta actividades hidrolíticas (xilanolítica y proteolítica), además de que produce una lipasa extracelular mayoritariamente a fin a ácidos grasos de cadena corta. La enzima presenta la mayor actividad en rango de pH y temperatura de 10 a 10.5 y 40 a 60 °C respectivamente, dicha lipasa posee un peso molecular entre 20.5 y 21 kDa de acuerdo a Mora 2006 ^[78], Wong 2001 ^[73] respectivamente, siendo 20.5 kDa el valor teórico calculado.

En 1995, Bustos ^[10] caracterizó bioquímicamente la cepa aislada, (tabla 3.2) obtuvo resultados que son comparables con *Bacillus pumilus* DSM5776, cuya lipasa se ha caracterizado de manera bioquímica y molecular ^[44]. Aunque las diferencias en secuencia de aminoácidos entre las dos lipasas son pequeñas, manifiestan una gran diferencia en los valores de temperatura y pH óptimos ^[78].

Tabla 3.2 Pruebas bioquímicas de *Bacillus pumilus* GMA1, según Bustos 1995 ^[10]

PRUEBA/ RESULTADO		PRUEBA/ RESULTADO		PRUEBA/ RESULTADO	
Glicerol	(+)	Salicina	(+)	D-Fucosa	(-)
β -Metil-D-Xilósido	(-)	N-Acetil-glucosamina	(-)	Gluconato	(-)
α -Metil-D-Xilósido	(-)	Melibiosa	(-)	Catalasa	(+)
Mañosa	(+)	Melezitosa	(-)	Ornitina descarboxilasa	(-)
Esculina	(+)	Xilitol	(-)	Triptofano desaminasa	(+)
α -Metil-D-Glucósido	(-)	D-Tagatosa	(+)	Reducción de nitratos	(-)
Lactosa	(+)	L- Arabitol	(-)	L-Arabinosa	
Inulina	(-)	Tinción Gram	(+)	Adonitol	(-)
Glicógeno	(-)	Lisina Descarboxilasa	(-)	Fructosa	(+)
D-Lixosa	(-)	Ureasa	(-)	Dulcitol	(-)
D-Arabitól	(-)	Hidrólisis de gelatina	(+)	α -Metil-D-Mannósido	(-)
5-Ceto-gluconato	(-)	Hidrólisis de Xilano	(+)	Maltosa	(+)
Arginina dihidrolasa	(-)	D-arabinosa	(-)	Arbutina	(+)
Producción de H ₂ S	(-)	Glucosa	(+)	Trehalosa	(+)
Producción de acetoina	(+)	Rhamnosa	(-)	Almidón	(-)
Lipasa	(+)	Celobiosa	(+)	L-Fucosa	(-)
Eritritol	(-)	Amigdalina	(+)	2-Ceto-gluconato	(-)
D-Xilosa	(+)	Sacarosa	(+)	β -Galactosidasa	(-)
Sorbosa	(-)	Rafinosa	(-)	Indol	(-)
Manitol	(+)	Gentiobiosa	(+)	Hidrólisis de caseína	(+)



3.2 Lipasas

3.2.1 Características generales

Las lipasas han sido caracterizadas de acuerdo a su estabilidad a parámetros como pH, temperatura, a su especificidad posicional en la hidrólisis de triacilglicéridos y especificidad por ciertas cadenas de ácidos grasos. Para la caracterización de una lipasa verdadera se consideran dos criterios principales: en primer lugar, éstas se activan en interfases agua-aceite o inversas, lo que implica que su actividad aumenta en emulsiones, fenómeno conocido como activación interfacial; por otra parte las enzimas presentan una “tapa”, en el sitio activo que se retira al estar actuando en la interfase^[30].

Hasta hace no más de 2 décadas, el uso de las lipasas era únicamente la modificación de los triacilgliceroles y su incorporación en detergentes. Gracias a investigaciones recientes^{[3] [7] [23]}, el uso de las lipasas se ha extendido a diversas aplicaciones en industria de alimentos, farmacéutica, y en años más recientes, en la obtención de compuestos ópticamente puros, debido a su alta especificidad, además de presentar muy buena estabilidad en un amplio rango de disolventes orgánicos. Por otra parte se sabe que no necesitan de cofactores para su catálisis, y actualmente se sabe que es posible sintetizar mas de 1000 compuestos mediante el uso de lipasas.

3.2.2 Estructura

Los estudios realizados con cristalografía de rayos X a principios de la década anterior ayudaron a elucidar la estructura de las lipasas, y con ello comprender su funcionalidad. El patrón común de plegamiento de todas las lipasas es una estructura α/β hidrolasa, también encontrada en esterasas, proteasas y haloperoxidasas, dicha estructura consiste en una estructura central β con 8 hojas paralelas, excepto la segunda, que es antiparalela. Las secciones β_3 a β_8 están conectadas con α -hélices, las cuales están unidas a cada lado de la hoja β central^{[57] [46]}

Se sabe que el sitio activo de las α/β hidrolasas se localiza en el carboxilo terminal de la hoja central, el cual consiste de tres residuos catalíticos: uno



nucleófilo, que puede ser serina, cisteína o aspartato, y un residuo ácido que bien puede ser aspartato o glutamato, así como un residuo de histidina, siempre en este orden. En el caso de las lipasas se ha encontrado que el residuo nucleófilo es la serina, mientras que en la región catalítica posee un residuo ácido (aspartato o glutamato). Generalmente el residuo serina se encuentra dentro de una secuencia pentapéptida altamente conservada de Gly-X1-Ser-X2-Gly, y tiene una conformación ε ($\psi=62^\circ$, $\phi=-121^\circ$), que consiste en una cadena β , seguida de un giro rígido que contiene el residuo de serina, y en seguida un α hélice. A este arreglo se le conoce como β - ε Ser- α . Este posiciona el residuo libre nucleofílico a la superficie del sitio activo y permite acceder fácilmente por un lado al residuo de histidina y por el otro al sustrato. La histidina, que es el tercer residuo catalítico en las lipasas, se localiza en una vuelta después de la hoja β_8 de la estructura central ^[15].

3.2.3 Clasificación

Jaeger y col. (1999) ^[30] Introdujeron dos criterios para considerar a una enzima lipolítica como lipasa “verdadera”:

- A)** Ser activada cuando se encuentre en presencia de una interfase, es decir, su actividad debe incrementarse notablemente cuando el sustrato forme una emulsión.
- B)** Presentar un oligopéptido cubriendo el sitio activo de la enzima (tapa) que, al contacto con la interfase se retire del mismo y permita la entrada del sustrato para llevar a cabo la catálisis.

Otro criterio utilizado se rige de acuerdo con la especificidad de la lipasa por un sustrato, pueden clasificarse en 3 grupos ^[29].

- **Lipasas Inespecíficas:** Hidrolizan el enlace éster de cualquier posición en el triacilglicerol sin importar la saturación ni la longitud de la cadena. Estas enzimas pueden hidrolizar totalmente el sustrato.



- **Lipasas Específicas:** Sólo rompen los enlaces en las posiciones 1 y 3 de triacilgliceroles y producen 2,3-diglicéridos y 2 monoglicéridos. Después de un período largo el residuo de ácido graso en el 2-monoglicérido migra a la posición 1 y genera 1-monoglicérido, que es hidrolizado fácilmente
- **Lipasas que Discriminan** con base en la longitud y saturación de cadena del ácido graso.

Arpingy y Jaeger (1999) ^[2] clasificaron más de 50 esterasas y lipasas de bacterias agrupándolas en 8 familias basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos y sus propiedades biológicas, aunque se han hecho varias extensiones a la clasificación original ^{[47][2]}. La enzima lipolítica Lip C de *Pseudomonas aeruginosa* se añadió a la subfamilia I.1, mientras que las esterasas de Lip B de *Bacillus subtilis* y la de *Bacillus licheniformis* fueron añadidas a la subfamilia I.4; la subfamilia I.5, que contenía lipasas de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*, ahora contiene exclusivamente lipasas termófilas de especies de *Bacillus* (ahora llamadas *Geobacillus*), mientras que las lipasas de *Staphylococcus* ahora constituyen la subfamilia I.6, quedando *S. aureus*, *S. hycus*, *S. epidermidis* y, además se han adicionado *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. warner*. Finalmente las lipasas de *Propionibacterium acnes* y *Streptomyces cinnamoneus* que formaban la subfamilia I.6 constituyen la nueva subfamilia I.7

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

Subfamilia I.1: El peso molecular aproximado es de 30-32 kDa.

Subfamilia I.2: Presentan un peso molecular de aproximadamente 33 kDa debido a una inserción en la secuencia de aminoácidos que forma una doble hoja β -antiparalela en la superficie de la molécula.

Subfamilia I.3: Su peso molecular es grande (*Pseudomonas fluorescens*, 50 kDa; *Serratia marscescens*, 65 kDa), no contienen el péptido señal en el N-terminal ni tampoco residuos de cisteína. La secreción de este tipo de enzimas ocurre en un solo paso a través de la vía tipo I (también llamada exportador ABC).



Subfamilia I.4: Lipasas conocidas de *Bacillus*, las cuales tienen en común que en el pentapéptido consenso el primer residuo de Gly es reemplazado por un residuo de Ala, quedando Ala-X₁-Ser-X₂-Gly. Son las lipasas “verdaderas” mas pequeñas (aproximadamente 19 kDa) conocidas hasta ahora. También se adicionan a esta subfamilia dos esterasas de *Bacillus subtilis* LipB y *Bacillus licheniformis*.

Subfamilia I.5: La similitud en la secuencia de aminoácidos entre estas lipasas es de más de 91%, con masas moleculares de aproximadamente 43 kDa. Poseen dos residuos de cisteína que participan en la formación de un enlace disulfuro responsable de la estabilidad térmica de la enzima.

Subfamilia I.6: Con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa. Las lipasas de *Staphylococcus* presentan gran similitud en su secuencia de aminoácidos y sus propiedades bioquímicas, además, la de *Staphylococcus hycus* es la única que presenta una actividad fosfolipídica considerable.

Subfamilia I.7 Su región central presenta una similitud de aproximadamente 50%, comparadas con las lipasas de *Bacillus subtilis* y las de la subfamilia I.2. Sin embargo no hay similitud entre la lipasa de *Streptomyces cinnamoneus* y otras de *Streptomyces* conocidas hasta ahora.

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

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

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



- **Familia V:** Proceden de bacterias mesófilas (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Acetobacter pasteurianus*), psicrófilas (*Moraxella sp.*, *Psychrobacter immobilis*) y termófilas (*Sulfolobus acidocaldarius*). Estas bacterias con enzimas no lipolíticas comparten una considerable similitud en su secuencia de aminoácidos (20-25%). Poseen la estructura α/β hidrolasa así como la triada catalítica y son llamadas epoxi hidrolasas, deshalogenasas y haloperoxidasas.

- **Familia VI:** Poseen un peso molecular de aproximadamente 23-26 kDa las enzimas de esta familia son las esterases mas pequeñas conocidas actualmente. Tienen gran especificidad con sustratos pequeños y no presentan actividad con triacilglicéridos de cadena larga. Exhiben aproximadamente 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos comparadas con lipofosfolipasas eucarióticas (fosfolipasas independientes de Ca^{2+})

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

- **Familia VIII:** Exhiben una similitud considerable con varias β -lactamasas clase C. Estas esterases han sido identificadas con un motivo consenso Gly-X-X-Leu.

3.2.4 Determinación de actividad lipolítica

Se ha reportado un gran número de métodos para cuantificar actividad lipolítica, muchos de los cuales difieren del sistema usado para la solubilización del sustrato y el tipo de marcador de actividad empleado. La opción de un método para determinar actividad enzimática en general depende del tipo de enzima a estudiar y de las condiciones bajo las cuales presenta actividad ^[68]

Se ha observado que la actividad de una lipasa medida por un solo método no es representativa de la actividad real de la misma, ya que los sustratos que se usan para el ensayo de actividad pueden reaccionar de manera distinta con la enzima y dependen del proceso que se esté cuantificando, que no es igual



para la hidrólisis de lípidos que para la síntesis de ésteres por citar un ejemplo [10][73].

Para detectar la actividad lipolítica comúnmente se utiliza tributirina como sustrato, a pesar de que no es específico para las lipasas. Su uso extendido se debe a la facilidad que presenta para dispersarse en un medio acuoso, mayor que la de la trioleína, que sería un sustrato más adecuado. Los detergentes tipo “Tween” también son usados en la cuantificación de actividad lipolítica, pues ayudan a crear emulsiones de algunos sustratos. Algunos métodos de detección de lipasa dependen de la reacción de los ácidos grasos liberados con iones calcio presentes en el medio para formar un precipitado; sin embargo si el organismo utiliza eficientemente a éstos, se pueden presentar falsos negativos.

Tradicionalmente las lipasas han sido ensayadas por técnicas de radiometría o por titulación. Los métodos radiométricos son los más sensibles pero requieren el uso de sustratos marcados por radiación, técnica que es muy costosa. Por otro lado los métodos de titulación son poco sensibles. En experimentos que involucran un gran número de ensayos o muestras no purificadas conviene usar sustratos cromogénicos o fluorogénicos, los cuales pueden ser examinados fácil y rápidamente. Sin embargo muchos sustratos cromogénicos exhiben baja especificidad y sensibilidad, o llegan a ser hidrolizados espontáneamente bajo ciertas condiciones, hecho que representa la mayor desventaja [52]. Los diferentes ensayos para determinar la actividad lipolítica están agrupados en 5 categorías [73].

1) Hidrólisis Del Sustrato En Medio Sólido: Se utilizan sustratos como tributirina y trioleína, que se emulsifican mecánicamente en medios de cultivo. La actividad lipolítica se manifiesta mediante la formación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias que poseen actividad lipolítica. Este método se usó en el presente trabajo

2) Espectrofotométricos. Con el sobrenadante de extractos microbianos, se determina la hidrólisis de *p*-Nitrofenilésteres de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena, cuantificando el *p*-Nitrofenol liberado que absorbe a una longitud de onda de 410nm, técnica que fue utilizada en el presente trabajo. En la



tabla 3.3 se muestra un resumen de las condiciones más utilizadas para la realización de esta técnica.

3) Fluorescencia: A los medios de cultivo sólidos con el sustrato emulsificado, se les adiciona rodamina B y mediante irradiación con luz UV se revela la actividad lipolítica como una fluorescencia que se manifiesta en una tonalidad de naranja a rojo.

4) Titulación De Ácidos Grasos Libres: Indicado para determinar la actividad de una lipasa verdadera, se basa en titular los ácidos grasos liberados por la acción enzimática sobre una emulsión aceite/agua.

5) Tensión Superficial: Una capa de lípido es esparcida en una interfase aire/agua. La lipasa cataliza la hidrólisis de la monocapa lipídica provocando cambios en la presión de la superficie, la cual puede reajustarse automáticamente por un barómetro controlado por una computadora. Esta técnica requiere de una inversión importante en un equipo especializado.

Tabla 3.3 Ensayos espectrofotométricos más utilizados en la cuantificación de actividad lipolítica

SUSTRATO	SOLVENTE	SISTEMA AMORTIGUADOR	T °C	OTROS	AUTOR
<i>p</i> -Nitrofenil Butirato 0.5Mm	Acetonitrilo	Fosfatos 50mM pH 7.25	25	0% Glicerol NaCl 0.1 mM	Tsujita 1989 ^[63]
<i>p</i> -Nitrofenil Caprotato 8Mm	Isopropanol	Tris-HCl 20mM pH 8.5	55	0.1% Goma Arábica	Supacnock 2001 ^[59]
<i>p</i> -Nitrofenil Caprotato	*	*	*	-	Lee Mi-Hwa 2003 ^[38]
<i>p</i> -Nitrofenil Laurato 0.01 mM	Etanol	Fosfatos 50mM pH 8.0	60	-	Neerupma Nawani 2000 ^[45]
<i>p</i> -Nitrofenil Palmitato	Isopropanol	Tris-HCl 50mM pH 8.0	-	Tritón X-100 Goma Arábica	Yasser R. 2002 ^[74]
<i>p</i> -Nitrofenil Palmitato	Isopropanol	Fosfatos, pH 8.0 0.05Mm	35	Desoxicolato Goma arábica	Ulrich K. 1978 ^[65]

*No descrito en el artículo

3.2.5 Fuentes de obtención de lipasas



Las células microbianas son la fuente usual de enzimas para uso industrial aunque también siguen en uso algunas provenientes de animales y plantas utilizadas tradicionalmente como las proteasas papaína, ficina y bromelina, que se utilizan para el ablandamiento de la carne, así como la quimosina, empleada en la manufactura del queso.

La inmensa mayoría de las enzimas microbianas se producen a partir de aproximadamente veinticinco organismos, incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo aproximadamente el 2% de los microorganismos existentes en el mundo han sido estudiados como fuente de enzimas ^[11]. Las enzimas microbianas son más útiles que las derivadas de las plantas o animales por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen, y porque usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, a bajos costos, de forma regular y de calidad uniforme. Además las enzimas microbianas son generalmente más estables que sus homólogos animales y vegetales, y su proceso de producción es más fácil y seguro. La manipulación genética y ambiental para incrementar el rendimiento o la actividad enzimática de las células puede llevarse a cabo fácilmente debido a su corto periodo de regeneración, y a sus relativamente simples exigencias nutritivas, pero suelen ser costosos.

Otra bondad que ofrecen las lipasas de origen microbiano es que son más termoestables que las de plantas y animales, por lo que han recibido mucha atención debido a su potencial en la industria e investigación. Muchas lipasas de mesófilos son estables a temperaturas elevadas, pero en la actualidad son de mucho mayor interés los microorganismos termófilos pues se ha observado que sus enzimas y proteínas en general son más estables en solventes orgánicos y tienen una mayor actividad a temperaturas elevadas, tal es el caso de la lipasa producida por *Bacillus pumilus* GMA1 ^[77]

En la tabla 3.4 se muestra una lista de microorganismos productores de lipasas, sólo algunas de ellas son producidas comercialmente. Los géneros de mayor importancia son *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cromobacterium* y *Pseudomonas* ^[49]



Tabla 3.4 Microorganismos productores de lipasas
Gupta y col 2004 ^[21]

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LIPASAS (GUPTA Y COL 2004)	
<i>Achromobacter sp.</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>A. lipolyticum</i>	<i>Micrithrix parvicella</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Moraxella sp.</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>A. radioresistens</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>A. denitrificans</i>	<i>P. avidium</i>
<i>Arthobacter sp</i>	<i>P. granulorum</i>
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>
<i>B. alcalophilus</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>B. atrophaeus</i>	<i>P. fragi</i>
<i>B. laterosporus</i>	<i>P. luleola</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>P. mendocina</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>P. nitroreducens</i> <i>var. thermotolerans</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>P. pseudomallei</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>P. wisconsinensis</i>
<i>B. thaiminolyticus</i>	<i>Psychrobacter immobilis</i>
<i>B. thermoacatenulatus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Burkholderia glumae</i>	<i>S. haemolyticus</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>S. hyicus</i>
<i>Corynebacterium acness</i>	<i>S. warneri</i>
<i>Cryptococcus laurentili</i>	<i>S. xylosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Serratia mercescens</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Vibrio cholera</i>

3.2.6 Aplicación industrial e importancia económica de las lipasas

Las lipasas son ampliamente utilizadas en el procesamiento de grasas, aceites y detergentes, así como en el desarrollo de nuevas fórmulas y procesamiento de alimentos, síntesis de compuestos químicos y farmacéuticos, manufactura de papel y producción de cosméticos ^{[7] [31] [55]}. Las lipasas pueden ser utilizadas para acelerar la degradación de desechos grasos ^[42] e incluso poliuretano ^[61]. Las aplicaciones más importantes de las lipasas se sintetizan en la Tabla 3.5



Tabla 3.5 Aplicación industrial de lipasas, Vulfson, 1994 ^[69]

INDUSTRIA	EFEECTO	PRODUCTO O APLICACIÓN
Detergentes	Hidrólisis de Grasas	Remoción de residuos grasos en fábricas
Alimentos Cotidianos	Hidrólisis de grasa de leche, maduración de queso, modificación de grasa butírica.	Desarrollo de sabores en lácteos, queso y mantequilla
Panificadora	Mejoramiento del sabor	Alargamiento de vida de anaquel
Bebidas	Mejoramiento de aroma	Bebidas
Aderezos	Mejoramiento de Calidad	Mayonesas, Vinagretas, Aderezos
Alimentos Saludables	Transesterificación	Alimentos Saludables
Carnes y Pescados	Desarrollo de Sabores	Productos cárnicos y pesqueros remoción de grasas
Grasas y Aceites	Transesterificación; Hidrólisis	Mantequilla de maní, margarina, ácidos grasos, glicerol, mono y diglicéridos
Productos Químicos	Enantioselectividad, Síntesis	Compuestos quirales, productos químicos puros
Farmacéutica	Transesterificación; Hidrólisis	Lípidos específicos, coadyuvantes digestivos
Cosmética	Síntesis	Emulsificantes, Humectantes
Papel	Hidrólisis	Papel con mayor calidad
Limpieza	Hidrólisis	Remoción de grasas

- **Industria de Detergentes**

Debido a que hidrolizan grasas, las lipasas son los aditivos más usados en la industria de detergentes, pues deben cumplir con los siguientes requerimientos: a) Baja especificidad por sustratos, b) Capacidad de trabajar en condiciones extremas (ejemplo pH de 10-11, temperatura 30-60°C) y c) Capacidad de funcionar en conjunto con otros aditivos como surfactantes y otras enzimas.

Las lipasas con las características adecuadas y requeridas para estos usos fueron obtenidas a partir de una búsqueda exhaustiva en diferentes microorganismos ya conocidos ^{[71][75]} y también pueden obtenerse a través de la ingeniería proteómica ^[34].

Novo Nordisk introdujo la primera lipasa recombinante, “Lipolase”, la cual fue obtenida originalmente de *Thermomyces launginosus* y posteriormente expresada en *Aspergillus oryzae*. En 1995, dos nuevas lipasas bacterianas fueron introducidas al mercado “Lumafast” producida por *Pseudomonas mendocina* y



“Lipomax” producida por *P. acaligenes* M-1, las cuales fueron bien recibidas para su uso en remoción de grasas bajo condiciones de máquinas modernas de lavado.

- **Industria de los Alimentos**

Las grasas y los aceites son componentes importantes en los alimentos. El valor nutricional, las características sensoriales, así como las propiedades físicas que los triacilgliceroles aportan a los alimentos, están directamente determinados por diversos factores, tales como la posición de ácidos grasos en el esqueleto del glicerol, el largo de la cadena del ácido graso, así como el grado de insaturación de los mismos. Las lipasas permiten modificar las propiedades de los lípidos alterando la posición de las cadenas de ácidos grasos en el glicérido, o bien intercambiándolo por uno distinto. De este modo, un lípido relativamente barato puede modificarse elevando su valor comercial y/o nutricional ^{[13] [17] [48] [66]}. La crema de cacao posee un elevado valor en el contenido de lípidos, contiene ácidos palmítico y esteárico, los cuales tienen un punto de fusión de 37°C aproximadamente. La fusión de la crema de cacao en la boca produce una sensación agradable al consumidor en productos como el chocolate, característica particular de este tipo de productos. Gracias a la nueva tecnología, que implica el uso de lipasas que llevan a cabo reacciones de síntesis e hidrólisis, se puede lograr elevar el valor de otras grasas, de menor valor comercial y convertirlas en sustitutos de cacao ^[13]. Un ejemplo de este tipo de reacciones es el uso de la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei*, quien lleva a cabo la reacción de transesterificación, donde reemplaza el ácido palmítico del aceite de palma por ácido esteárico ^[66].

- **Industria Papelera**

Los componentes hidrófobos de la madera (principalmente triacilgliceroles y ceras), causan severos problemas durante la producción de pulpa y manufactura de papel. Las lipasas son utilizadas para remover estos componentes y facilitar el proceso. La industria papelera japonesa ha desarrollado un método para este efecto, en el cual la enzima fúngica de *Candida rugosa* hidroliza más del 90% de los triacilgliceroles contenidos en la madera ^[28].



- **Lipasas En Síntesis Orgánicas.**

El uso de lipasas en síntesis químicas orgánicas ha crecido en los años recientes. Las lipasas son utilizadas para catalizar una amplia variedad de reacciones que ofrecen productos de tipo regio y estereoselectivos. ^{[4] [34] [54]}

Las lipasas catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles insolubles en agua, pues actúan en la interfase agua-aceite. El valor del a_w , o actividad acuosa, que está íntimamente relacionado con la cantidad de agua en el sistema, determina la dirección de la reacción, ya sea síntesis o bien hidrólisis. Cuando este valor es muy bajo, solamente se favorecen las reacciones de transesterificación y esterificación. Por el contrario, la hidrólisis se ve favorecida cuando hay un exceso de agua ^[36] Se sabe que las lipasas también son capaces de catalizar reacciones en solventes supercríticos ^{[35] [53] [64]}.

Aunque las lipasas poseen un gran potencial de uso en diversas industrias, actualmente su uso se encuentra limitado por diversos factores, tales como costos elevados de producción, o la producción de suficiente enzima, heterogeneidad de diversas preparaciones y la ausencia de lipasas con características específicas para una aplicación en particular

3.3 Factores que afectan la producción de enzimas

Las lipasas son producidas generalmente mediante cultivos sumergidos ^[27], en algunos casos se pueden obtener mediante fermentaciones sólidas ^[12] e incluso algunos autores mencionan haber obtenido buenos rendimientos en cultivos celulares inmovilizados. Se han realizado muchos estudios para definir las condiciones de cultivo óptimo así como los requerimientos nutricionales para la producción de lipasa mediante cultivos sumergidos. La producción de lipasa se encuentra ligada al tipo y concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, pH del cultivo, temperatura de crecimiento, así como la cantidad de oxígeno disuelto ^[16] Los lípidos como fuente de carbono parecen ser esenciales para la obtención



de altos rendimientos de lipasas, sin embargo algunos autores han obtenido buenos rendimientos en ausencia de grasas y aceites.

En la producción de cualquier metabolito a menudo se encuentra el fenómeno en el cual las condiciones óptimas de crecimiento no son necesariamente aquéllas en las que se obtienen los mejores rendimientos de dicho metabolito. El lograr un buen crecimiento es esencial para la obtención del producto, pero en general, se deben evitar las altas concentraciones de nutrientes fácilmente asimilables por el microorganismo. Se debe poner especial atención al control de pH, contenido de minerales, temperatura y aireación. Las condiciones de crecimiento y los requerimientos nutricionales pueden, en un principio, ser seleccionados empíricamente para cada microorganismo y el método de fermentación seleccionado. En la síntesis de una enzima, las interacciones entre los diversos factores son muy complejas. Esto conduce a que en un proceso de desarrollo de enzimas que se explotarán comercialmente, se ocupe tiempo considerable en investigación para encontrar las condiciones adecuadas de crecimiento del microorganismo y así lograr la producción del metabolito de interés en las diferentes etapas de escalamiento del proceso, hasta llegar a reproducirlas a nivel industrial.

La producción de lipasas, como la de muchas otras enzimas, se encuentra regulada por la composición de nutrientes del medio de cultivo. Los factores que influyen en su síntesis varían de microorganismo a microorganismo. Existen algunos reportes de incremento de la producción de enzimas lipolíticas en presencia de aceites vegetales tales como el de olivo, maíz y girasol ^[21]. Por otro lado, los factores físicos como la temperatura de fermentación y la aireación pueden ser determinantes en el rendimiento de la producción de lipasa ^[6] El microorganismo requiere para su crecimiento una fuente de energía y en general fuentes de materia prima. En la mayoría de las fermentaciones industriales las fuentes de energía y materia prima son la misma (azúcar), pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas por la composición interna del organismo.

3.3.1 Fuentes de carbono y lípidos



En algunos artículos se observa la tendencia a utilizar aceites vegetales para la obtención de mayores rendimientos en la producción de lipasas. Sugihara^[58], reportó la producción de lipasa de *Bacillus sp.* en presencia de 1% de aceite de olivo en el medio de cultivo. En el caso *Rhodotorula glutinis* se observó poca actividad en ausencia de aceite de olivo aún después de tiempo prolongado de cultivo. Por otro lado, se encontró que la fructosa y el aceite de palma resultaron ser las mejores fuentes de carbohidratos y lípidos, respectivamente, para la producción de una lipasa extracelular del mismo microorganismo. Al comparar las dos fuentes de carbono, aceite de palma al 2% y fructosa, se encontró un rendimiento 12 veces mayor de lipasa en el medio que contenía aceite de palma contra el medio que contenía sólo fructosa como fuente de carbono^[50]

Lee YP et al^[39], reportan una actividad específica de 7,395 U/mg de proteína para una lipasa alcalina (pH 8.5), producida por *P. fluorescens* S1K WI en un medio que contenía aceite de olivo emulsificado como fuente de carbono. La enzima mostró una mayor actividad hacia triglicéridos de 6 y 8 carbonos comparados con otros, y se mostró también que hidrolizan preferentemente el enlace éster en posición 1 y 3. Según Sztajer 1993^[60] de manera similar una lipasa alcalina de *Penicillium expansum* mostró su máxima actividad cuando la biomasa fue obtenida de un medio que contiene 0.1% de aceite de olivo, a un pH de 8.3, además encontró que a estabilidad de dicha enzima aumenta mediante la adición de Tween 20 y Lubrol PX.

En muchos otros estudios se ha comprobado el aumento de la producción de lipasa cuando se utilizan aceites como inductores. Lin et al, 1996^[41] lograron producir una lipasa alcalina de *P. pseudoalcaligenes* F-11 en un medio que contenía aceite de olivo (0.4%) y tritón (0.2%). La adición de Tritón X-100 aumento la producción de lipasa alcalina 50 veces en comparación con el medio que sólo contenía aceite de olivo. Cabe mencionar que no siempre la concentración de aceite es la óptima tanto para el crecimiento como para la producción de enzima, tal es el caso de *Rhizopus oryzae*, quien presenta un crecimiento óptimo en presencia de aceite de olivo al 3%, mientras que la concentración óptima para la producción de lipasa fue del 2%.^[18]



En general, la tendencia mostrada es que la producción de lipasas en su mayoría depende de un inductor, función que en muchos casos llevan a cabo los aceites.

3.3.2 Fuentes de nitrógeno.

Wang et. al 1995 ^[71], reportaron la producción de una lipasa alcalina altamente termoestable producida por la cepa A-301 de *Bacillus* (ATCC 53841) en un medio que contiene extracto de levadura (0.1%) y cloruro de amonio (1%) como fuentes de nitrógeno. La preparación de la enzima parcialmente pura poseía temperatura de actividad óptima de 60°C y el pH óptimo de 9.5 ^[71]. Cordenons et al (1996) ^[14] probaron varias fuentes de nitrógeno en la producción de lipasa a partir de *Acinetobacter calcoaceticus*. Utilizaron aminoácidos y triptona reportaron un rendimiento mayor de 2 a 3 veces en comparación con el uso de amonio, extracto de levadura y proteosa peptona. Estos mismos autores mencionan que tanto el rendimiento de la lipasa como su estabilidad pueden aumentar sustituyendo la fuente de nitrógeno orgánico por inorgánico.

En realidad existe una gran variación en el comportamiento de los microorganismos con respecto a la producción de lipasa, frente a las diferentes fuentes de nitrógeno empleadas en los medios de cultivo. Por ello se recomienda hacer ensayos empíricos para tomar una decisión respecto a la fuente a emplear, tomando en cuenta los costos y disponibilidad de la materia prima.

En artículos recientes se han encontrado diversos medios de cultivo y el efecto que poseen sobre la producción de lipasas para el género *Bacillus*. La información más significativa se sintetiza en la Tabla 3.7

Tabla 3.7 Efectores probados en la producción de lipasas del género *Bacillus*

FUENTES DE CARBONO	CONCENTRACIONES	RESULTADO
Glicerol +	5-20 mL/L	Positivo
Manitol +	5-20 g/L	Positivo
Galactosa +	5-20 g/L	Positivo
Lactosa +	5-20 g/L	Positivo
Sorbitol +	5-20 g/L	Positivo
Goma Arábica ++	2-20 g/L	Negativo



Aceite de Olivo ++	4-20 v/v	Positivo
FUENTES DE NITRÓGENO	CONCENTRACIONES	RESULTADO
Extracto de Carne ++	0.03-0.21 g/L	Positivo
Peptona ++	0,05- 0.35 g/L	Positivo
PRESENCIA DE IONES	CONCENTRACIONES	RESULTADO
CaCl ₂ ++	0.5-20 (g/L)	Negativo
CaCl ₂ +++	----	Negativo
NaCl ₂ ++	0.58-5.8 g/L	Negativo
MgSO ₄ -7H ₂ O ++	0.01-0.1 (g/L)	Negativo
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.01-0.1 g/L	Negativo
OTROS	CONCENTRACIONES	RESULTADO
Densidad del inóculo +	15% v/v (DO ₅₅₀ = 0.8)	Positivo
Tween 80 ++	0.5-3.0 v/v	Positivo
Temperatura ++	40- 60°C	Positivo
pH ++	5.5- 9.0	Varía
Aireación ++	50- 150 mL / 250ml	Varía
Edad del inóculo ++	9-18 h	Varía

+ Gupta (2004) ^[20] ++ (Yasser AF, (2002) ^[74] +++ Lee-Mi-Hwa (2003) ^[38]

3.4 Regulación genética

Las células vivientes disponen de mecanismos cuidadosamente programados que regulan las cantidades relativas de proteínas que sintetizan. La regulación de la velocidad de la síntesis enzimática, proporciona a cada tipo de célula el conjunto de enzimas requerido para el mantenimiento de las actividades fundamentales de autogobierno, y hace también posible economizar el empleo de aminoácidos para la síntesis de ciertos enzimas que sólo se utilizan de vez en cuando ^[40]. Cada ser vivo posee un gran número de genes, tanto mayor cuanto más compleja sea la especie. Esto no significa que todos los genes se transcriban a la vez, ni siquiera que todos los genes se transcriban alguna vez a lo largo de la existencia de los seres vivos, puesto que muchos genes sólo se transcriben cuando la célula lo necesita, y muchos otros no se transcriben mas una vez que se ha producido la diferenciación celular. Esto es lo que constituye la regulación de la expresión genética.



3.4.1 Modelo del operón

El proceso de bloqueo y activación de los genes en los organismos superiores aún no está claro. Sin embargo, el proceso de regulación génica en bacterias, que es más sencillo, fue estudiado por los franceses F. Jacob y J. L. Monod, que propusieron un modelo de regulación para procariotas que les valió el premio Nobel, el llamado modelo del operón, reportado para *E. coli*.^[40]

Este modelo supone la existencia de una región próxima al gen que se necesita transcribir denominada región promotora o simplemente promotor, que es el lugar donde se une la enzima RNA-polimerasa que va a transcribir el gen. Próxima al promotor, incluso formando parte de él, existe otra región llamada región operadora u operador, a la cual se puede unir o no una proteína especial denominada represor que se fabrica en otra zona del genoma a partir de un gen llamado gen regulador. Ciertas sustancias químicas actúan bloqueando al represor para que deje libre al operador, recibiendo entonces el nombre de inductores, ya que permiten la transcripción. Para que la RNA-polimerasa pueda transcribir el gen tienen que darse dos circunstancias: una, que la RNA-polimerasa se una al promotor y, que el represor no esté unido al operador, y por tanto al estar el operador libre, la RNA-polimerasa pueda moverse hasta el gen; si alguna de estas circunstancias no sucede, la transcripción no se lleva a cabo.

Mediante experimentos genéticos se ha podido determinar un locus situado entre el gen regulador (*lac i*), y el sitio operador del operón *lac*. El promotor representa sólo un segmento relativamente corto, de menos de cien nucleótidos, del DNA., el promotor también es el sitio de unión para otro tipo específico de proteína requerido para la transcripción de ciertos operones, esto es, la proteína receptora del AMP cíclico.

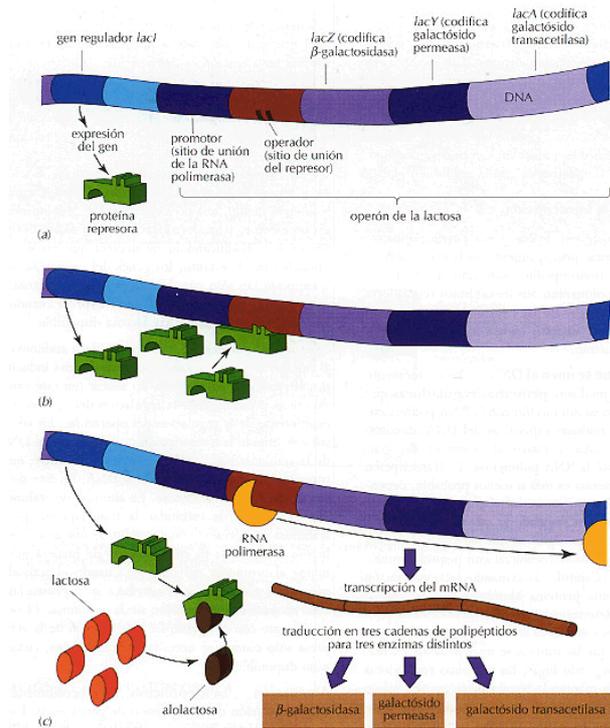


Figura 3.8 Modelo del Operón, Jacob y Monod 1965 [40]

3.4.2 Enzimas bacterianas constitutivas e inducidas

Las enzimas constitutivas son las que se forman a velocidades constantes y en cantidades también constantes, independientemente de cuál sea el estado metabólico del organismo. Se consideraba a las enzimas constitutivas como una parte de la maquinaria básica permanente de la célula; son un ejemplo de ellas las enzimas de la secuencia glucolítica, que es la ruta catabólica productora de energía más antigua conocida. Las enzimas inducibles normalmente se encuentran en cantidades ínfimas en una determinada especie bacteriana, pero su concentración puede elevarse rápidamente hasta mil veces o más cuando se halla en presencia de su sustrato, particularmente cuando dicho sustrato es la única fuente de carbono de la célula. El ejemplo clásico de enzima inducible es el de la β-galactosidasa.

3.4.3 Represión enzimática

La represión es un reflejo del principio de la economía celular. Cuando las enzimas necesarias para la biosíntesis de un compuesto en particular ya no se necesitan, puesto que el compuesto es añadido al medio, estas enzimas dejan de



fabricarse. La mayoría de los casos que presentan represión enzimática implican a enzimas que participan en reacciones biosintéticas. La represión de la síntesis de un grupo de enzimas que catalizan una serie consecutiva de reacciones bioquímicas, se denomina “represión coordinada”. La represión coordinada generalmente es provocada por el producto final de la serie de reacciones biosintéticas catalizadas por los enzimas reprimidas; por esta razón también se le denomina “represión por producto final”.

3.4.4 Represión catabólica (Represión por Glucosa)

Es una observación general que la glucosa, que es el combustible más directo para la mayoría de las células, pueda suprimir la formación de enzimas inducibles que utilizan a alguna otra molécula de combustible, así cuando hay glucosa disponible como combustible, las bacterias prefieren la ruta catabólica más primitiva, esto es, la glucolítica o fermentativa, desconectando cualquier otra ruta catabólica suministradora de energía.

3.5 Diseño estadístico de experimentos

3.5.1 Generalidades.

Generalmente cuando se tiene una formulación para la producción de un metabolito, ésta no ha sido optimizada por un método estadístico. En la mayoría de los casos existen componentes innecesarios o en mayor proporción de lo realmente necesario. Por ello, la optimización se convierte en un arma de gran valor para minimizar costos de producción ^[9] [67]

3.5.2 Diseño factorial fraccionado a 2 niveles

El número de experimentos elementales que requiere un diseño factorial 2^k completo aumenta geométricamente al crecer k . Afortunadamente, resulta que cuando k es grande, la información deseada se puede obtener, casi siempre, realizando sólo una fracción del diseño factorial completo. Considerando un experimento con 7 variables en donde se tendrían que analizar 2 niveles, esto es un diseño 2^7 se obtendrá un total de 128 experimentos, que evalúan todas las interacciones que puede haber entre dichas variables. Sin embargo, el hecho de que se puedan estimar todos estos factores no implica que todos ellos sean



significativos, existe una cierta jerarquización. La importancia de los efectos principales tiende a ser mayor que la de las interacciones de dos factores, que a su vez tiende a ser mayor que la de las interacciones de tres factores y así sucesivamente; se pueden conjuntar estas ideas diciendo que tiende a haber redundancia en los diseños 2^k si k es grande, donde redundancia se refiere a un exceso de interacciones que pueden ser estimadas y a veces a un exceso de variables exploradas. Los diseños factoriales fraccionados explotan estas redundancias, disminuyendo así el número de experimentos a realizar ^[8].

3.5.3 Box-Wilson

Éste método es una modificación del diseño factorial, se utiliza cuando se desea optimizar un medio de cultivo, o las condiciones para producir un metabolito. Parte de un diseño factorial 2^n , es decir, siempre se estudian x número de variables a dos niveles: un nivel inferior y un nivel superior. Los resultados del diseño factorial se utilizan para encontrar los componentes o condiciones que más afecten los resultados y así proponer una nueva serie de componentes, donde algunos componentes se incrementan y otros se disminuyen hasta llegar al nivel óptimo de cada componente ^{[8] [79]}.



Capítulo 4

Objetivos

- **GENERAL:**

Optimizar el medio y condiciones para la producción de lipasa de *Bacillus pumilus*. GMA1

- **PARTICULARES:**

- ✓ Seleccionar y estandarizar un método para la cuantificación de la actividad lipolítica del extracto enzimático y una variante para demostrar cualitativamente la presencia de la enzima.

- ✓ Corroborar la presencia y la evolución de la aparición de la enzima en el tiempo de fermentación, mediante electroforesis (PAGE) y Zimogramas

- ✓ Comparar el efecto sobre la producción de lipasa del medio formulado, con el medio donde crece típicamente *Bacillus pumilus* GMA1.(BHI, Difco)

- ✓ Encontrar las condiciones de aireación ideales para la producción de lipasa

- ✓ Evaluar si existe o no un efecto negativo sobre la producción de lipasa debido a la presencia de glucosa.

- ✓ Evaluar el efecto que tiene la presencia de aceite de olivo y posteriormente las diferentes concentraciones del mismo sobre la producción de lipasa.

- ✓ Encontrar la fuente y proporciones ideales de Carbono y Nitrógeno en el medio para optimizar la producción de lipasa.

- ✓ Aplicar un diseño factorial fraccionado y un Box-Wilson, para llegar a la formulación del medio óptimo para la producción de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1



Capítulo 5

Material y Métodos

5.1 Reactivos

REACTIVO	MARCA
Aceite de Olivo	Baker
Agar nutritivo	Baker
Albúmina Bovina Sérica	Sigma
Alcohol etílico anhidro	Baker
Almidón soluble	Baker
API, Kit 50 CHB/E	Biomerieux
BHI	Difco
Bicarbonato de Sodio	Baker
Caldo nutritivo	Bioxon
Carbonato de Sodio	Baker
CHES	Sigma
Cloruro de Sodio	Baker
Dextrina amarilla	Cosmopolita
Dextrosa anhidra	Baker
D- Sorbitol	Sigma
D (+) Galactosa	Merck
d- Manitol	Merck
Extracto de Carne	Bioxon
Extracto de Levadura	Difco
Fast Red	Sigma
Fenol Folin-Ciocalteu	Sigma
Fosfato monobásico de sodio	Baker
Fosfato dibásico de sodio	Baker
Glicerol anhidro	Baker

REACTIVO	MARCA
Hidróxido de Sodio	Baker
Lactosa	Baker
Maltosa	Difco
Marcadores de peso molecular Low Range	Biorad
Marcadores de peso molecular Ultra Low Range	Biorad
Peptona	Difco
p-Nitrofenol	Sigma
p-Nitrofenil Acetato	Sigma
p-Nitrofenol Butirato	Sigma
p-Nitrofenil Laurato	Sigma
p-Nitrofenil Palmitato	Sigma
Sacarosa	Mallinckrodt
SDS	Sigma
Sulfato de amonio	Fluka
Sulfato de Cobre	Sigma
Tartrato de potasio	Sigma
Tributirina	Sigma
Tricina	Research O
Tritón X-100	Sigma
Tween 80 (Polyoethyleno sorbitan monooleato)	Sigma
α -Naftil Acetato	Sigma



5.2 Generalidades de los experimentos

5.2.1 Microorganismo y su conservación

El microorganismo de investigación, *Bacillus pumilus* GMA1, ha sido caracterizado como un bacilo largo, Gram positivo. Sus esporas fueron conservadas en congelación a -20 °C en un congelador Lab-Line mod 3552-10, en caldo nutritivo con glicerol al 15% v/v ^[10]. De este cultivo la cepa se trasladó a “glass beads”, método conocido comúnmente como “chaquiras” ^[32]. Para la realización de las “chaquiras” una vez teniendo la certeza de la pureza de la cepa, mediante tinciones de Gram, ésta se cultivó en un medio nutritivo (BHI) hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, en aproximadamente doce horas, El paquete celular se separó por centrifugación y se lavó dos veces con agua peptonada estéril. Posteriormente, se resuspendió en un volumen definido de caldo nutritivo con 15% de glicerol como crioprotector, y finalmente, se tomó una alícuota que se vertió en un vial estéril que contiene las “chaquiras” previamente lavadas y esterilizadas. El exceso de líquido se retiró con una pipeta pasteur estéril y los viales se conservaron a -70 °C en un ultracongelador marca Revco.

5.2.2 Morfología del microorganismo

Para confirmar las características macro y microscópicas de *Bacillus pumilus* GMA1, se utilizaron medios sólido y líquido, siendo estos agar nutritivo y caldo BHI, respectivamente. El caldo BHI se adicionó con aceite de olivo al 1%, y se cultivó a 37 y 50 °C de forma estática en una Incubadora New Brunswick Scientific Innova 40. El agar nutritivo se adicionó con tributirina al 0.5%, antes de esterilizar el agar, el tamaño del glóbulo de la tributirina se redujo con un homogenizador marca Ika, mod T25 a una velocidad de 11,000 rpm durante 30 segundos. Las placas se vertieron, se inoculó el microorganismo y se incubó a 37°C; ambos medios se esterilizan en autoclave Yamato Sterilizer mod. 5M300 a 121 °C por 15 minutos .El tiempo de incubación fue de 24h para ambos medios. De ambos medios se realizaron tinciones Gram y se observaron en el microscopio.



5.2.3 Pruebas bioquímicas

Con la ayuda del Kit 50 API CHB/E se llevó a cabo la identificación del microorganismo y se comparó con lo ya reportado en la literatura y bases de datos. El Kit API CHB/E es un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos en los microorganismos. La galería 50 CHB/E está compuesta por 50 microtubos y permite el estudio de la fermentación de sustratos, pertenecientes a la familia de los carbohidratos y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). La incubación se llevó a cabo a 29°C en una estufa Pearson Gravity, la fermentación se reveló como un cambio de color en el tubo, debido a la producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer tubo de la galería sirvió como testigo, pues no contiene el principio activo.

5.2.4 Confirmación de actividad lipolítica

Este experimento se llevó a cabo en medio sólido, preparado a base de agar nutritivo y tributirina al 0.5%. El tamaño de glóbulo se disminuyó con un Homogenizador marca IKA, modelo T25 Basic a una velocidad de 11,000 rpm, durante 30 segundos. En casos positivos de actividad lipolítica se observa un halo translúcido alrededor de las colonias, resultado de la hidrólisis de la tributirina.

5.2.5 Preparación de inóculo.

Para cada uno de los experimentos, que se describen en los incisos posteriores, se preparó un inóculo “overnight” de aproximadamente doce horas a partir de las chaquiras. Éste se obtuvo de colocar en un matraz erlenmeyer de 50mL con 10mL de medio BHI una chaquira e incubar a 50 °C durante aproximadamente doce horas. Para estandarizar el contenido de biomasa, se centrifugaron 1.5 mL del medio de la fermentación con en ayuda de una centrífuga Eppendorf a una velocidad de 10,000rpm, durante diez minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se lavó con solución salina isotónica (NaCl al 0.9%), se centrifugó nuevamente y se resuspendió en un volumen de solución salina igual al volumen del que provenían las células. Posteriormente se leyó la absorbancia, referida también como DO_{595nm} , en un espectrofotómetro



Milton Roy Spectronic 21D y se tomó el inóculo cuando el valor de la lectura alcanzó 0.8-0.9. En cada caso se inoculó la cantidad necesaria, hasta obtener el volumen de inóculo deseado, respetando las proporciones de 20% de inóculo líquido.

5.2.6 Determinación del crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1

A partir del medio líquido requerido para cada experimento, se tomaron muestras en diferentes tiempos de la fermentación, se centrifugaron 1.5 mL con ayuda de una centrífuga Eppendorf a una velocidad de 10,000 rpm, durante diez minutos. Se separó el sobrenadante y se almacenó para posteriores ensayos. El botón celular es tratado como en el inciso anterior, posteriormente se leyó la absorbancia, referida también como DO_{595nm} , en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D.

Otro método para determinar el crecimiento fue el conteo en placa. Se preparó un preinóculo como se explicó anteriormente y a partir de las muestras líquidas tomadas en intervalos de tiempo durante la fermentación respectiva, se realizaron las diluciones pertinentes, se inocularon en cajas petri preparadas con agar cuenta en placa divididas en cuatro cuadrantes se inocularon 10 μ l por cuadrante con una punta estéril, se incubaron por 24 horas en una Estufa Gravity Convection Incubator mod. E -71 a 37 °C y se realizó un conteo de UFC

5.2.7 Determinación de pH

Se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) con un potenciómetro Corning 340.

5.2.8 Determinación de proteína

La cantidad de proteína soluble se determinó en el sobrenadante obtenido en el inciso 5.2.6, mediante el método de Lowry-SDS modificado (Pettersen 1977^[51]), que se describe en el apéndice I



5.2.9 Estandarización del método de cuantificación de actividad lipolítica

Para lograr una estandarización del método se realizaron pruebas en diferentes sistemas, probando varios sustratos, temperaturas, pH, a diferentes tiempos. Todos estos métodos utilizan *p*-Nitrofenil ésteres como sustratos ya que la lipasa reconoce y cataliza la reacción de hidrólisis del respectivo *p*-Nitrofenil éster y libera un compuesto colorido, el *p*-nitrofenol, que en medio alcalino absorbe en la región visible a $\lambda = 410\text{nm}$. La absorción se cuantifica con espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D a $\lambda = 410\text{nm}$. Los resultados se compararon con una respectiva curva patrón. Para ajustarlo a las condiciones adecuadas se realizaron pruebas con diferentes sistemas de amortiguación, varias temperaturas así como diferentes largos de cadena en los sustratos. Algunas de variables más importantes de estos ensayos se sintetizan en la tabla 5.2

Finalmente se eligió como la mejor opción el *p*-Nitrofenil Acetato, $6\ \mu\text{M}$, en buffer de fosfatos pH 7.2 con Tritón 0.1% el ensayo de lleva a cabo a temperatura ambiente. Se colocan $900\ \mu\text{L}$ de la muestra, de ser necesario se diluye con el mismo buffer, y se añaden $100\ \mu\text{L}$ del sustrato, se lee la absorbancia a 410nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21D (Apéndice II). Este método es muy similar al utilizado por Isobe et. al. 1988. ^[26]

Otra manera de observar la actividad lipolítica cualitativamente fue con el uso de α -Naftil acetato, como sustrato y Fast Red para poder observar la hidrólisis del sustrato, donde la actividad lipolítica se manifiesta con un color rojo marrón en la reacción.

Tabla 5.2. Variables consideradas en la estandarización del método para cuantificación de la actividad lipolítica

SUSTRATOS	SISTEMAS AMORTIGUADORES	T°C	SOLVENTES ORGÁNICOS	OTROS
<i>p</i> -Nitrofenil Acetato	Fosfatos (pH 7.0-7.5)	T.amb	Metanol	Desoxicolato
<i>p</i> -Nitrofenil Butirato		337°C	Etanol	Goma arábica
<i>p</i> -Nitrofenil Caprotato	CHES (9.0-10)	550°C	Acetona	Tritón
<i>p</i> -Nitrofenil Laurato		660°C	2-Propanol	Na ₂ CO ₃
<i>p</i> -Nitrofenil Palmitato	CAPS (9.0-10.0)			



5.3 Etapa I optimización del medio de cultivo, exploración de variables, “Uno a la vez”

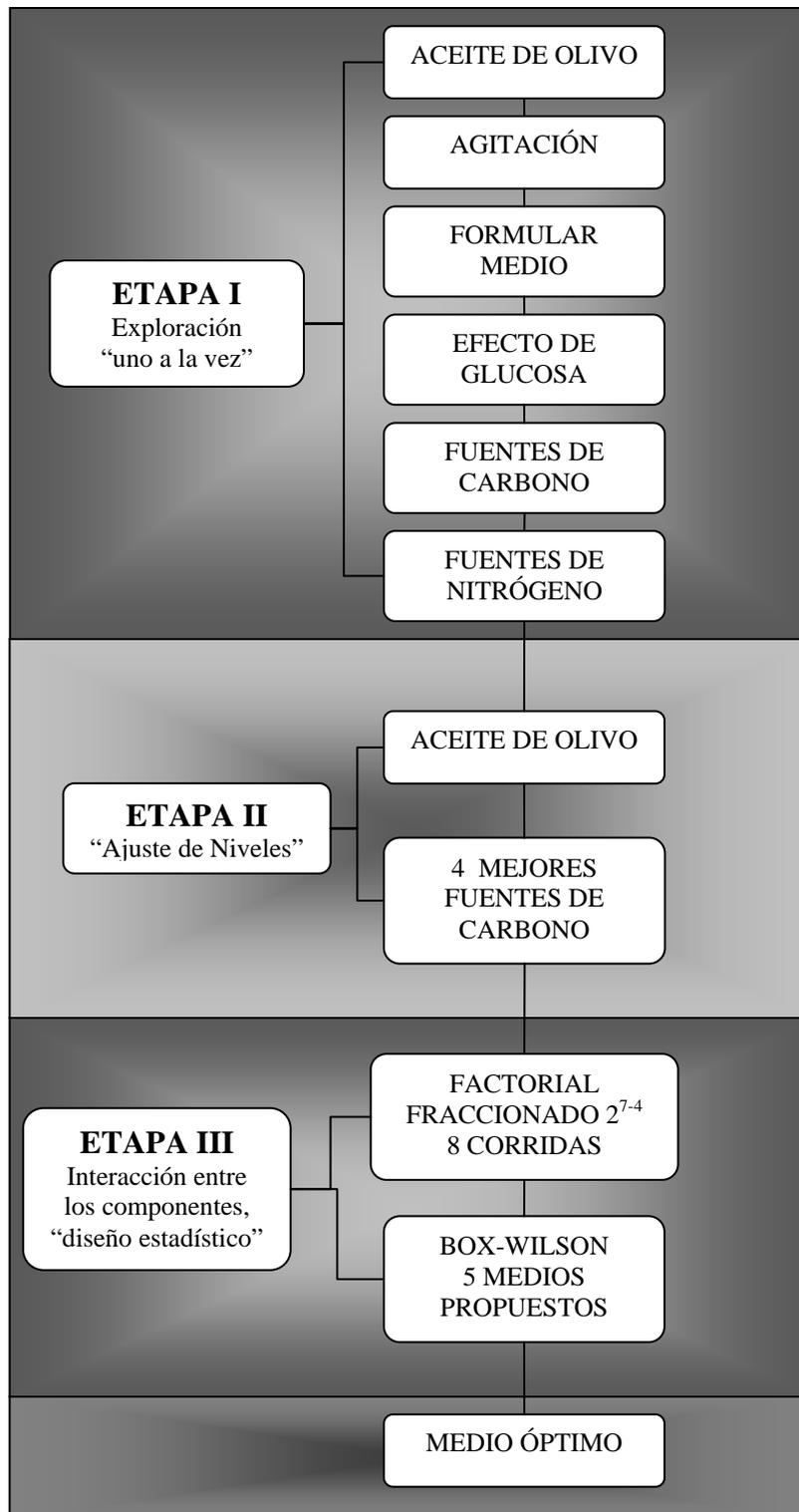


Figura 5.1 Estrategia seguida para llegar a la optimización del medio de cultivo para la obtención de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1



Para llegar a la optimización del medio de cultivo, se siguió la estrategia mostrada en la figura 5.1, que consiste básicamente en tres etapas. La primera tiene como objetivo encontrar el efecto de cada componente por separado; la segunda, ajustar el nivel adecuado de los dos principales componentes con efecto positivo (en este caso, el aceite de olivo y la fuente de carbono) y la tercera muestra la interacción entre los componentes mediante un diseño estadístico y, de acuerdo al modelo presentado, proponer la formulación del medio óptimo.

5.3.1 Generalidades de experimentos

Se llevaron a cabo en tubos de tapón de rosca con 8ml de medio y a cada uno se le añaden 2 mL de preinóculo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, en todos los casos de lleva a cabo las mediciones de los incisos (5.2.6-5.2.9), es decir, curva de crecimiento, pH, proteína soluble y actividad lipolítica.

Además se realizó análisis estadístico en la cuantificación de proteína y actividad lipolítica para observar si existió diferencia significativa (F de Fisher)

5.3.2 Efecto de la presencia de aceite de olivo

Se realizaron dos fermentaciones. La primera de ellas fue simplemente el medio base, es decir BHI, mientras que la otra fue el mismo medio pero adicionado de 1% de aceite de olivo. El aceite se incorporó con un homogenizador marca IKA, modelo T25 Basic a una velocidad de 11,000 rpm durante 30 segundos. Ambos medios se incubaron de manera estática a una temperatura de 50 °C durante 24h.

5.3.3 Efecto de la agitación

Estos experimentos se llevaron a cabo en medio de cultivo BHI a una temperatura de 50 °C. Una de las fermentaciones se incubó de manera estática, mientras que la otra se sometió a agitación a una velocidad de 150 rpm. Ambas se incubaron durante 24h. Estos experimentos no contienen aceite de olivo.



5.3.4 Formulación de un medio similar a BHI

Con la finalidad de poder variar en experimentos posteriores cada componente del medio por separado, fue necesario formular un medio base similar al medio BHI, así que se preparó un medio cuya composición se muestra en la tabla 5.3 Ambos medios se prepararon en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.2; Ambo fueron inoculados y se cuantificaron los parámetros necesarios en diversos tiempos, se corroboró que no existiera diferencia significativa entre ellos. La fermentación se llevó a cabo de manera estática a 50 °C durante 24h.

Tabla 5.3 Composición del medio formulado y BHI Difco.

BHI (DIFCO)		MEDIO FORMULADO	
COMPONENTE	g/L	COMPONENTE	g/L
Infusión cerebro ternero 200g	7.7	Extracto de Carne (OXOID)	17.5
Infusión corazón de buey 250g	9.8		
Peptona Proteasa	10.0	Peptona Proteasa (DIFCO)	10.0
Dextrosa	2.0	Dextrosa (BAKER)	2.0
NaCl	5.0	NaCl (BAKER)	5.0
Na ₂ HPO ₄	2.5	Na ₂ HPO ₄ (BAKER)	2.5

5.3.5 Efecto de la glucosa en la producción de lipasa

A partir del medio formulado se modificó la concentración de glucosa para observar si ejercía algún efecto negativo en la producción de lipasa por *Bacillus pumilus* GMA1, para lo que se probaron concentraciones de 0, 1, 2, 4 y 6 g/L. Estas fermentaciones se incubaron a una temperatura de 50 °C, con agitación a 150 rpm, ya que la agitación probó tener un efecto positivo; la fermentación se detuvo a las 24h. A pesar de que el aceite de olivo presentó un efecto positivo, en este experimento no se adicionó para facilitar el manejo de los medios.

5.3.6 Efecto de Fuentes de carbono

Para encontrar la fuente de carbono que mejor respondiera al objetivo del proyecto, se analizaron las mostradas en la tabla 5.4. Todas se probaron a la



misma concentración, 1g/L que fue la concentración que ofreció los mejores resultados en el caso de la evaluación de glucosa además todos los medios están adicionados de 1% de aceite de olivo ya que probó tener un efecto positivo. Los experimentos se llevaron a cabo en el medio formulado como base, se incubaron a una temperatura de 50 °C durante 24h, con agitación de 150 rpm

Tabla 5.4. Fuentes de carbono utilizadas en la optimización del medio de cultivo

FUENTES DE CARBONO
Dextrina amarilla
Almidón soluble
Glicerol anhidro
Dextrosa Anhidra en polvo
Maltosa
D (+)-Galactosa
d- Manitol
Lactosa
Sacarosa
D-Sorbitol

5.3.7 Efecto de fuentes de nitrógeno

Con la concentración y fuente adecuada de carbono encontrada hasta este punto (1g/L de glicerol) se modificó el medio formulado, esta vez sustituyendo las fuentes de nitrógeno por las mostradas en la tabla 5.5. Diversos autores ^[14] ^[71] ^[74] han encontrado diferencia significativa entre el uso de fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico con respecto a la actividad lipolítica mostrada, por lo que se siguió este criterio para realizar las formulaciones en este paso. Los medios contienen 1% de aceite de olivo y la fermentación se llevó a cabo durante 24h, a 50 °C y con agitación de 150 rpm.



Tabla 5.5. Fuentes de nitrógeno utilizadas en la optimización del medio de cultivo

ORGÁNICAS	MEZCLA DE INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS
A Extracto de Carne 17 g/L Peptona de Proteasa 10 g/L	D Extracto de Carne 15.5 g/L Peptona de Proteasa 9 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 5.0g/L
B Extracto de Carne 15.5 g/L Peptona de Proteasa 9 g/L Extracto de Levadura 2.5 g/L	
C Extracto de Carne 14.0 g/L Peptona de Proteasa 8.0 g/L Extracto de Levadura 5.0 g/L	E Extracto de Carne 14.0 g/L Peptona de Proteasa 8 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 5.0 g/L

5.4 Etapa II niveles de concentración de fuentes de carbono y aceite de olivo

5.4.1 Generalidades

En este punto se realizó un escalamiento del sistema, ya que las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de medio y 20% de inóculo.

5.4.2 Niveles de aceite de olivo

Para verificar el efecto inductor del aceite de olivo sobre la producción de enzima, así como el nivel mínimo necesario para conservar este efecto, se probaron concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 1% de aceite de olivo. Estos experimentos se realizaron utilizando como base el medio formulado y las variante hasta este punto encontradas: 1g/L de glicerol como fuente de carbono, se utilizó la combinación "E" como fuente de nitrógeno y la glucosa se redujo a 1g/L, la fermentación se llevó a cabo durante 24 h, a 50 °C y con agitación a 150 rpm.

5.4.3 Niveles de concentración de fuentes de carbono

Hasta este punto se utilizó glicerol en concentración de 1g/L sin embargo en el inciso 5.3.6 se encontraron como mejores fuentes de carbono: glicerol,



manitol, sorbitol y galactosa. En este paso se comparó el efecto de la concentración de las cuatro fuentes de carbono respecto a la producción de lipasa. Las concentraciones utilizadas fueron 1, 5, 10 y 15 g/L. Fue necesario esterilizar la fuente de carbono por medio de un filtro Millex con membrana de 22 μ m para así evitar que el calor causara la degradación del compuesto. Se utilizó como medio base el medio formulado y las variantes hasta este punto encontradas, incluyendo 0.2% de aceite de olivo.

5.5 Etapa III Diseño estadístico de experimentos

5.5.1 Diseño Factorial Fraccionado a 2 niveles 2^{7-4}

Una vez que se encontraron los efectos causados por agitación, aceite de olivo, glucosa, diversas fuentes de carbono, y fuentes de nitrógeno; se prosiguió a la Etapa II, donde el objetivo fue encontrar la concentración óptima de las fuentes de carbono así como la del aceite de olivo, que fueron las variables que presentaron mejores resultados. Al tener estos resultados se continuó con la etapa III, que consistió en realizar un diseño factorial (Tabla 5.6) que involucró los mejores resultados obtenidos hasta este punto y las interacciones que habría entre ellos a diferentes concentraciones. En la tabla 5.7 se muestran los detalles del diseño factorial Fraccionado 2^{7-4}

Tabla 5.6. Diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

COMPONENTE→	A	B	C	D	E	F	G
CORRIDA↓							
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+



Tabla 5.7. Detalles del diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

COMPONENTE	NIVEL BASAL	TAMAÑO DE PASO	CONCENTRACIÓN (g/L) / (mL/L)		
			-	+	
GLUCOSA	A	0.5	50%	0	1.0
ACEITE DE OLIVO	B	1.0	50%	0	2.0
GLICEROL	C	10.0	50%	5	15.0
SULFATO DE AMONIO	D	2.5	50%	0	5.0
EXTRACTO DE LEVADURA	E	2.5	50%	0	5.0
EXTRACTO DE CARNE	F	15.5	10%	14	17.0
AGITACIÓN	G	75	50%	0	150rpm

5.6 Electroforesis

5.6.1 Geles TSDS-PAGE

Durante el proceso de optimización del medio para la obtención de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, tanto para corroborar la presencia de la enzima como para corroborar el aumento o disminución de la producción de enzima, se realizaron geles de TSDS-PAGE con poliacrilamida al 15% (tabla 5.8), que fueron teñidos con azul de coomassie; se utilizaron marcadores de ultra-bajo peso molecular, cuyo rango se encuentra en 26,600 a 1,060 Da. Todos los reactivos y equipos utilizados fueron de la marca Biorad.

Las muestras cargadas en estos geles, pueden haber sido tratadas con DTT, añadido en el buffer de tratamiento de muestra, utilizado para romper los puentes disulfuro en las proteínas, o bien previamente precipitadas con TCA para limpiarlas de sales y otros compuestos que interfieren en la electroforesis.

Tabla 5.8 Composición de los geles TSDS-PAGE ^[56]

COMPONENTE	GEL SEPARADOR (15%)	GEL CONCENTRADOR (4%)
Acilamida (40%)	7.5ml	972 μ L
Buffer Tris-HCl/SDS	5MI	1.86 mL
Agua	0.9MI	4.67 mL
Glicerol 80%	1.58MI	---
Persulfato de Amonio 10%	75 μ L	40 μ L
Temed	10 μ L	4.5 μ L



5.6.2 Precipitación de proteínas con TCA (pET System Manual)

Este procedimiento se utilizó para concentrar las proteínas antes de realizar una electroforesis SDS-PAGE o TSDS-PAGE

Se agregaron 100 μ L (1/10 volumen) de TCA al 100% (p/v) a 1 mL de medio y se agitó continuamente por 15 segundos. Se dejó reposar en hielo por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se desechó, el pellet se lavó con acetona 2 veces y se centrifugó; posteriormente se dejó secar en la campana durante 1 hora. El precipitado se resuspendió en un volumen conocido de buffer de fosfatos pH 7.2 0.05 M

5.6.3 Tratamiento con DTT

Ese procedimiento se utilizó para reducir los puentes disulfuro que existen en las proteínas, de modo que tengan una mejor resolución en el gel. Se añadió una solución de DTT 0.5 M en el buffer de tratamiento de la muestra en proporciones 1:1.

5.6.4 Actividad *in situ* (zimogramas)

Para la realización del zimograma, en el caso de geles en condiciones desnaturalizantes (TSDS-PAGE), es necesario lograr la renaturalización de la enzima. Para ello, después de correr la muestra en un gel de TSDS-PAGE al 15% de poliacrilamida se realizó lo siguiente:

1.- Incubar el gel en una solución buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.5 durante 30 minutos con agitación moderada constante.

2.- Cambiar el gel a una solución de fosfatos 0.1 M pH 7.5, adicionada con 5% de tritón X-100, e incubar durante 30 minutos con agitación moderada constante.

3.- Cambiar el gel a una solución buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5, adicionada con 0.01% de tritón X-100 y dejar reposar el gel en esta solución por lo menos doce horas.

Una vez realizada la renaturalización de la enzima se realizó el ensayo de actividad: se colocó el gel en la solución I, que contiene 5 mg de α -Naftil



acetato, 1.25mL de acetona y se afora a 12.5 mL con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.5 y se incuba a 50° C durante 20 min. Posteriormente se añadió la solución II, que contiene: 12.5 mg de Fast red con tritón X-100 al 0.1%, y se aforó a 12.5mL con el mismo buffer. La actividad de la enzima se detectó por la presencia de un compuesto marrón ^[33].

El método de las soluciones I y II también se aplica a muestras líquidas, en cuyo caso se tomaron 50 µL de la muestra, se añadieron 50 µL de la solución I, y se incubaron a 50 °C durante 20 minutos; transcurrido el tiempo, se añadieron 50 µL de la solución II. Esta técnica se realizó en microplacas.



Capítulo 6

Resultados y Discusión

6.1 Verificación de actividad lipolítica y caracterización morfológica de *Bacillus pumilus* GMA1

Éstas se realizaron a partir de las placas de agar nutritivo con tributirina, tal como se describió en la sección de metodología. En la figura 6.1 se muestra la presencia del halo translúcido característico de las colonias con actividad lipolítica. En la tabla 6.2 se resumen las características macroscópicas de las colonias producidas por *Bacillus pumilus* GMA1 en este medio. Además en la tinción Gram se obtuvo Gram positivo.

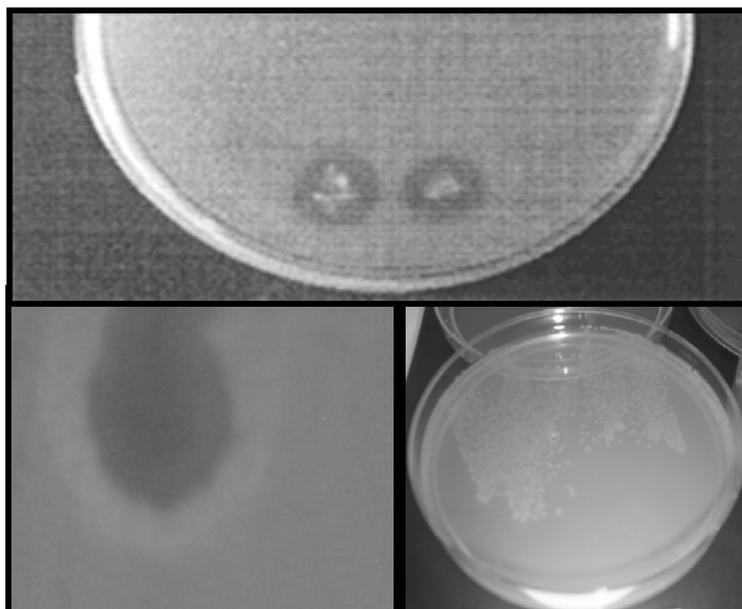


Figura 6.1 Halo translúcido alrededor de las colonias indicador de actividad lipolítica; 24 horas. Cultivado a 37°C



Tabla 6.2. Características de las colonias de *Bacillus pumilus* GMA1 en medio sólido, agar con tributirina al 0.5%

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS COLONIAS	
Color	Amarillo Claro
Forma	Redonda
Textura	Lisa
Aspecto	Cremoso, butírico
Tamaño	1.5-2.5 mm
Elevación	Mínima
Formación de Halos	Positivo

6.2 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas a *Bacillus pumilus* GMA1 con la ayuda del Kit 50 API CHB/E arrojaron como resultado un 99% de identidad con *Bacillus pumilus*, que es el resultado esperado, pues esta cepa fue caracterizada por Bustos1995 [10]. Los resultados de la galería API CHB/E se muestran en la tabla 6.3. Estos resultados son comparativos con los de la tabla 3.2 obtenidos por Bustos 1995 [10]. Este análisis se realizó únicamente para tener la certeza de que se estaba trabajando con la misma cepa, no con fines de caracterización.

Tabla 6.3. Pruebas bioquímicas realizadas a *Bacillus pumilus* GMA1 con el Kit API/CHB/E

PRUEBA/ RESULTADO	PRUEBA/ RESULTADO	PRUEBA/ RESULTADO	PRUEBA/ RESULTADO	PRUEBA/ RESULTADO	
Testigo	-	Inositol	-	D-Rafinosa	-
Glicerol	+	D-Manitol	+	D-Melezitosa	-
Eritrol	-	D-Sorbitol	+	Almidón	-
D-Arabinosa	-	Metil- α D-Manopiranosida	-	Glicógeno	-
L-Arabinosa	+	Metil- α D-Glucopiranosida	+	Xilitol	-
D-Ribosa	+	N-Acetilglucosamina	-	Gentibiosa	-
D-Xilosa	+	Amigdalina	+	D-Turanosa	+
L-Xilosa	-	Arbutina	+	D-Lixosa	-
D-Adonitol	-	Esculina Citrato Férrico	+	D-Tagatosa	+
Metil- β D-Xilopiranosida	-	Salicina	+	D-Fucosa	-
D-Galactosa	+	D-Celobiosa-	+	L-Fucosa	-
D-Glucosa	+	D-Maltosa	+	D-Arabitol	-
D-Fructosa	+	D-Lactosa (Bovina)	-	L-Arabitol	-
D-Mamnosa	+	D-Melibiosa	-	Gluconato Potásico	-
L-Sorbosa	-	D-Sacarosa	+	2-Cetogluconato Potásico	-
L-Rhaminosa	-	D-trehalosa	+	5-Cetogluconato Potásico	-
Dulcitol	-	Inulina	-		



6.3 Estandarización del método de cuantificación de actividad lipolítica

Para comparar la actividad lipolítica en todos los experimentos se tomó en cuenta la actividad máxima, que se alcanza a las 24h de fermentación. Estas mediciones se realizaron en el extracto crudo obtenido en el inciso 5.2.6 a partir del medio BHI.

Para encontrar el método ideal para la cuantificación de actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* GMA1, primero se realizaron barridos de diferentes solventes con sustratos de diferentes largos de cadena. El objetivo en este paso fue identificar el sustrato más conveniente, de acuerdo a su solubilidad y estabilidad, como fue el caso del *p*-Nitrofenil acetato y el *p*-Nitrofenil Butirato. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 6.4

Tabla 6.4. Solubilidad y estabilidad de diferentes *p*-Nitrofenil ésteres en concentración 5 mM

SOLVENTE <i>p</i> -Nitrofenil-	Metanol	Etanol	2-propanol	Acetona	Buffer CAPS pH 8.5	Buffer Fosfatos 0.05M, pH 7.5
Acetato	***/++	***/++	***/++	***/++	***/++	***/+++
Butirato	***/+	***/+	***/+	***/+	***/+	***/++
Caproato	**/++	**/++	**/++	**/++	**/++	**/++
Decanoato	**/++	***/++	***/++	**/++	**/++	**/++
Laurato	**/++	**/++	**/++	**/++	***/+	**/+
Palmitato	*/+	*/+	**/+	**/+	**/+	**/+

* Insoluble ** Parcialmente Soluble ***Soluble

+ Inestable ++ Parcialmente estable +++ Estable

Posteriormente, con los sustratos más estables, se realizaron ensayos a diferentes temperaturas y se le adicionaron otros componentes para estabilizar el sistema, tales como tritón, goma arábica y desoxicolato. El método al que finalmente se llegó se explica con detalle en el apéndice II.



6.4 Crecimiento del microorganismo

En los dos métodos utilizados para monitorear el crecimiento del microorganismo, se observó que la fase logarítmica abarca el período comprendido entre 2 y 10 horas, y después alcanza la fase estacionaria. En la gráfica 6.5 se presentan los valores en términos de Absorbancias a 595 nm y en UFC/mL, respectivamente.

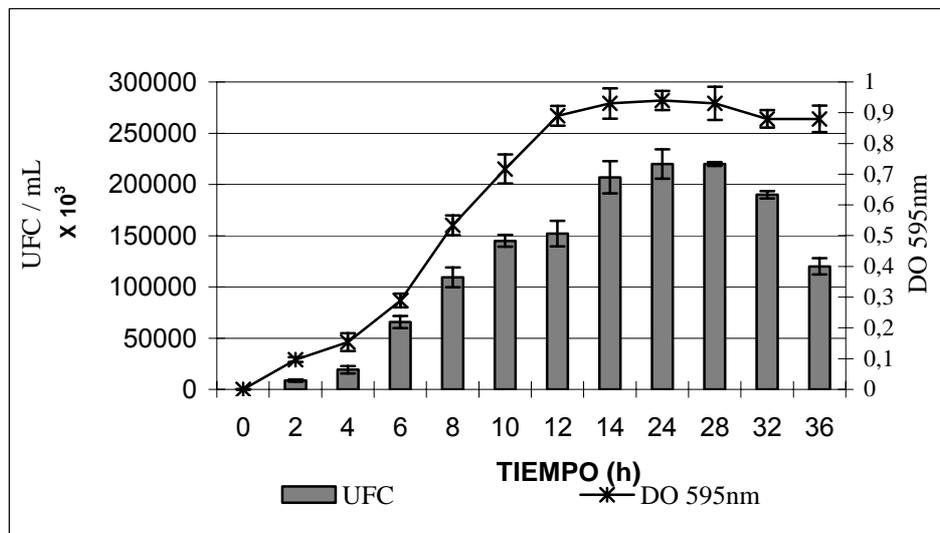


Figura 6.5 Curva de crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 en medio BHI, condiciones estáticas a 50°C

6.5 Etapa I: Exploración de componentes en el medio “uno a la vez”

6.5.1 Efecto de presencia de aceite de olivo

En la gráfica 6.6 se observa que la adición de aceite de olivo al 1% ejerce un efecto positivo en el crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 a partir de las diez horas. Este efecto indica que el aceite de olivo mejora el crecimiento del microorganismo, ya que es muy probable que también funcione como fuente de carbono. En un experimento posterior se ajusta la concentración del aceite de olivo, ya que esta etapa fue sólo de exploración de variables.

También en la gráfica 6.6 se puede apreciar el cambio en el pH que refleja la actividad metabólica del microorganismo. Estos gráficos son inversamente proporcionales a la curva de crecimiento: conforme crece más el microorganismo produce más metabolitos ácidos causando la disminución del pH. En general se



apreció la misma tendencia en ambos experimentos: un ligero descenso del pH, pues el medio se encuentra preparado con amortiguadores de fosfatos que evita la caída brusca del pH.

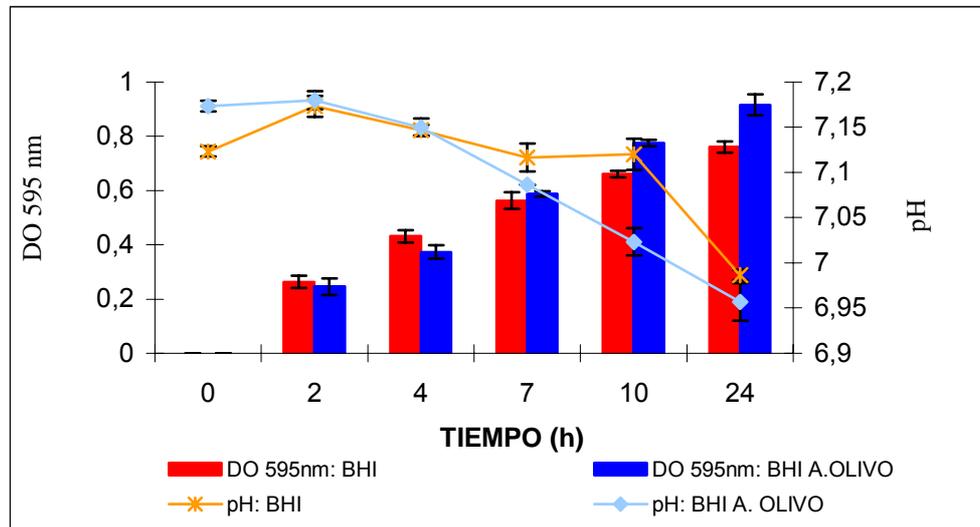


Figura 6.6 Curva de crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 y cambio de pH de en medio BHI y BHI adicionado con 1% de Aceite de oliva en función del tiempo

Cuando las condiciones de cultivo fueron estáticas y se empleó una temperatura de incubación de 50 °C, así como el medio de cultivo BHI (figura 6.7), se observa que no hay diferencia significativa en la producción de proteína soluble si se añade o no aceite de oliva al 1% (v/v). La actividad lipolítica se induce en presencia de aceite de oliva y alcanza un máximo de 4.33 U/mL en comparación con las 2.17 U/mL que presenta en ausencia de aceite de oliva, Por tanto, cuando se compara la actividad específica se observa que es de 0,075 U/mg en ausencia de aceite y de 0.149 U/mg en presencia de 1% de aceite de oliva, se puede afirmar que el aceite de oliva es un inductor (datos no mostrados en la grafica). Más adelante se confirma esta suposición con geles de TSDS-PAGE.

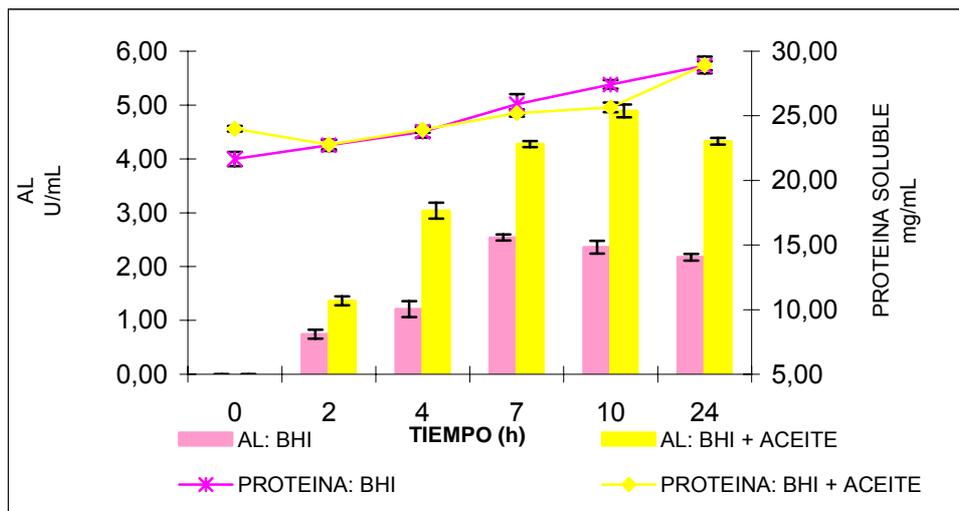


Figura 6.7 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica en los medios BHI y BHI adicionado con 1% de Aceite de oliva cultivado a 50 °C en función del tiempo

6.5.2 Efecto de la agitación

Estos experimentos se llevaron a cabo en medio BHI a 50 °C durante 24h. No se observó diferencia significativa en el crecimiento del microorganismo (Figura 6.8). Así mismo, no se observó diferencia significativa en cuanto al cambio de pH: ambos poseen la misma tendencia, por el uso de amortiguadores de fosfatos que evitan la caída brusca del pH.

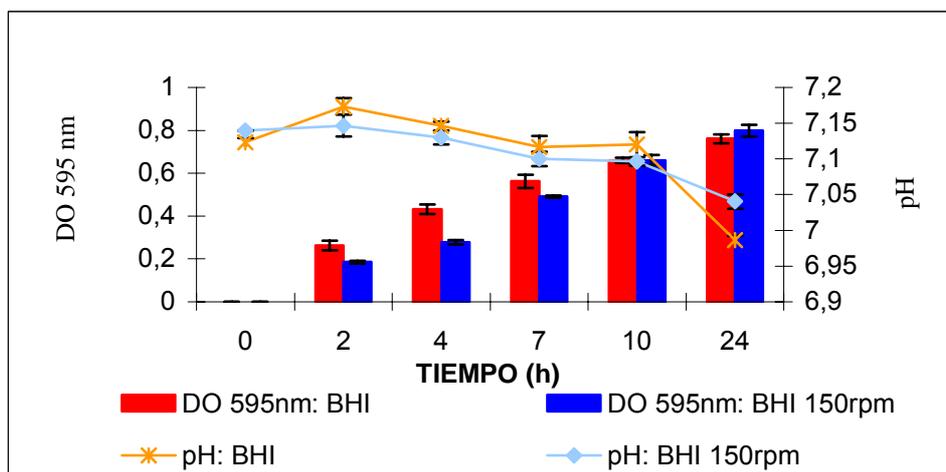


Figura 6.8 Curva de crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 y cambio de pH de en medio BHI, con y sin agitación en función del tiempo

La producción de proteína no muestra diferencia significativa entre ambos ensayos. La actividad lipolítica no está ligada al crecimiento: a pesar de que el



crecimiento es el mismo en ambos sistemas, hay mayor actividad lipolítica en el sistema agitado desde las 7 horas (3.81 U/mL) que en el sistema estático en el mismo lapso (2.54 U/mL). Este efecto ha sido reportado por autores como Essamri 1998 [18]. La actividad específica máxima en el sistema agitado se alcanzó a las 7 horas, con 0.160 U/mg, mientras que en el sistema no agitado fue de 0.100 U/mg, En ambos casos no existe diferencia significativa en los tiempos de 7,10 y 24 h de crecimiento.

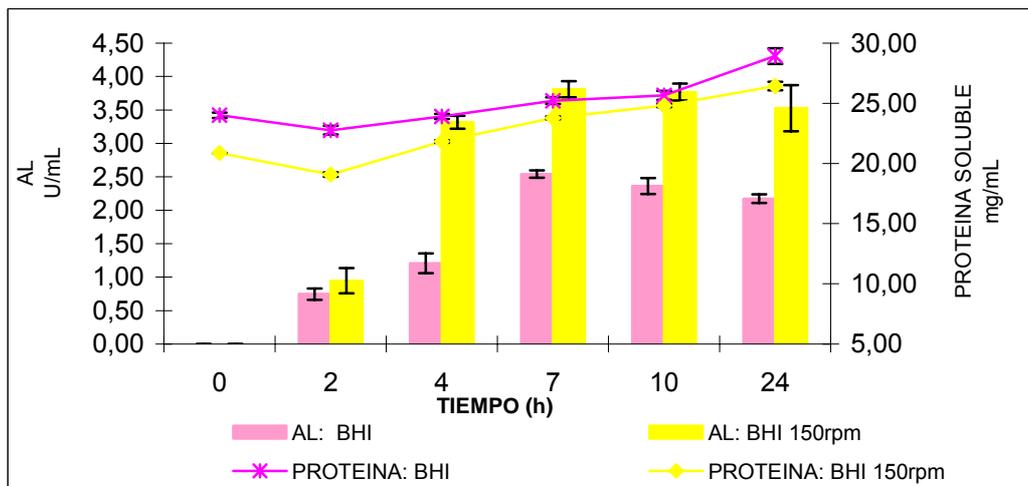


Figura 6.9 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica en los medios BHI y BHI con agitación

6.5.3 Medio Formulado

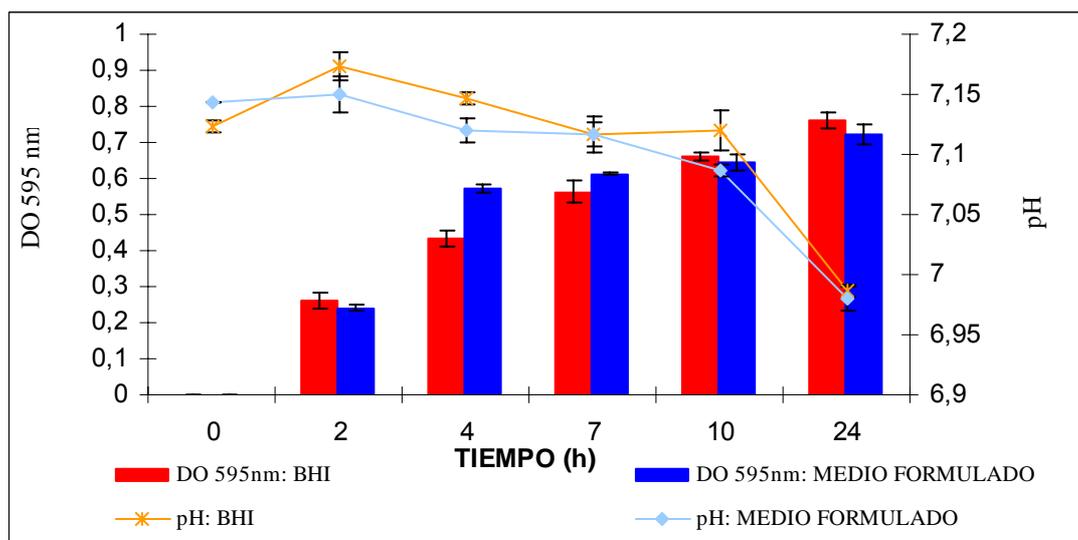


Figura 6.10 Curva de crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 y cambio de pH en medio BHI y medio formulado en función del tiempo



Con la finalidad de variar los componentes del medio por separado, se requirió formular un medio similar a BHI, que es el medio de donde se partió. Se realizaron los mismos ensayos en BHI y se compararon con el medio formulado, ambos sin aceite de olivo y sin agitación. No existió diferencia significativa en ninguna de las variables cuantificadas, que fueron crecimiento, pH, proteína soluble y actividad lipolítica (figuras 6.10 y 6.11).

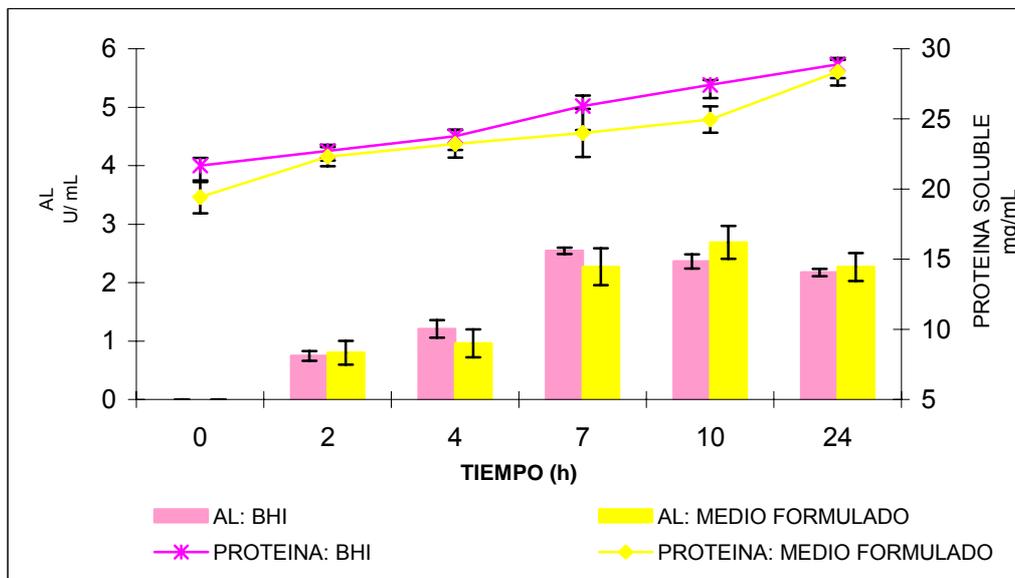


Figura 6.11 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica en los medios BHI y formulado en función del tiempo

6.5.4 Efecto de glucosa

En la figura 6.12 se observa la aparición de un leve punto de inflexión en la curva de crecimiento entre las 4 y 5 horas. Este tipo de gráficas son características del fenómeno ocurrido cuando se agota un sustrato, o cuando hay algún metabolito que impide o retrasa el crecimiento del microorganismo conocido como diauxia, efecto que se presenta en la ausencia de glucosa. El crecimiento del microorganismo es proporcional a la cantidad de glucosa que contiene el medio, y el mayor crecimiento ocurre en el medio con 6g/L de glucosa.

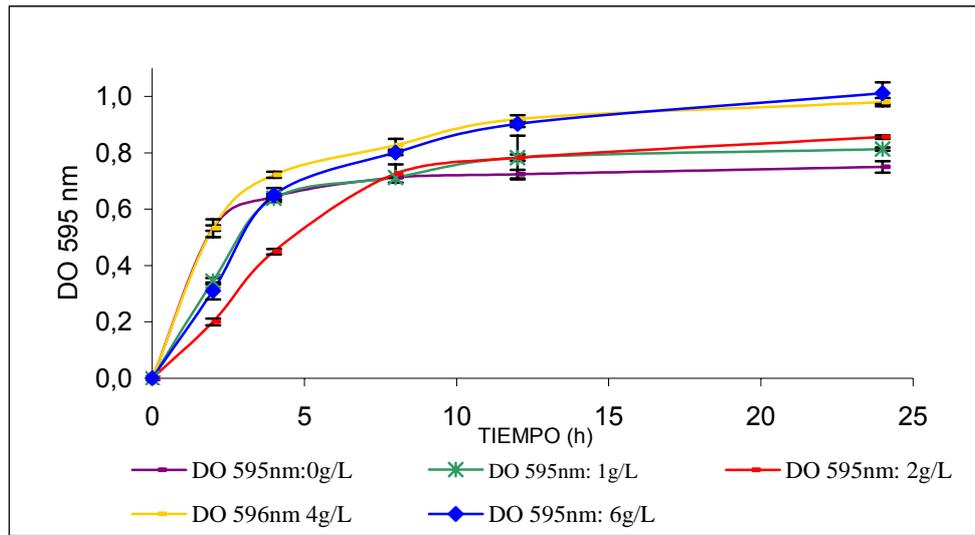


Figura 6.12 Curva de crecimiento, efecto de diferentes Concentraciones de glucosa en función del tiempo

En la figura 6.13 se observa la disminución del pH respecto al tiempo, debido a la liberación de ácidos, este efecto es mayor conforme aumenta la concentración de glucosa y no es muy drástico debido al uso del amortiguador de fosfatos.

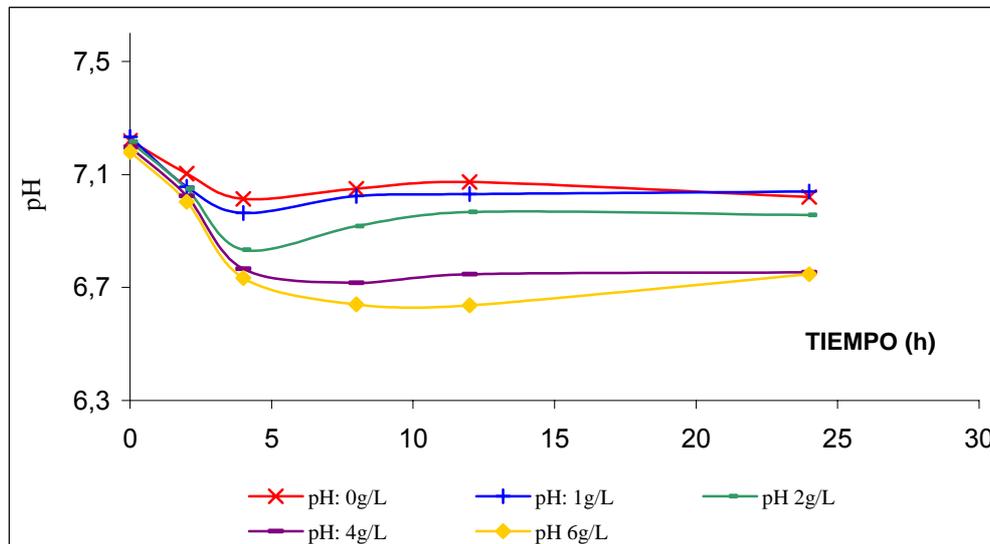


Figura 6.13 Efecto de glucosa en diferentes concentraciones respecto al cambio de pH en función del tiempo

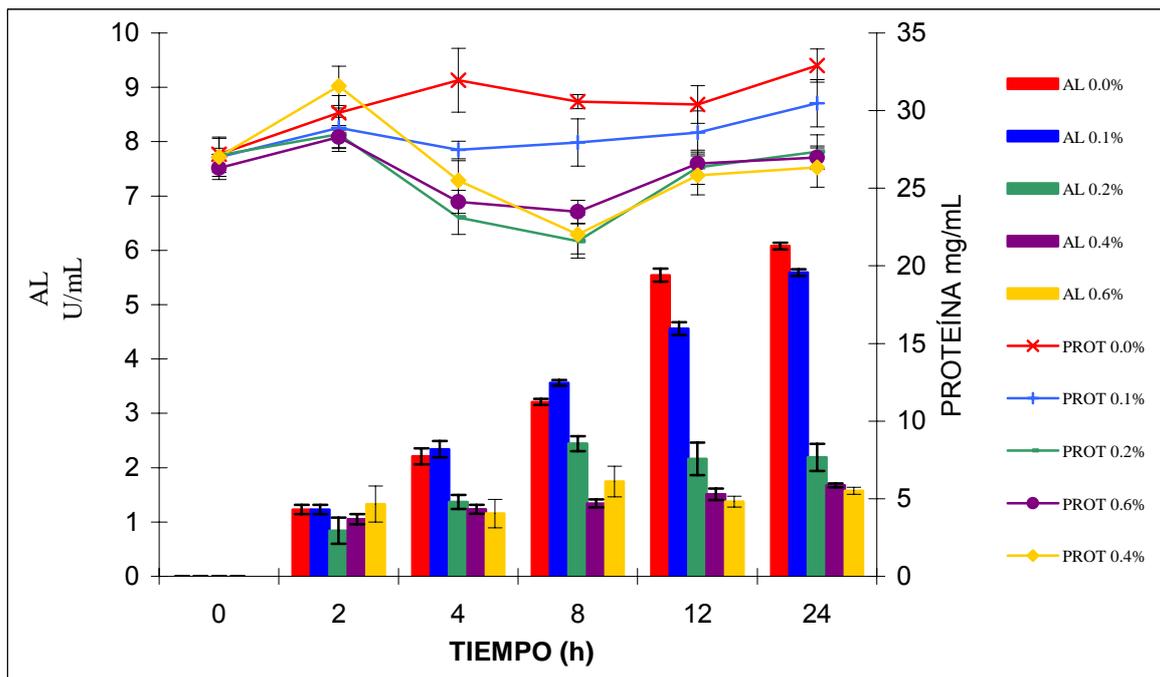


Figura 6.14 Proteína soluble y actividad lipolítica en medio formulado con diferentes concentraciones de glucosa en función del tiempo

En la figura 6.14 se aprecia que la cantidad de proteína soluble se mantiene alrededor de los 30mg/mL durante las 24 horas de monitoreo del estudio. En los casos donde contiene menor cantidad de glucosa, es decir 0 y 0.1%, la cantidad de proteína a las 24 horas se encuentra por encima de este valor mientras que es menor para los medios contienen 0.2, 0.4 y 0.6 % de glucosa. Entre las 4 y 8 horas se observa una disminución en la producción de proteína en los medios con menor concentración de glucosa. Se desconoce la causa de este fenómeno.

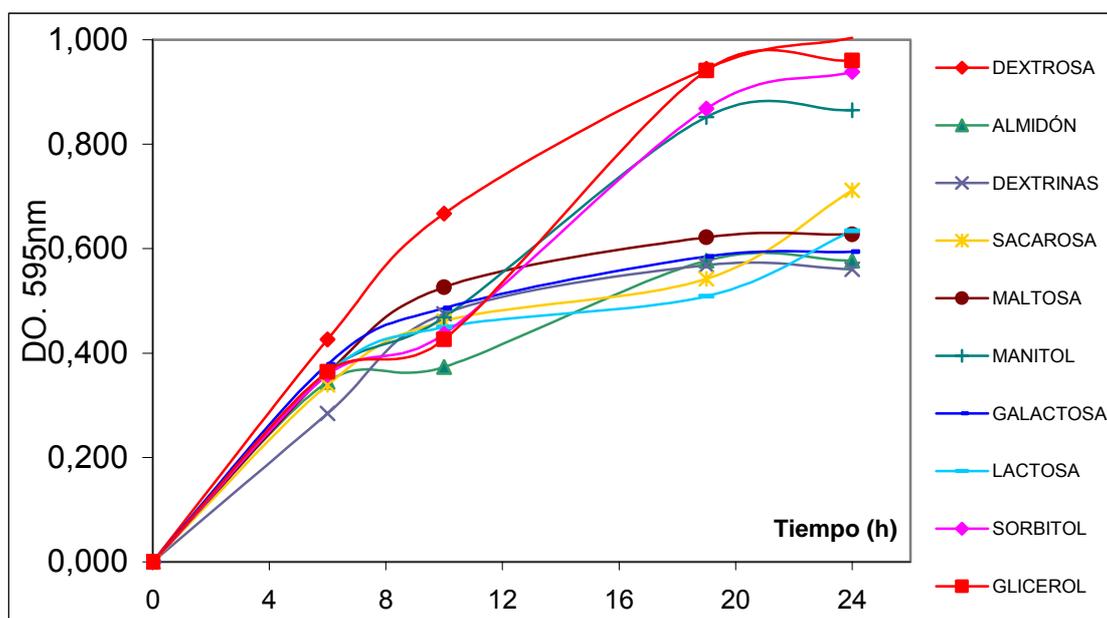
La actividad lipolítica, que se muestra, en la figura 6.14 es reprimida por la glucosa (tabla 6.15), efecto ampliamente estudiado por varios autores. Jacob y Monod propusieron un modelo para *E. coli* en el año 1965 a partir de ese descubrimiento nuevas publicaciones han surgido (Wakako 1999,^[70] Warner et al 2003^[72] y Galinger 1998^[19] entre otras) proponiendo nuevos modelos para explicar este fenómeno. En el caso de *Bacillus pumilus GMA1* este efecto se muestra en concentraciones mayores al 0.1 %, por lo que para el siguiente ensayo se seleccionó dicha concentración para las pruebas de diferentes fuentes de carbono.



Tabla 6.15. . Actividad lipolítica en diferentes concentraciones de glucosa en función del tiempo

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (%)	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA VOLUMÉTRICA U/mL	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ESPECÍFICA U/mg
0	6,02	0.185
0,1	5,63	0.183
0,2	2,13	0.081
0,4	1,66	0.059
0.6	1,62	0.061

6.5.5 Efecto de Fuentes de carbono

Figura 6.16 Crecimiento de *Bacillus pumilus* GMA1 con diferentes fuentes de carbono en función del tiempo.

En la gráfica de la 6.16 se observa que la tendencia de las curvas de crecimiento en las diez fuentes de carbono probadas se puede dividir estadísticamente en dos grupos: el primero, las de mayor crecimiento donde se encuentran los polialcoholes, como manitol, sorbitol y glicerol, así como la dextrosa o glucosa, mientras el segundo grupo incluye a las demás fuentes de carbono con valores inferiores al primer grupo. En cuanto al resultado de proteína soluble es de gran importancia mencionar que glicerol, sorbitol galactosa y manitol son los que menor cantidad de proteína soluble presentan (Figura 6.17)

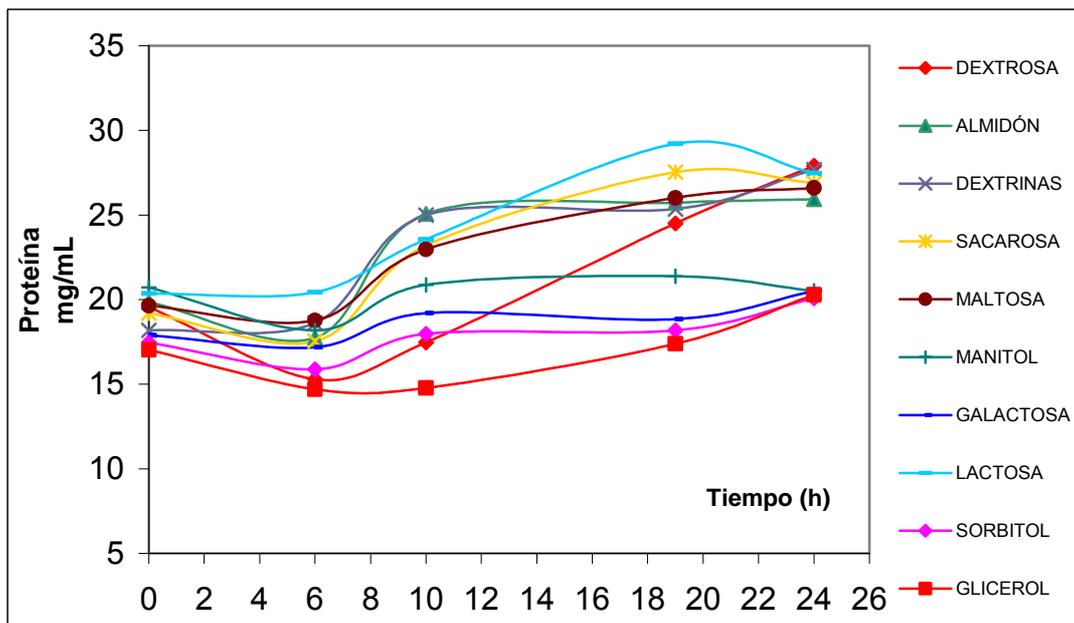


Figura 6.17 Proteína soluble producida por *Bacillus pumilus* GMA1 en presencia de fuentes de carbono en función del tiempo

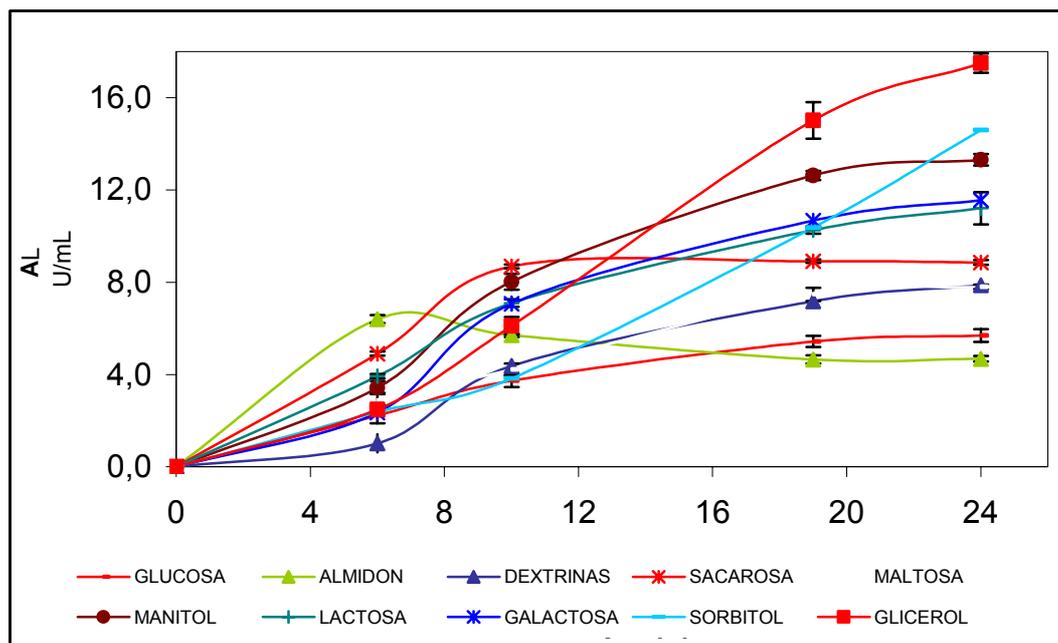


Figura 6.18 Actividad lipolítica con las diferentes fuentes de carbono en función del tiempo

Los resultados mostrados en la figura 6.18 indican que a pesar de que el glicerol fue la fuente de carbono que presentó menor proteína, es la que tuvo mayor actividad lipolítica, 17.5 U/mL, con 20.28 mg de proteína y 0.862 U/mg de actividad específica a las 24 horas. Este efecto ha sido reportado por Gupta et. al 2002^[20] también en el género *Bacillus*.



6.5.6 Fuentes de Nitrógeno

Para evaluar el efecto de las diversas fuentes de nitrógeno se fijó como fuente de carbono la que mayor actividad específica presentó, que fue glicerol 1g/L. La composición de los medios a, b, c, d, y e se describe en el inciso 5.3.7.

Para las mezclas de diversas fuentes de nitrógeno no se observó diferencia significativa en ninguno de los casos (figuras 6.19 - 6.22). Sin embargo, posteriormente se muestra que al interactuar con los demás componentes (diseños estadísticos), el extracto de carne es el que mayor efecto tuvo sobre la actividad lipolítica. La diferencia de actividad lipolítica es mínima entre las fuentes de nitrógeno de origen inorgánico y orgánico. Para experimentos posteriores se utilizó la formulación E, que contiene ambos tipos de nitrógeno, para no descartar las posibles interacciones posteriores.

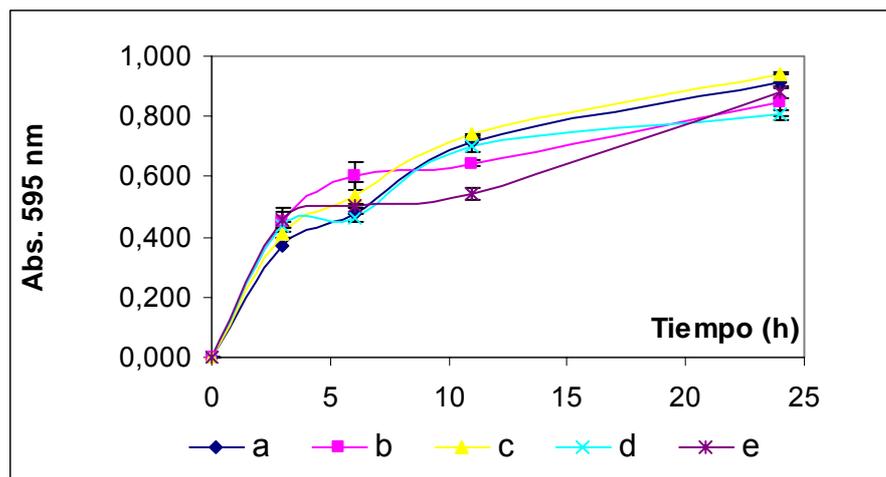


Figura 6.19. Curva de crecimiento, en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno

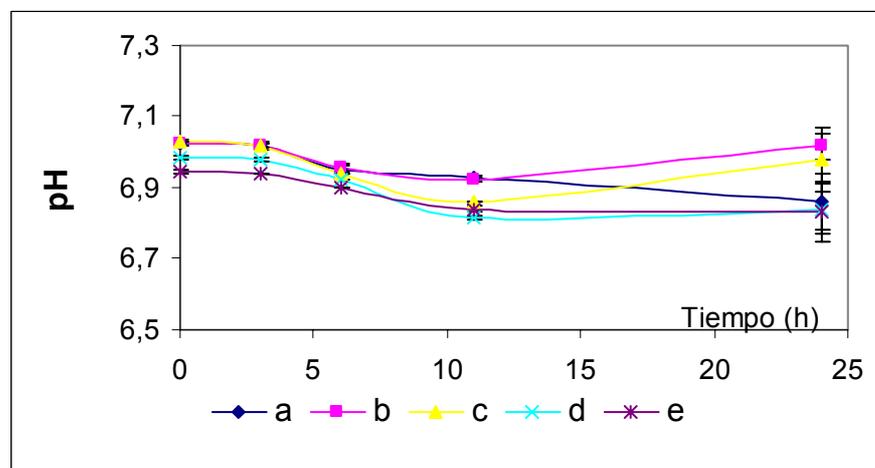


Figura 6.20 Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno respecto al cambio de pH en función del tiempo.

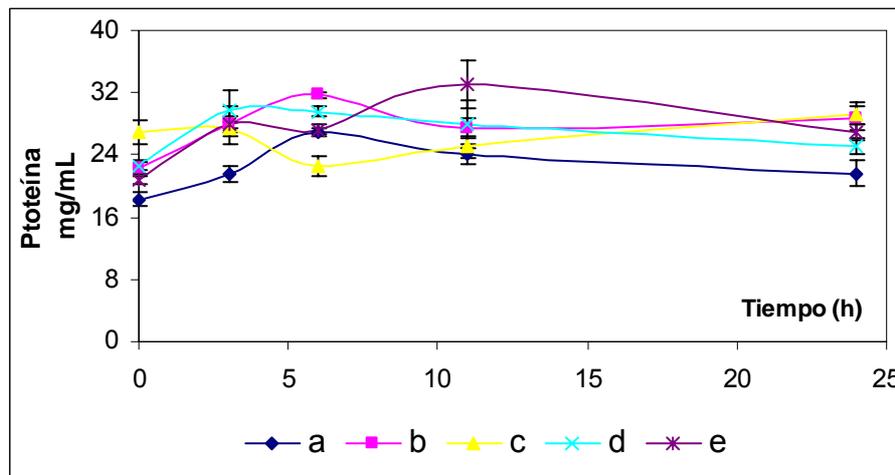


Figura 6.21 Proteína soluble producida por *Bacillus pumilus* GMA1 en presencia de fuentes de nitrógeno en función del tiempo

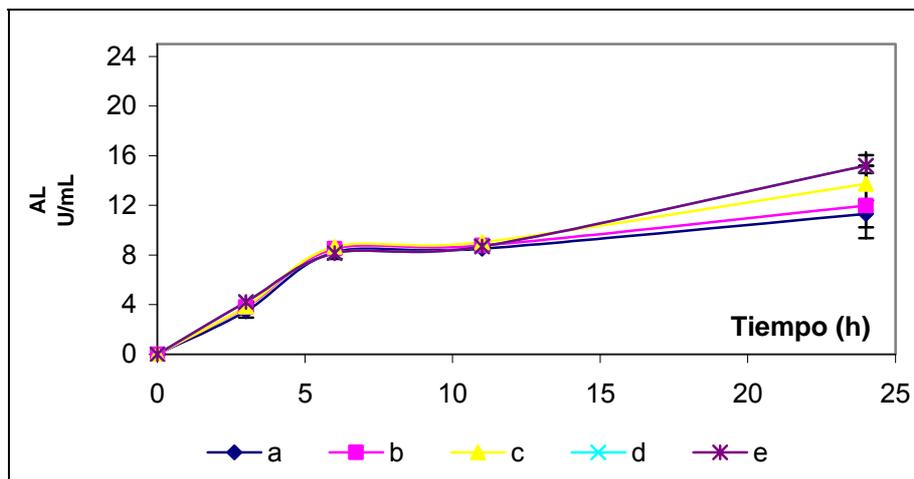


Figura 6.22 Actividad lipolítica en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno en función del tiempo

6.6 Etapa II variación de concentraciones

6.6.1 Efecto de la concentración de aceite de olivo

Una vez que se probó en la etapa I que el aceite de olivo induce la actividad lipolítica en el medio de cultivo de *Bacillus pumilus* GMA1, la siguiente etapa consistió en probar diferentes concentraciones para ajustarlo al nivel adecuado. En virtud de que la presencia de aceite en el medio dificulta la manipulación de los medios para su análisis posterior, se debe desgrasar antes de llevarlo a cabo mediante el uso de solventes orgánicos y rotavapor^[77]. Este proceso



podría dañar a la enzima, razón por lo cual se exploró el efecto de concentraciones más bajas de aceite.

En la figura 6.23 se observa que el crecimiento máximo ocurre a las 24 horas, y no hay diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de aceite, así mismo los resultados de pH se comportan de manera similar.

Los resultados de la actividad muestran un incremento notable de las 12 a las 24h, punto en el que se obtiene el valor máximo (figura 6.24). Los valores obtenidos se pueden agrupar estadísticamente en 2 grupos; en el más alto se encuentran las concentraciones de 0.2 y 0.4%, mientras que debajo de este grupo se colocan las concentraciones 0.6 y 1.0% de aceite de olivo. Esto probablemente se debe a problemas de difusión de oxígeno causados por el aceite, a pesar de que a todos los medios de cultivo se les añadió Tween 80 y el tamaño del glóbulo se disminuyó mecánicamente antes de ser utilizados. Autores como Lin et al 1995^[41] y Sztajer 1993^[60] han logrado la optimización de lipasas de *Penicillium expansum* y *P. pseudoalcaligenes* con aceite de olivo en concentraciones de 0.1 y 0.4% respectivamente.

Para el siguiente experimento se utilizó la concentración de 0.2% de aceite de olivo.

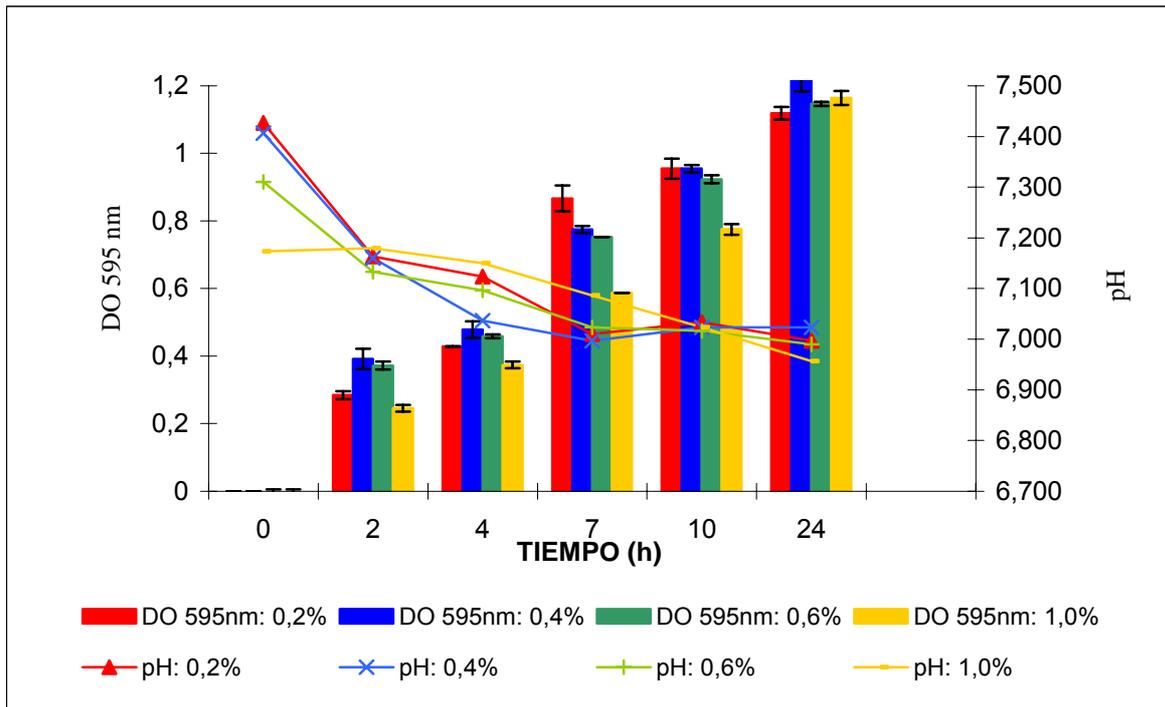


Figura 6.23 Curva de crecimiento y cambio de pH en el medio de cultivo de *Bacillus pumilus* GMA1 en presencia de diferentes concentraciones de aceite de olivo en función del tiempo.

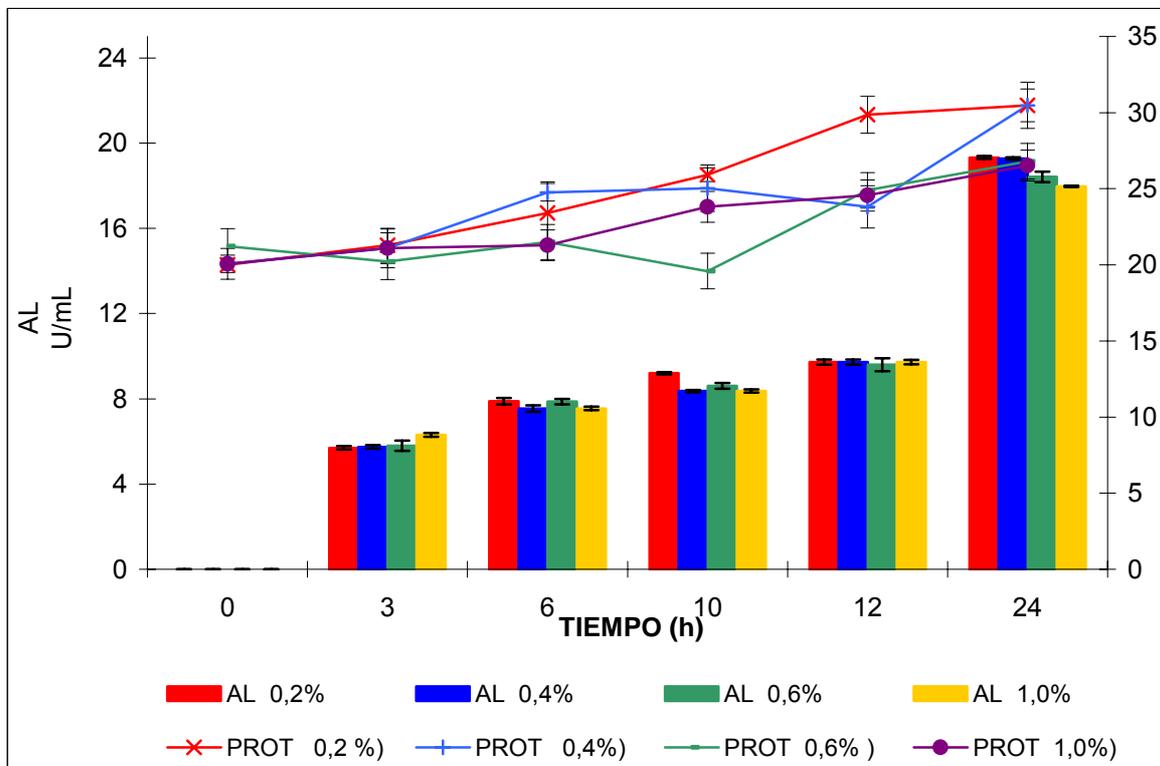


Figura 6.24 Concentración de proteína soluble y actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* GMA1 en presencia de diferentes concentraciones de aceite de olivo en función del tiempo



6.6.2 Niveles de fuentes de carbono.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el inciso 6.5.5, se probaron las fuentes con las cuales se obtuvo mayor actividad lipolítica, que fueron glicerol, manitol, sorbitol y galactosa, en 4 diferentes niveles. En los experimentos anteriores se confirmó que la actividad lipolítica máxima en este tipo de medios y a esta temperatura se presentaba a las 24 horas, por lo cual sólo se tomó muestra de ese tiempo. Los resultados se muestran en la figura 6.25 y se ve que el glicerol y el manitol, en concentraciones de 10g/L, son los que proporcionan mejores resultados, con 24,41 y 24,80 U/mL, respectivamente. Los criterios de costos llevaron a la decisión de que en el siguiente nivel experimental, que es el diseño estadístico, se empleara el glicerol en concentración de 10g/L como fuente de carbono.

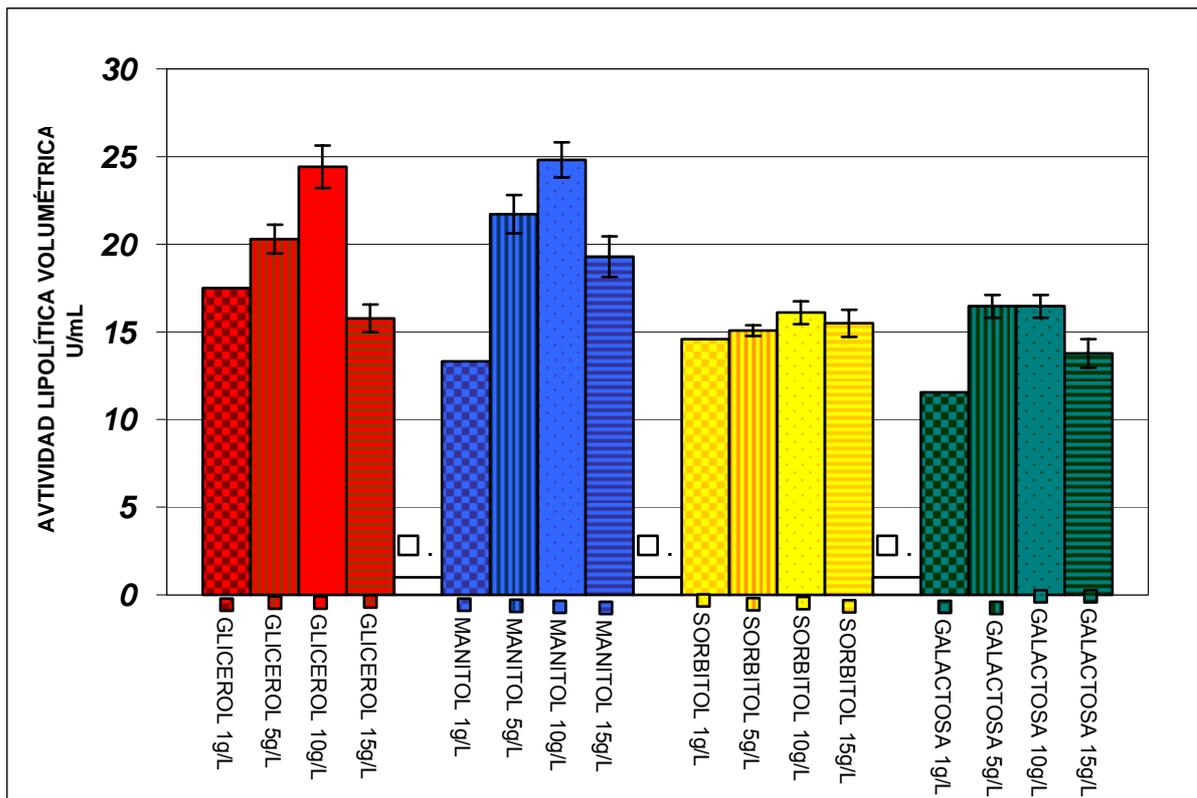


Figura 6.25. Actividad lipolítica máxima de *Bacillus pumilus* GMA1 a las 24 h, en presencia de las 4 mejores fuentes de carbono en 4 diferentes concentraciones

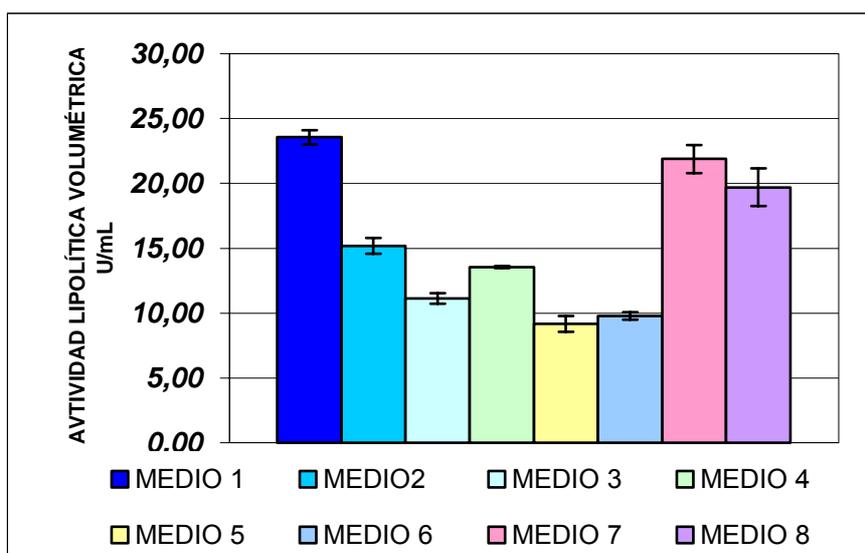


Figura 6.26 Actividad lipolítica máxima de *Bacillus pumilus* GMA1 a las 24h de cultivo en 8 corridas del diseño factorial fraccionado 2^{7-4}

Tabla 6.27: Actividad lipolítica (Y) determinada después de 24h de cultivo y coeficientes de contraste (b) para cada componente

CORRIDA (MEDIO)	A	B	C	D	E	F	G	Y (U/ml)
1	-	-	-	+	+	+	-	24
2	+	-	-	-	-	+	+	15,2
3	-	+	-	-	+	-	+	11,13
4	+	+	-	+	-	-	-	12,7
5	-	-	+	+	-	-	+	9,17
6	+	-	+	-	+	-	-	9,79
7	-	+	+	-	-	+	-	21,88
8	+	+	+	+	+	+	+	19,7
B	-1,98	2,02	-0,83	2,10	1,20	9,28	1,39	15,55

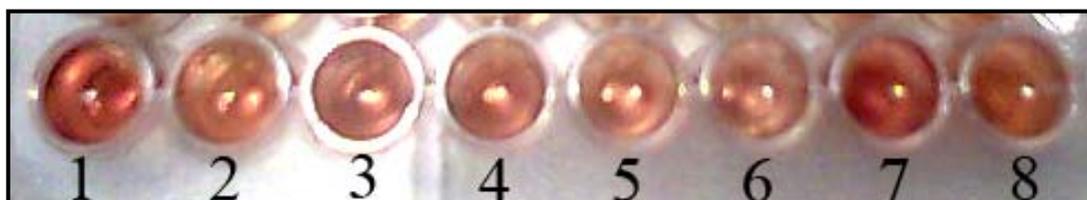


Figura 6.28 Ensayo de actividad lipolítica con α -Naftil Acetato como sustrato en las 8 corridas (medios) del diseño factorial 2^{7-4}



6.7 Etapa III: Diseño estadístico

6.7.1 Diseño Factorial Fraccionado 2^{7-4}

En la realización del diseño factorial fraccionado se utilizaron los componentes que mostraron tener mayor efecto en cuanto a la producción de lipasa. Este experimento consistió en 8 corridas, cada una de ellas correspondiente a un medio, realizado por triplicado. En este tipo de diseño se permite observar la interacción de 7 componentes (ver tabla 6.27). El valor del nivel superior (+) e inferior (-) está indicado en la tabla 5.7

La actividad lipolítica se cuantificó para cada corrida y también se calculó el coeficiente de contraste b para cada elemento para observar el efecto de cada elemento por separado, de la siguiente manera:

$$b_j = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^8 A_j Y_i$$

donde b_j = coeficiente de contraste del componente j

A_j = Nivel del componente j (+,-)

Y_i = Actividad lipolítica de la corrida i en U/mL

Los coeficientes de contraste b indican el efecto de cada componente sobre la actividad lipolítica, es decir, si éstos son positivos el efecto será positivo y por lo tanto, se aumenta la concentración de dicho componente en el siguiente experimento, y viceversa; si el valor es cercano a 0, nos indica que el nivel de ese elemento es el correcto y por lo tanto no es modificado en el siguiente experimento [8] [43]

Se obtuvo la mayor actividad lipolítica en los medios 1 (23.57U/mL) y 7 (21.88 U/mL) respectivamente (Figuras 6.26, 6.28). Calculando los coeficientes de correlación b para cada componente en las 8 corridas (tabla 6.27), se llegó a la conclusión de que los componentes A y C, correspondientes a glucosa y glicerol, deberían disminuirse en los siguientes medios propuestos, mientras que los componentes B, D, E, F y G, correspondientes a aceite de olivo, sulfato de amonio, extracto de levadura, extracto de carne y agitación, deberían aumentarse con cierta proporción en los siguientes medios propuestos. Es de importancia notar que el extracto de carne posee un $b=9.28$, lo que indica que es el componente de mayor peso frente al incremento de actividad lipolítica, efecto que



no pudo ser observado en el experimento 5.3.7-fuentes de nitrógeno -. Esto probablemente se deba a la interacción con los demás elementos y no por sí mismo. Un efecto similar fue reportado por Yasser et al 2002 [74], quienes afirman que el extracto de carne contiene aminoácidos esenciales y cofactores que necesita el microorganismo tanto para el crecimiento como para la producción de enzima. La presencia de estas formas de nitrógeno en el medio simula la formación de compuestos de metabolismo rápido.

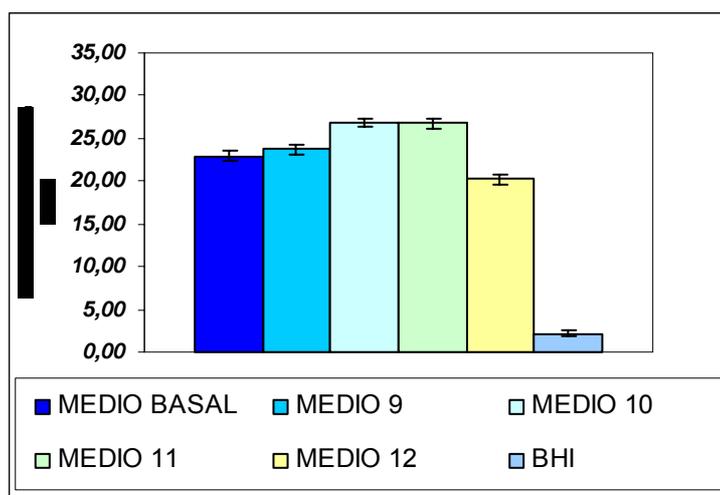


Figura 6.29 Actividad lipolítica a las 24 h de cultivo en 5 corridas del diseño Box-Wilson comparados con el medio BHI (Medio Inicial)

Tabla 6.30. Composición de los 5 medios propuestos según el diseño Box-Wilson

MEDIOS	A Glucosa	B Aceite de Olivo	C Glicerol	D Sulfato de Amonio	E Extracto de Levadura	F Extracto de Carne	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA U/mL
UNIDADES DE VARIACIÓN	-0.07	+0.15	-0.30	+0.38	+0.22	+1.0	
BASAL	0.5	1.0	10	2.5	2.5	15.5	22,96
9	0.43	1.15	9.7	2.88	2.72	16.5	23.69
10	0.36	1.3	9.4	3.26	2.94	17.5	26.87
11	0.29	1.45	9.1	3.64	3.16	18.5	26.72
12	0.22	1.60	8.8	4.02	3.38	19.5	20.19

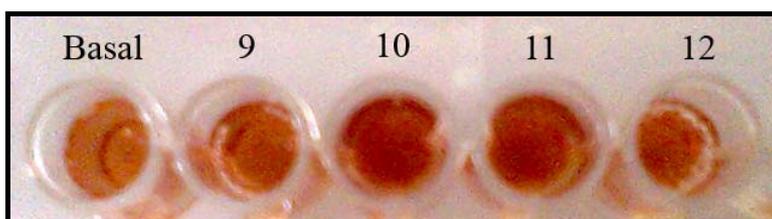


Figura 6.31 Ensayo de actividad lipolítica con α -Naftil Acetato como sustrato en los 5 medios propuestos como óptimos



6.7.2 Diseño Estadístico Box-Wilson

Los resultados del diseño experimental factorial fraccionado 2^{7-4} fueron tratados estadísticamente ^[8] ^[79] y con los coeficientes de contraste b obtenidos para cada elemento se obtuvo un nivel de variación. Este indica en qué rango hay que aumentar o disminuir el componente, para así lograr cinco propuestas a partir del medio basal (tabla 6.30). Para los cinco medios quedaron como componentes de composición constante NaCl (5g/L), Na₂HPO₄ (2.5g/L) y Tween 80 (0.05%). Todos los medios fueron preparados en buffer de fosfatos pH 7.2 0.05M.

Se observa en las figuras 6.29 y 6.31 que en los medios 10 y 11 se obtuvo mayor actividad lipolítica: 26.87 y 26.72 U/mL, respectivamente. En la misma figura se compara con el medio de donde se partió, medio BHI, que manifiesta apenas 2.17 U/mL. Esto implica que con estos medios optimizados (10 y 11) se logró incrementar poco más de doce veces la actividad lipolítica volumétrica a las 24h, por lo que los medios optimizados bien pueden ser el 10 u 11 según sea conveniente, puesto que no existe diferencia significativa en la actividad lipolítica que presentan. La actividad específica alcanzada en los medios 10 y 11 fue de 2.69 U/mg, mientras que para el medio BHI fue de 0.075, representando un incremento de alrededor de 33 veces.

Con fines de comparación con una lipasa comercial se utilizó la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada. Se pesaron 7mg y se llevaron a 1ml con buffer de fosfatos 0.05M pH 7.2, y se realizó la cuantificación de actividad lipolítica y de proteína para poder expresar el resultado como actividad específica (U/mg de proteína soluble). Estos resultados se muestran en la figura 6.32. La actividad específica obtenida para la lipasa de *Candida antarctica* fue de 18.96 U/mg y para el medio optimizado (promedio de los medios 10 y 11) fue de 2.69 U/mg. La enzima comercial se encuentra inmovilizada por lo que es difícil cuantificar la proteína soluble, de modo que también se cuantificó por el método de Kejl Dahl ^[22]. Hay que tomar en cuenta es que en el caso del medio óptimo se está utilizando el sobrenadante crudo por lo cual la actividad específica es baja en comparación con la preparación comercial.

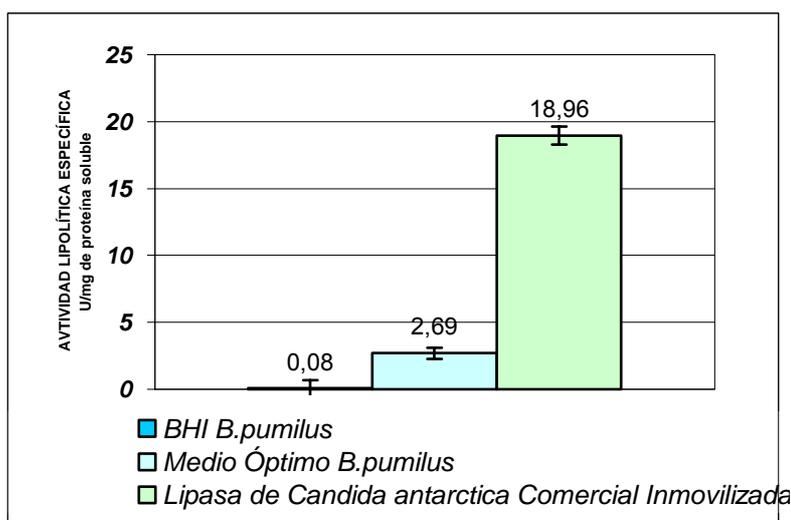


Figura 6.32. Comparación de actividad lipolítica máxima de *Bacillus pumilus* GMA1 contra lipasa comercial inmovilizada de *Candida antarctica*

6.8 Perfil de proteínas y actividad *in-situ*. Identificación de la proteína de interés

6.8.1 Perfil de proteínas en T-PAGE, T-SDS-PAGE

El incremento en la actividad lipolítica obtenido en las etapas anteriores podría deberse a la sobreproducción de otras enzimas lipolíticas e incluso proteolíticas, abundantes en el género, ya que el método de detección de actividad con el que se trabajó podría cuantificar diversas actividades de esterasas. Por lo tanto, resulta importante verificar en un gel de electroforesis si más de una banda de proteína se incrementa en las condiciones de cultivo seleccionadas.

En la figura 6.33 se presenta un gel TSDS-PAGE, donde se observó la aparición de las bandas que representan a las diferentes enzimas respecto al tiempo; la enzima de interés posee un peso molecular de 20.5 kDa, según Mora 2007 [78] y en este gel la enzima de interés aparece alrededor de 22kDa. En la misma figura se observa que con el tiempo se producen muchos compuestos que dificultan la separación de las bandas, probablemente péptidos y polipéptidos generados por proteólisis.

En la figura 6.34 se observa la identidad de la enzima, se compara con el control positivo, enzima proporcionada por Mora 2007 [78] obtenida por clonación. Las 3 muestras se encuentran en el mismo peso molecular. Estas últimas muestras



se ajustaron en contenido de proteína soluble (35 μ g), para así observar la proporción de proteínas que ambos medios poseen. Se aprecia que la lipasa de interés se encuentra en mayor proporción en el medio optimizado que en el medio BHI, aunque el método empleado no permita cuantificar con precisión los niveles de actividad. Para ello, se realizaron zimogramas, que permiten evaluar la actividad *in situ*.

6.8.2 Actividad *in situ*

En la figura 6.35 se muestra un gel SDS-PAGE al 15%. Este gel se corrió en condiciones desnaturalizantes. Las muestras fueron 1) Sobrenadante del medio BHI 24h, 2) Sobrenadante del medio optimizado 24h y 3) Control positivo. Una vez que corrió el gel, se desmontó y se renaturalizó de acuerdo al procedimiento del inciso 5.6.4. Posteriormente se colocó en la solución de α -Naftil Acetato para así revelar las enzimas que poseen actividad hidrolítica. En virtud de que la enzima ha sido caracterizada como lipasa por lo cual no hay falsos positivos. En el carril donde corrieron las muestras del medio optimizado y BHI sólo se detectó 1 banda de actividad, prueba de que sólo se cuenta con una enzima con la actividad buscada, cuya localización coincide con el control positivo.

En la figura 6.36 se muestra un gel de T-PAGE al 15% corrido y preparado en condiciones nativas, las muestras son: 1) Control positivo y 2) Medio óptimo. Este gel está revelado con α -Naftil Acetato lo que confirma que es la misma enzima pues posee la misma estructura nativa que el control. Debido a que este gel corrió en condiciones nativas, la enzima se presenta más arriba que en el caso de los geles TSDS-PAGE, pues es probable que forme agregados.

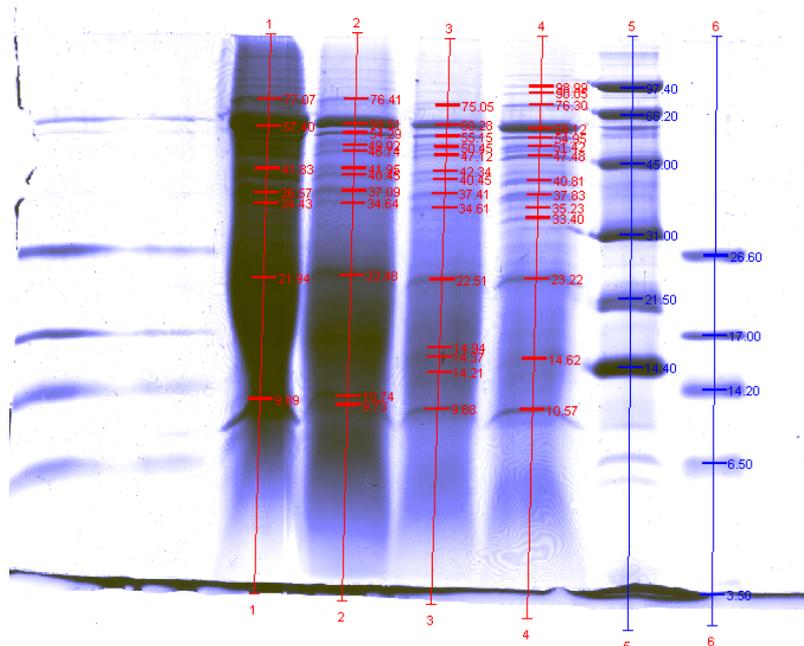


Figura 6.33 Perfil de proteínas en gel TSDS-PAGE, al 15%, teñido con azul de coomassie. De izquierda a derecha: **1), 2), 3) y 4)** Medio optimizado 48, 36, 24 y 8 h respectivamente, **5) Marcadores 6) Marcadores**

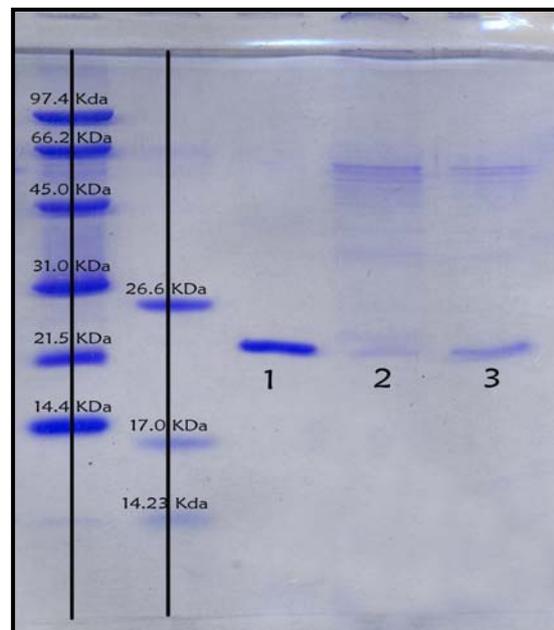


Figura 6.34. Perfil de proteínas TSDS-PAGE 15%, Teñido con azul de coomassie. De izquierda a derecha: Marcadores de peso molecular, Marcadores de peso molecular, **1) Control Positivo, 2) BHI Difco(Sobrenadante precipitado con TCA 3) Medio óptimo (Sobrenadante precipitado con TCA y tratadas con DTT)**

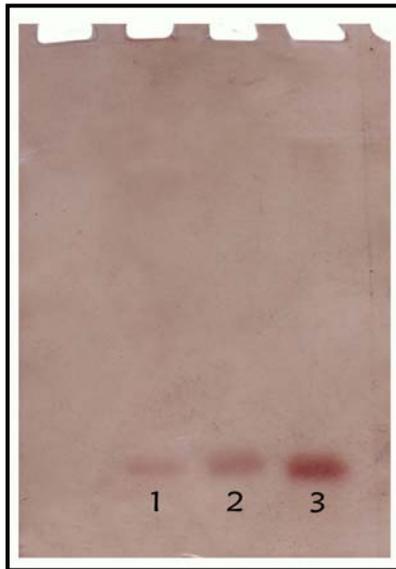


Figura 6.35 Gel SDS PAGE 15% Renaturalizado y acoplado con α -Naftil Acetato **1)** BHI (Sobrenadante precipitado con TCA. **2)** Medio óptimo (Sobrenadante precipitado con TCA **3)**Control Positivo.

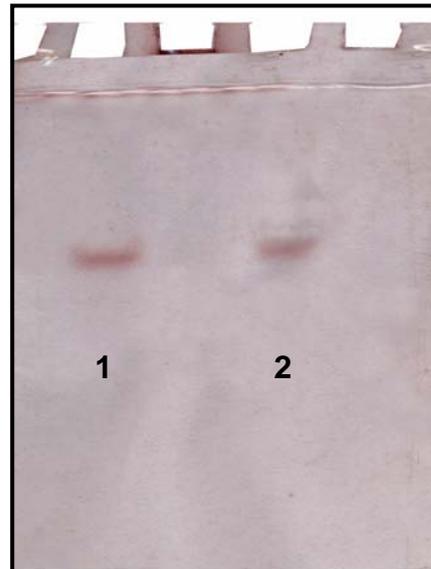


Figura 6.36. Perfil de proteínas en Gel TPAGE Nativo acoplado con α -Naftil Acetato. **1)** Control positivo **2)** Medio optimizado

En la tabla 6.37 se muestran algunas propiedades y peso molecular de lipasas producidas por el género *Bacillus*, en la que se observa que en general las lipasas tienen un peso molecular cercano al obtenido en este caso, pero es realmente notable la diferencia en la temperatura de máxima actividad, aún con otros organismos de la misma especie.

Tabla 6.37 Características bioquímicas de algunas lipasas producidas por bacterias del género *Bacillus*

MICROORGANISMO DE PROCEDENCIA	pH de máxima actividad	Temperatura de máxima actividad (°C)	PESO MOLECULAR (kDa)
<i>B. pumilus</i> DSM5776 ^[44]	9.5	30	19.3
<i>B. pumilus</i> B26 ^[25]	8.5	35	19.2
<i>B. pumilus</i> GMA1 ^{[10][78]}	10.5	50	20.5
<i>B. subtilis</i> 168 Lip A ^[58]	10.0	37	19.3
<i>B. licheniformis</i> ^[47]	10.0-11.5	50-60	19.2



Capítulo 7

Conclusiones

- Se modificó con éxito un método para la cuantificación de actividad lipolítica, en el cual se utiliza como sustrato *p*-Nitrofenil Acetato, como disolvente buffer de fosfatos 0.05 M y pH 7.2, además de 0.1% de tritón para estabilizar el sistema.
- Se logró modificar exitosamente un método para apreciar cualitativamente la presencia de actividad lipolítica, usando como sustrato α .Naftil Acetato.
- Se probó que el aceite de olivo es un inductor para la producción de esta lipasa desde muy bajas concentraciones (0.2%)
- Por otra parte, se encontró que la lipasa es afectada por represión catabólica causada por glucosa que se manifiesta desde una concentración de 0.2%.
- Se encontró que la proporción ideal de de Carbono y Nitrógeno para la óptima producción de lipasas es de 1:2.5 Además las fuentes que mayor efecto tuvieron, resultaron ser Glicerol y Extracto de carne respectivamente
- Se corroboró la presencia de una enzima cuyo patrón de corrimiento y actividad corresponde a la reportada por Bustos (1995), aunque el peso molecular obtenido en Tris Tricina difiere del encontrado en SDS PAGE. Esta es la única enzima con actividad lipolítica sobreproducida en el medio optimizado.
- Se logró optimizar el medio y condiciones de cultivo para la producción de lipasa de *Bacillus pumilus*. GMA1, mediante experimentos “uno a la vez”, exploración de niveles y diseños estadísticos factorial fraccionado y Box-Wilson,



hasta llegar a la formulación de dos medios óptimos (tabla 7.1) para la producción de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1.

Tabla 7.1 Medio Optimizado para la producción de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1

COMPONENTE	MEDIO 10 (g/L)	MEDIO 11 (g/L)
NaCl	5	
Na ₂ PO ₄	2.5	
Tween 80	0.005	
Glucosa	0.36	0.29
Glicerol	9.4	9.1
Sulfato de Amonio	3.26	3.64
Extracto de Levadura	2.94	3.16
Extracto de Carne	17.5	18.5
Aceite de Olivo	1.3	1.45
Condiciones	Cultivo 50°C, 24h, 100rpm Medio preparado en Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.2	

- Se aumentó la actividad lipolítica volumétrica de 2.17U/mL a 26.8 U/mL, es decir doce veces. En cuanto a la actividad específica, esta mostró un mayor aumento: de 0.075 U/mg a 2.69 U/mg es decir 33 veces.



Capítulo 8

Perspectivas

Se sabe que en optimización de métodos, pueden realizarse diversos diseños estadísticos con tantas variables como se desee. Si durante el estudio de la enzima se encuentran nuevos hallazgos, se podrán incluir en una nueva optimización del medio partiendo del medio encontrado en este trabajo

Con el aumento de producción de enzima logrado en este trabajo, es posible trabajar en condiciones de laboratorio para seguir investigando las cualidades de esta enzima, para su uso a nivel industrial sin embargo, será necesario en un futuro escalar el medio en planta piloto para una producción a gran escala.

Una vez escalado el sistema será conveniente comparar la actividad enzimática con preparaciones comerciales para así observar su competitividad en el mercado.



Apéndice I

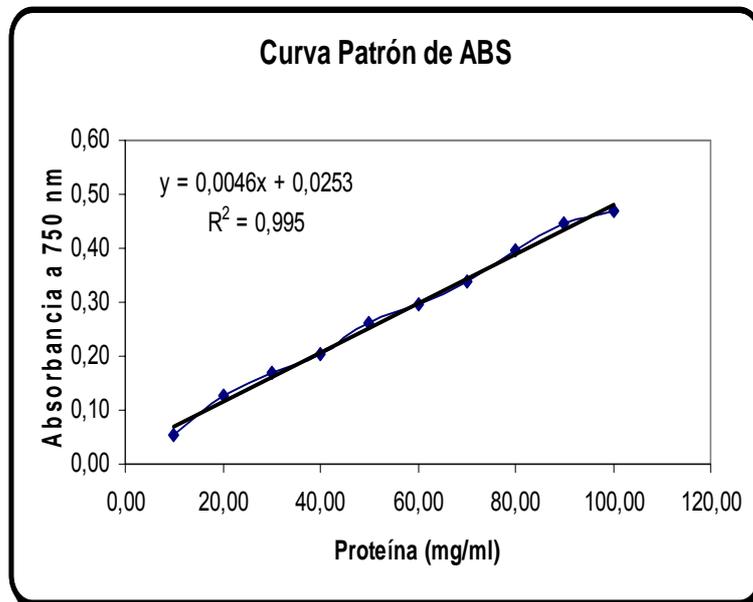


Figura 8.1 Curva patrón de ABS para cuantificación de proteína por el método de Lowry modificado.

REACTIVOS:

CTC, Concentración final de las soluciones:

Na₂CO₃ al 10%

CuSO₄.5H₂O al 0.1%

Tartrato de Potasio al 0.2%

Solución A: Volúmenes iguales de las siguientes soluciones, en este mismo orden:

CTC, NaOH 0.8N, SDS al 10%

Solución B : Reactivo Follin, Hacer diluciones 1:5

Ambas soluciones se preparan momentos antes de comenzar la determinación.

Procedimiento:

- Se preparó una curva patrón con ABS marca Sigma.(Figura 8.1)
- A 1mL de muestra problema con agitación constante en vortex se le agregó 1 mL de la solución A y se deja reposar a temperatura ambiente por 10 minutos.
 - Se agrega 0.5 mL de la solución B con agitación continua en vortex y se deja desarrollar la reacción por 30 minutos.
 - Después de los 30 minutos se lee en espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 21D) a una λ_{750nm} . La reacción es estable durante 120 minutos después de iniciada.



Apéndice II

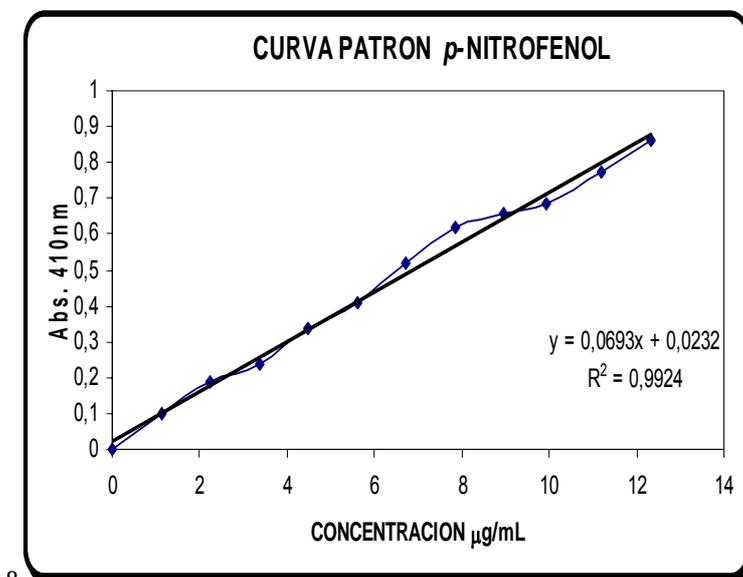


Figura 8.2 Curva Patrón de p-Nitrofenol

Método acoplado para la cuantificación de la actividad lipolítica en sobrenadante del medio de cultivo de *Bacillus pumilus* GMA1.

1. Preparar una solución 6 μM de p-Nitrofenil Acetato en buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.2
2. Disolver previamente el p-Nitrofenil Acetato en 0.1 % (v/v) de tritón e incorporarlo al buffer de fosfatos con agitación constante.

Nota: El 0.1 % (v/v) se calcula a partir del volumen final de la solución 6 μM de p-Nitrofenil Acetato.

3. Colocar 900 μL de la muestra problema en una celda espectrofotométrica y añadir 100 μL de la solución 6 μM de p- Nitrofenil Acetato recién preparada y homogenizar perfectamente la mezcla preparada.
4. Inmediatamente después, colocar la celda con la mezcla en el espectrofotómetro y tomar esta lectura como T= 0
5. Transcurridos 5 min., volver a tomar la lectura de la misma celda en el espectrofotómetro y tomar ésta como T= 5
6. Hacer la diferencia de T = 5 y T= 0 y a este valor obtenido, restar 0.093 correspondiente a la autohidrólisis del sustrato en las condiciones de este ensayo.
7. Calcular el valor de la actividad lipolítica (U) con ayuda de una curva patrón de p-Nitrofenol (Figura 8.2)

U= μg de p-Nitrofenol liberados en un minuto por mL de muestra



Bibliografía

1. Akoh, C. et. Al. (2002) "Food lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology" Second edition, Revised and expanded, John D. Weete; 256-270
2. Arpigny JL. Jaeger KE. (1999) "Bacterial Lipolytic Enzymes: classification and properties", *Biochem. J.* 343; 177-83
3. Arrollo, M. 2001 "Tecnología enzimática". Editorial Complutense Madrid Esp; 321-346
4. Berglund, P. Hutt, K. (2000). "Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases" *Org Lett* 5: 763-5
5. Berkeley, N. Y Col. (1984) "Identification of *Bacillus* species" *Meth. Microbiol.* 16. 291-328.
6. Bloquel, R., Vailet-Ponce, L. (1984) "Factors contributing to production of microbial lipases" *Microbiol Food Nutrition* 12: 179-185
7. Bornscheuer, UT, Bessler C. Srinivas, R., Krishna, SH., (2002) "Optimizing lipases and related enzymes for efficient applications" *Trends Biotechnol.* 10:433-7
8. Box, G.E.P., Hunter, W., and Hunter, J.S. (1978). "Statistics for experiments", John Willey & Sons, USA 374-418,.
9. Burkert JF., Maugeri, M.I., Rodriguez, (2003) "Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* Using factorial design". *Bioresource Technol.* 1:76-84.
10. Bustos JI, (1995) "Aislamiento Selectivo de un Microorganismo Productor de lipasa Proveniente De Un Ambiente Extremo". Tesis de Licenciatura. UNAM; 52-73
11. Chaplin M.F, (1992) "Enzyme Technology" Edit. Cambridge; 40-46



12. Chisti, Y., (1999) "Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment" Flickinger MC, Drew SW, editors. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation.246-62
13. Colman, M., H., Macrae AR, UK Patent No. 1577933, 1980
14. Cordenons, A., Gonzalez R., K., Hellingwerf KJ, Nudel C. (1996) "Effect of nitrogen sources on the regulation of extracellular lipase production in *Acinetobacter calcoaceticus*" Biotechnol Lett 18:633-8.
15. Derenwenda, Z. S. y Sharp, A.M. (1993). "News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases". Trends Biochem. Sci 18, 20-25.
16. Elibol, M., Ozer, D., (2001) "Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*". Process Biochem. 36:325-329
17. Espinoza G, (1990) "Mejoramiento de las condiciones de producción de lipasa de *Rhizopus delemar* destinada a la modificación de un sustrato lácteo" Tesis de Maestría, UNAM 5-71
18. Essamri, M., Valerie, D., Louis, C., (1998) "Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the lipase activity in organic solvents" J Biotechnol. 60:97-103.
19. Galinier A. Kravanja M. (1998) "New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression". Proc Natl Acad 95:1823-1828.
20. Gupta, Namita, Mehra, Sauri, y Gupta Rani, (2004) "A glycerol inducible thermostable lipase from *Bacillus sp.*: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology," J. Microbiol.50: 361-368
21. Gupta, R., Gupta, N., Rathi, (2004) "Bacterial lipases:an overview of production, purification and biochemical properties". Appl Microbio Biotechnol. 6:763-81
22. Hart (1991) "Análisis moderno de Alimentos". Ed. Acribia, España;1-14
23. Harwood C., (1992) "*Bacillus subtilis* and it relatives: molecular, biological and industrial workhorses" Trends Biotechnol. 7:247-56.
24. Helmut. U., (1998) "Industrial Enzymes and applications". John Wiley & Sons, INC; 56-58



25. Hyung Kwoun Kim, Et al, (2002) " Expression and characterization of Ca⁺ independent lipase from *Bacillus pumilus* B26," Biochem Biophys Acta; 2:205-12
26. Isobe K., Akib, T., Yamaguchi. S. (1998). "Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*" Eur J. Biochem(1-2):233-7
27. Ito T., Kikuta H., Nagamori E., Honda H., Ogino H., Ishikawa H., 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
28. Jaeger, K.E., Reetz, M.T., (1998). "Microbial Lipases from versatile tools for biotechnology" Trends Biotechnol. 16:396-403
29. Jaeger, K.E., y col (1994). "Bacterial Lipases" FEMS Microbiol. 29-63
30. Jaeger, K E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T., (1999). "Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases." Annu Rev Microbiol;53:315-51
31. Jaeger KE (2002) "Lipases for biotechnology". Curr Opin Biotechnol. 13:390-7.
32. Jones, D. A., Pell and P.H. A. Sneath, (1991). "Maintenance of microorganisms and cultured cells, A manual of Laboratory Methods". Second Edition., Edited by BE. Kirsop and A. Doyle, Editorial Academic Press, Inc San Diego, CA: 47-49
33. Karpushova A. et al (2005) "Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus sp.* Associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*". Appl. Microbiol Biotechnol;67:59-69
34. Kazlauskas, R.J., Bornsheuer, UT., (1998). "Biotransformations with lipases".Curr Opin Chem Biol 2:121-6
35. King, JW., Snyder, JM., Frykman H, Neese A., (2001). "Sterol ester production using lipase-catalyzed reactions un supercritical carbon dioxide". Food Res Technol. 212:566-9.
36. Klibanov AM., (1997) "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?". Trends Biotechnol. 15:97-101.
37. Lee D., Kok Y., Kim K., Kim B., Choi H., Kim D., (1999). "Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1" Microbiol Lett. 179:393-400.



38. Lee, Mi-Hwa, et al. (2003). "High-Level Expression and Secretion of *Bacillus pumilus* Lipase B26 in *Bacillus subtilis* Chungkookjang". J Microbiol Biotechnol. 6:892-896.
39. Lee YP, Cheng GH, Rhee S. (1993). "Purification and Characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK WI lipase expressed in *Escherichia coli*." Biochem Biophys Acta; 6;613-5.
40. Leningher A.(1989) "Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular" Segunda Edición, España; 990-1021
41. Lin SF, Chiou CM, Yeh C, Tsai YC. (1995). "Purification and partial characterization of an alkaline lipase by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111". Biotechnol Lett; 17:959-62
42. Masse L., Kennedy KJ., Chou SP., (2001) "The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater". J Chem Technol Biotechnol. 76;629-35
43. Martínez, C. Patricia, (1995). "Producción de Lipasa por *Rhizopus delemar*". Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM; 9:38
44. Möler, B. Y col. (1990). "Alkaline *Bacillus* lipases, Coding DNA sequences therefore and *bacilli* which produce these lipases". Patente internacional WO91/16422.
45. Nawani N, Neerupma T, (2000). "Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp". Mol Cell Biochem; 206:91-6
46. Neves Petersen, et al., (2001) "How do lipases and esterases work the electrostatic contribution" J Biotechnol. 85; 115-47
47. Nlthangeni, M. et al, (2001). "Over Expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* Lipases" Enzyme Microb Technol. 28, 705-712
48. Pabai F, Kermasha S, Morin (1995) "Lipase prom *Pseudomonas fragi* CRDA A 323; partial purification and interesterification of butter fat" Appl Microbiol 43: 42-51
49. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. (1999). "The realm of microbial lipases in biotechnology." Biotechnol Apply 32., 712-724



50. Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris B. (1992). "Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*". Biotechnol Lett. 14:397-402
51. Petterson G. (1977) "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Wich is more Generally Applicable"; Analyt. Biochem. 83,346
52. Prim, N. Sanchez, et al (2003). "Use of methylumbelifery-derivative substrates for lipase activity characterization". J Ind Microbiol Biotechnol 22;339-346
53. Rantakyla M, Alkio M, Paltonen O. (1996). "Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase". Biotechnol Lett. 18;1089-94
54. Rubin B, Dennis EA (1997) " Lipases; Part A. Biotechnology Methods in enzymologist " Vol 284. New York: Academic Press, 1-48.
55. Rubin B, Dennis EA, editors. (1997) "Lipases; Part B. Enzyme characterization and utilization methods in enzymology" Vol. 286. New York: Academic Press 1-63
56. Schägger H., Von Jagow G., (1987). "Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis for Sepatarion of Proteins in the range from 1 to 100kDa". Anal Biochem. 166:368-379
57. Secundo, F. et al, (2006). "The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity". J mol Catal Enzym. 39 166-170.
58. Sugihara A, Tani T, Tominaga Y. (1991). "Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.*" J Biochem. 109:211-6
59. Supanock Sinchaikul, et al., (2001). "Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization,". Biotech; 388-398.
60. Sztajer H, Mengue U, Schmid RD. (1993). "Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*". Biochim Biophys Acta;1168:181-9
61. Takamoto T, Shirasaka H, Uyama H, Koboyashi S.(2000) "Lipase- catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent". Chem Lett; 1;6:492-3
62. The NCBI taxonomy database.
63. Tsujita, H., Ninomiya, (1989) "*p*-Nitrophenyl butyrate hydrolysing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue". J lipid Res; 30-997:999.



64. Turner C, Person M, Mathiasson L, Adlercreutz P, King JW., (2001). "Lipase-catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat-soluble vitamin determination in milk powder and infant formula" *Enzyme Microb Technol*; 29:111-21.
65. Ulrich K. 1978 "Glycogen, Hyaluronate, and Some other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*." *Jo Bacter*, 138: 666-670
66. Undurraga, D., Markavits A, Erazo S, (2001). "Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of palm oil midfraction". *Proces Biochem*;36:933-9
67. Uwe T, et al.(2002). "Optimizing lipases and related enzymes for efficient application". *Trends Biotech*; 20,10-22
68. Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. Y Erdmann, H., (1992) "Comparison of lipases by different assays". *Enzyme. Microb. Technol*; 14-631:639
69. Vulfson E.N. (1994) "Industrial applications of lipases, In: Woolley P, Peterson SB, editors. *Lipases-their structure, biochemistry and applications.*" Cambridge Univ. 271-88
70. Wakako Tsuzuki, et. Al., (1999). "Effects of Glucose on Lipase Activity". *Biosci Biotechnol Biochem* 63 (8), 1467-1470.
71. Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY (1995). "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841)". *J Ferment Bioeng*;79;433-8
72. Warner JB., Lolkema JS. (2003) "CcpA-Dependent Carbon catabolite Repression in Bacteria" *Microbiol Molecular Biol Rev* 67:475-90
73. Wong de la M. P., (2001). "Lipasa Termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: Producción Fermentativa y Algunas Propiedades". Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.6:55
74. Yasser, Abdel-Fattah, et al, (2002). "Lipase production from a novel thermophilic *Bacillus sp.*; application of Plackett-Burman design for evaluation culture conditions affection enzyme formation" *Acta Microbiol Pol* 51,4-353:366



-
75. Yeoh HH, Wong FM, Lin G., (1986). "Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates". *Mycologia*;78:298-300.
76. Zúñiga R. Víctor, (2004). "Inmovilización de Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1" Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM 36:60

Otras fuentes:

77. Ruiz NK. Comunicación Verbal, Tesis de Licenciatura en Curso "Utilización de La Lipasa de *Bacillus. pumilus* GMA1 en biocatálisis", 2007
78. Mora R, Comunicación Verbal, Tesis de Maestría en curso, "Bases moleculares de las propiedades catalíticas de la Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 "UNAM, 2007
79. Ramírez CR., Comunicación Verbal., Profesora de la Facultad de Química, UNAM.