



03072

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**EXPRESION DE UNA LIPASA PRODUCIDA POR
Pseudomonas aeruginosa (IGB-83), EN DIFERENTES
CEPAS DE Xanthomonas campestris Y EN
DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTA
JACINTO OSCAR GARCIA RODRIGUEZ**

CUERNAVACA, MOR.

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. GLORIA
SOBERON CHAVEZ.**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más, sincero agradecimiento a la Dra. Gloria Soberón Chávez por su interés y motivación en la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité de tesis: Dra. Gloria Soberón Chávez, Dr. Enrique Galindo Fontana, Dra. Alicia González Manjarez, Dr. Agustín López Munguía Canales, Dr. Baltazar Becorri Luján.

A las técnicas Rebeca, Beatriz, Rosalba y el Sr. Eduardo, por su gran apoyo y amistad durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos con los cuales compartí agradables momentos, Benito, Alberto, Germán, Roberto y muchos más.

Finalmente al Instituto de Biotecnología UNAM por haberme otorgado la oportunidad de palpar el maravilloso mundo de la ciencia.

DEDICATORIAS

A mis padres:

+ Profr. Pablo García Hernández.

Regina Rodríguez Carrillo.

Por su gran cariño, confianza y apoyo brindado durante mi formación.

A mis hermanos:

+ Efrén, Cándido, Gabriel, Octavio, Rogelio y Rosalba, quienes me han motivado incondicionalmente.

En forma muy especial a Sandra, Aldo y Alain, que son toda mi vida.

INDICE

	Página
RESUMEN	01
I.- INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades de la biotecnología	03
1.2 Antecedentes de la biotecnología enzimática	04
1.3 Enzimas de uso industrial	06
1.4 Enzimas utilizadas en detergentes	09
1.5 Lipasas en el contexto de los detergentes	09
1.6 Aplicaciones en la industria de las lipasas	17
II.- ANTECEDENTES	
2.1 Búsqueda de enzimas lipasa de origen microbiano	19
2.2 Caracterización de la cepa productora de lipasa	20
2.3 Motivos para transferir el gen de lipasa de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> a <u>Xanthomonas campestris</u> .	23
III.- OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	25
3.2 Contribución y perspectivas del presente trabajo	25
IV.- MATERIALES Y METODOS	
4.1 Materiales	27
4.2 Métodos	30
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	
5.1 Obtención y expresión de la cepa recombinante de <u>Xanthomonas campestris</u> conteniendo el gen lipasa	38

5.1.1 Estrategia utilizada para transferir el gen de lipasa de <u>Pseudomona aeruginosa</u> a <u>Xanthomonas campestris</u> .	38
5.1.2 Estabilidad del plásmido pBP13 en la cepa de <u>Xanthomonas campestris</u> pv <u>campestris</u> .	38
5.1.3 Evaluación de la actividad lipolítica de la cepa IBT 148(pBP13) crecida en un medio de cultivo con diferentes condiciones.	41
5.1.4 Evaluación de la actividad lipolítica de la cepa IBT 148(pBP13) crecida en diferentes medios de cultivo.	44
5.1.5 Influencia de los inductores en la actividad lipolítica de la cepa IBT 148(pBP13).	48
5.1.6 Cinética de crecimiento y producción de lipasa de la cepa de <u>Xanthomonas campestris</u> IBT 148 (pBP13).	55
5.1.7 Expresión de lipasa en diferentes cepas de -- <u>Xanthomonas campestris</u> utilizando el plásmido pBP13.	57
5.1.7.1 Cinéticas de crecimiento y cuantificación de actividad lipolítica de diferentes cepas de <u>Xanthomonas campestris</u> utilizando - plásmido pBP13.	58

VI.- CONCLUSIONES 71

VII.- RECOMENDACIONES 72

VIII.- BIBLIOGRAFIA 73

ANEXO 83

RESUMEN

Con el propósito de obtener un microorganismo que produjera una lipasa termoestable y activa a un pH alcalino, para evaluar su uso en detergentes, se purificó y caracterizó una cepa de Pseudomonas aeruginosa que tiene , a 55°C y un pH de 8.5, una actividad enzimática elevada (características apropiadas para una enzima de uso en detergentes).

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista para el hombre por lo que no puede ser utilizada en la producción industrial de enzimas; ésta es la razón por lo que la lipasa tenía que ser expresada en otra bacteria para ser producida de una manera industrial.

Una de las bacterias que más se han usado industrialmente es Xanthomonas campestris; ya que produce un exopolisacárido (la goma xantana) que tiene gran aplicación en alimentos y en la extracción del petróleo. Esta bacteria, patógena para ciertas plantas, secreta ciertas enzimas que participan en su virulencia. Por otra parte, está estrechamente relacionada con Pseudomonas aeruginosa . Con dichos antecedentes se decidió expresar la lipasa en Xanthomonas campestris, la cual se llevó a cabo por medio de conjugaciones entre las cepas; hasta obtener a la cepa recombinante IBT 148(pBP13). Se cuantificó la estabilidad del plásmido pBP13 en la cepa existiendo una alta estabilidad de éste; posteriormente se cuantificó la actividad lipolítica en tres diferentes medios de cultivo con el fin de obtener el más adecuado, resultando ser el medio Pyglucosa. También se evaluó la influencia de los inductores IPTG y glicerol así como también la sustitución de lactosa por IPTG. Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de la lipasa para conocer más el proceso. Finalmente se cuantificó la producción de

lipasa por diferentes cepas de Xanthomonas campestris, que tenían como diferencia principal la producción de goma a diferentes niveles y la secreción de proteínas. Se observó que las cepas productoras de goma facilitaban la expresión de la lipasa.

Por último, se determinó que la enzima lipasa expresada en la cepa de Xanthomonas campestris IBT 148 (pBP13) reúne las características principales para utilizarse en detergentes ya que tiene actividad en un pH alcalino de 8.5 y es termoestable (por mostrarse con actividad lipolítica a una temperatura de 55°C).

I.- INTRODUCCION.

1.1 Generalidades de la biotecnología.

La biotecnología es percibida como uno de los sectores tecnológicos claves en el desarrollo industrial contemporáneo (47). El creciente interés que en los últimos años ha despertado, tanto en los medios académicos como en la actividad económica, se ha traducido, entre otras cosas, en una proliferación de definiciones.

La biotecnología es, según una de las definiciones más aceptadas: "La utilización y transformación de microorganismos y células vegetales o animales para la obtención de productos benéficos para el hombre" (59).

Por tratarse de un área multidisciplinaria se relacionan conocimientos de microbiología, biología molecular, bioquímica e ingeniería genética, con procedimientos industriales (51).

El uso de microorganismos para beneficio del hombre se utilizó desde épocas muy antiguas, para satisfacer necesidades básicas; en la producción de pan, queso y bebidas fermentadas. Si bien, hace 5000 años el hombre no manejaba directamente los microorganismos, pues no los conocía, se beneficiaba sistemáticamente con las transformaciones que producían. Actualmente se puede no sólo confinar al microorganismo en un medio de cultivo, sino alterar su información genética y "beneficiarse" aún más de él. Es una diferencia muy grande derivada de la acumulación de conocimientos en cada época; pero no hay que perder de vista que los objetivos siempre han sido los mismos; lograr beneficios a partir de la actividad celular sobre la materia orgánica, de tal manera que, sin importar el enfoque del que se parta

para hacer una historia de la biotecnología, no debemos ignorar los interesantes acontecimientos que surgieron a partir de la comprensión de las fermentaciones, la bioquímica y la biología molecular.

Para algunos autores (16), la biotecnología se inicia con la modificación genética y por ende metabólica de células procariontes y eucariontes, para la obtención de nuevos compuestos o el incremento en la producción de los ya sintetizados. En este caso, la historia de la biotecnología aparece con las diversas metodologías de transformación que han usado las civilizaciones desde los inicios de la historia hasta nuestros días, cuando las manipulaciones biomoleculares alcanzan la transformación genética de algunos organismos. De esta manera, separan la biotecnología en una etapa primitiva, una etapa moderna y, finalmente, la era de la biotecnología de vanguardia o de nueva generación.

El desarrollo de la biotecnología moderna que se dió en los años 60's, impulsó el nacimiento de nuevas bioindustria y la expansión de otras existentes. Para los años 70's, y a mediados de los 80's se establecieron alrededor de 200 bioindustrias en Estados Unidos, lo cual representa un récord en el mundo.

1.2 Antecedentes de la biotecnología enzimática.

Las industrias de fermentación, basadas en siglos de experiencia en la producción de cerveza, quesos y similares, han sido base para la creación de la biotecnología enzimática, ya que por ellas se descubrió que los procesos biológicos se realizan en gran medida mediante reacciones catalizadas por ciertas moléculas de naturaleza proteica, conocidas por enzimas (25).

El nombre enzima se empleó hasta 1877, pero mucho antes ya se sospechaba de ciertos catalizadores biológicos que intervenían en la fermentación del azúcar para formar alcohol (de aquí el nombre inicial de "fermentos"), J. Berzelius introdujo la idea de catálisis en la fisiología, hacia 1830 (12). Afirmaba que en los organismos se formaban miles de reacciones mediante agentes químicos cuya presencia era esencial para la reacción, pero que no eran consumidos durante ella. En 1877, Kühne acuñó el término enzima, cuyo aislamiento durante todo el siglo XIX fué básico para el desarrollo de la bioquímica. En 1897, E. Buchner aisló la zimasa: un grupo de enzimas que llevan a cabo la fermentación alcohólica. Solo cuatro años antes, Ostwal había demostrado que las enzimas son catalizadores y E. Fischer en 1894 demostró su especificidad por el sustrato (39). En 1913, Michaelis y Menten desarrollaron la teoría cinética enzimática (38). A pesar de que en el siglo pasado se estudiaron numerosas reacciones enzimáticas, solo en los años veinte fueron mejor valorados y aprovechados los resultados. Los conceptos de enzimología moderna nacieron del aislamiento de la enzima ureasa por Sumner (41)

Durante las décadas de los sesenta y setenta se desarrolló la tecnología enzimática ya que en esta época se aislaron numerosos microorganismos productores de una gran variedad de enzimas, entre las que destacaban las amilasas y proteasas, por otra parte también se diseñaron reactores que permitieron la reutilización de catalizadores.

En 1988 se determinó que el mercado mundial de las enzimas era de 570 millones de dólares. En cuanto a los usos de éstas enzimas, tenemos que

alrededor de la mitad de ellas son proteasas y dentro de estas, la de mayor mercado es la proteasa alcalina usada en detergentes (40).

Actualmente la tecnología enzimática cuenta con las herramientas que le proporciona la ingeniería genética o tecnología del DNA recombinante y la ingeniería de proteínas.

Asimismo debemos señalar que el nuevo auge en estos procesos es la búsqueda de microorganismos, particularmente aquellos que habitan en ambientes extremos, con el propósito de encontrar enzimas más resistentes al calor, pH alto o bajo etc. La metodología sistemática para el aislamiento y selección de este tipo se le ha denominado "screening", y se refiere a la búsqueda y aislamiento de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) existentes en un área ecológica definida (5).

El principal objetivo del "screening" es obtener microorganismos que en su medio ambiente presenten un metabolismo que genere sustancias que son de interés industrial o médico (11,13). Una vez aislados, es posible su eventual manipulación genética para mejorarlos (30).

1.3 Enzimas de uso industrial.

Las enzimas tienen amplio mercado y uso diversificado en diferentes áreas industriales. Destacan por su importancia las aplicaciones en alimentos, químico farmacéutica y química (3).

TABLA 1.- Información del mercado internacional para las principales enzimas de uso industrial.

Enzima 10 ³ Lb	Volumen \$/lb	Precio (10 ⁶ Dólares)	Valor del Mercado
α-amilasa	600	19.33	11.6
Amilglucosidasa	600	20.00	12.0
Proteasa de <i>Bacillus</i>	1000	8.28	8.0
Glucosa-isomerasa	100	400.00	40.0
Glucosa-oxidasa	5	160.00	0.8
Papaína	200	59.00	11.8
Pepsina	10	380.00	3.8
Renina	24	696.00	40.0

Tomada de Arbige and Pitchar, 1989 (3).

Se aprecia que las enzimas, por el volumen en que son producidas, caen en la categoría de especialidades químicas (producto de volumen medio y alto valor agregado). La proteasa de *Bacillus* es la enzima que en la actualidad se produce y consume en mayor volumen a nivel mundial (Tabla 1).

TABLA 2.- Distribución de las enzimas de interés industrial.

Grupo	Enzima o área de aplicación	% del mercado	% total
Proteasas	Alcalinas (detergentes)	25	
	Alcalinas	6	
	Neutras	12	
	Acidas	3	
	Renina	10	
	Tripsina	3	
			59
Carbohidrasas	α-amilasa	13	
	β-amilasa	5	
	Celulosa y lactosa	1	
	Isomerasas	6	
	Pectinasas	3	
			28
Lipasas	Lipasas	3	
		3	
Otras	Area analítica		
	Area farmacéutica		
	Otras	10	
			10
			100

Tomada de Godfrey, 1983 (23).

Como se presenta en la tabla 2, las proteasas representan el 59% del total y las proteasas alcalinas usadas en detergentes representan el 25% (8), cifra muy superior si se compara con el resto de las enzimas producidas (23).

1.4 Enzimas utilizadas en detergentes.

El uso de enzimas en detergentes para remover restos de proteína depositados en ropa se inició en 1913 en Alemania cuando O. Röhm adicionó por primera vez pancreatina a formulaciones de detergentes (2), pero fue hasta los años 60's cuando, en el aislamiento de una proteasa alcalina termoestable de *Bacillus*, se inició una rápida y permanente penetración en el mercado de los detergentes (66). Actualmente las enzimas son ingredientes indispensables en la formulación de los mismos. Las proteasas alcalinas utilizadas en detergentes están bien caracterizadas y sus propiedades generales son:

- Deben operar a un pH alto (pH 7-11).
- Deben operar a temperaturas elevadas (20-70°C).
- Ser compatibles con el detergente (estable durante la vida de anaquel y lavado).

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

1.5 Lipasas en el contexto de los detergentes.

En fechas recientes, el interés hacia las lipasas ha crecido debido a la gran diversidad de usos que por sus características tiene y uno de estos es en detergentes (18). Actualmente existe en el mercado la *Lipolasa* de la empresa

NOVO que es la primera lipasa microbiana con aplicación industrial en los detergentes (2). Algunas de las especies bacterianas productoras de lipasa que pueden ser usadas en la elaboración de detergentes pertenecen al género de las *Pseudomonas*, que incluyen a las bacterias gram negativas de forma bacilar, aerobios estrictos y móviles, habitantes normales del suelo y agua.

1.5.1 Características de las lipasas.

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de grasa para dar ácidos grasos libres y glicerol (24).

Pertenecen al género no específico de las carboxil-éster hidrolasas EC 3.1.1.3 (31,34), (Figura 1).

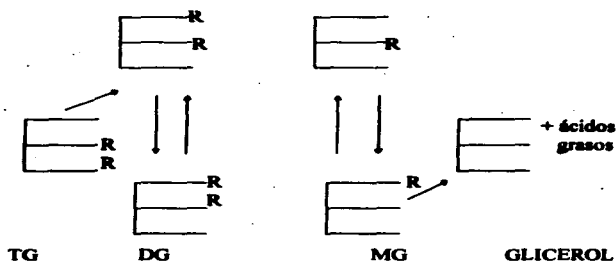


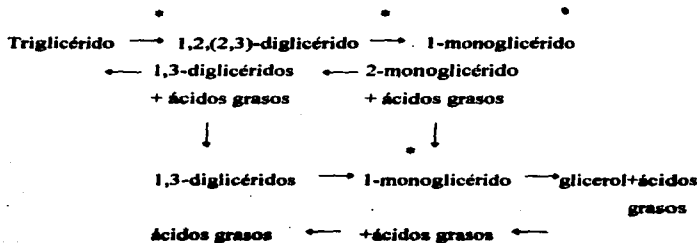
Figura 1.- Reacción catalizada por la enzima lipasa.

TG (triglicérido); DG (diglicérido); MG (monoglicérido).

Modo de acción.- Las lipasas hidrolizan las uniones ésteres en la interface entre la fase acuosa (enzima soluble) y la fase del sustrato insoluble. Actúan

El segundo grupo libera ácidos grasos de las posiciones de enlace del glicerol.

LIPASAS 1,3 ESPECIFICAS.



*Lipasa

FIGURA 2.- Reacción enzimática de lipasas no específicas y lipasas 1,3 específicas (48).

1.5.2 Fuente de obtención de las lipasas.

Las lipasas pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano (43,45,22).

Las de origen animal son lipasas que se obtienen de páncreas de cerdo o bovino y son las que se utilizaron inicialmente. Las de origen vegetal se encuentran en trigo, avena, maíz y coco y las microbianas se obtienen de una gran variedad de microorganismos (tabla 3), los cuales tienen ventaja sobre las anteriores como son:

- a) control de las condiciones de producción.
- b) se pueden cultivar en diferentes volúmenes.

c) los microorganismos pueden mejorarse genéticamente para aumentar su productividad (57).

TABLA 3.- Lipasas microbianas comerciales.

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

Tomada de Seitz, 1974 (54)

1.5.3 Producción industrial de lipasas microbianas.

Los procedimientos para la producción de lipasas en cultivos sumergidos han sido publicados en patentes y literatura general. Los nutrientes y condiciones de cultivo varían ampliamente pero se ha observado que al agregar lípidos al medio de cultivo existe un incremento en la producción de lipasa por algunos microorganismos como son G. candidum y Pseudomonas mephitica (35), ya que triglicéridos como el aceite de oliva y ácidos grasos como el ácido oleico actúan como inductores en la producción.

En las últimas dos décadas, los estudios que se han realizado en relación a la producción de este tipo de lipasas microbianas, se han enfocado básicamente a la formulación de un medio de cultivo en el cual se logre

obtener la mejor producción analizando el efecto de diferentes tipos de sales o modificando, también las condiciones de pH y temperatura en el que se realiza la fermentación (63). Algunos medios de crecimiento usados en la producción de lipasas tienen como fuente de carbono algún polisacárido, triglicérido o ácidos grasos, también la adición de pequeñas cantidades de glucosa se utilizan para iniciar el crecimiento; las fuentes comunes de nitrógeno son: peptona, extracto de levadura, caseína hidrolizada y licor de maíz (56).

En varios microorganismos, una proporción de lipasa extracelular permanece unida a la pared celular. La presencia de lipasa enlazada a la pared celular puede inhibir la secreción de lipasa en el medio de cultivo y, por lo tanto, reduce los rendimientos. Algunas sustancias surfactantes estimulan su liberación y así incrementan la formación de lipasa extracelular (60). Muchos microorganismos producen 2 o más lipasas extracelulares con diferentes especificidades hacia los ácidos grasos, especialmente con respecto a los ácidos grasos de cadena corta (30).

1.5.4 Propiedades y estructura de lipasas microbianas purificadas.

Las lipasas son proteínas ácidas con un peso molecular que varía de 14,000 a 200,000 kd. Las actividades específicas de la proteína pura están entre 500 y 2000 unidades de lipasa por mg de proteína (Tabla 4).

TABLA 4.- Propiedades de lipasas purificadas.

Especie	P.M.	Punto isoeléctrico	Actividad Específica (U/mg)
<u><i>Aspergillus niger</i></u>	25,000	4.6	2400
<u><i>Candida cylindracea</i></u>	120,000	4.2	1140
<u><i>Chromobacterium viscosum</i></u>	30,000	7.3	5740
<u><i>Geotrichum candidum</i></u>	4,000	4.3	447
<u><i>Humicola lanuginosa</i></u>	27,000	----	1490
<u><i>Mucor javanicus</i></u>	21,000	----	1322
<u><i>Pseudomona fluorescens</i></u>	32,000	4.5	4200
<u><i>Rhizopus arrhizus</i></u>	43,000	6.3	9300
<u><i>Rhizopus delemar</i></u>	41,300	4.2	4000
<u><i>Torulopsis ernobili</i></u>	42,500	2.9	----

Tomada de Macrae, 1985 (43).

Los altos pesos moleculares pueden ser resultado de una autoasociación de moléculas de proteína de un bajo peso molecular, ya que se ha mostrado (por ejemplo) que la lipasa de *Aspergillus niger* (44), forma un dímero en un buffer de fosfatos a pH=7 (19).

La mayoría de las lipasas purificadas de microorganismos eucariontes son glicoproteínas conteniendo entre 2% y 5% de carbohidrato. La porción de carbohidrato de las glicoproteínas aparentemente no se requiere para expresión de actividad lipolítica (10). La función del carbohidrato de las lipasas no es muy claro; posiblemente facilite el paso de la proteína a través de la pared celular o la haga más resistente al ataque de proteasas extracelulares (55).

Algunos trabajos han sugerido que las lipasas contienen una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos y que esta característica es requerida para interaccionar con sustratos hidrofóbicos (64). También se ha reportado que las lipasas muestran una alta velocidad superficial en las interfaces aire-agua cuando se compara con otras proteínas (61). Esta alta actividad superficial resulta de una fuerte adsorción de las lipasas sobre superficies hidrofóbicas y puede explicar la alta actividad de las enzimas con sustratos insolubles.

Por otra parte la lipasa de G. candidum ha sido cristalizada y la estructura del cristal obtenida a una baja resolución de rayos X ha sido publicada (28). Los resultados muestran que el sitio activo posiblemente esté localizado en el centro de la molécula y que este unido a la superficie por medio de un canal con las dimensiones necesarias para acomodar a una molécula de triglicérido.

La entrada al sitio activo esta formado por dos cadenas alfa-hélices en la superficie de la proteína, y se puede postular que constituyen las porciones hidrofóbicas en la superficie de la enzima, la cual interactúa con las partículas insolubles del sustrato, ocasionando una reorientación de esta parte, lo que permite el traslado al interior de la proteína, de una molécula de sustrato y que alcance el sitio activo.

En las lipasas de cerdo y humano hay evidencias de que, en el sitio activo, se encuentre localizado un residuo de serina y que este es esencial para llevar a cabo la catálisis, en vista de que modificaciones químicas de este residuo (ser 152) hacen que se pierda la actividad enzimática (67).

1.6 Aplicaciones en la industria de las lipasas.

Las lipasas microbianas son manufacturadas comercialmente en Japón, Europa y Estados Unidos en cantidades pequeñas, aunque con el desarrollo de nuevas aplicaciones estas se han incrementado, dando como resultado la existencia de lipasas purificadas en forma de polvo, así como su inmovilización en soportes hidrofílicos (46), o su microencapsulamiento en polímeros sintéticos (55). El uso principal de estas enzimas ha sido en la industria farmacéutica, aunque debido a su gran diversidad de usos éstas han empezado a desarrollarse en otras áreas (1, 63, 3, 4, 61, 54), (Tabla 5).

Tabla 5.- Aplicaciones de las lipasas.

Detergentes	Eliminación de grasas.
Panificación	Preparación de pasteles y panes.
Confitería	Preparación de cremas, chiclosos y caramelos.
Lácteos	Producción de saborizantes.
Carnes	Preparación de embutidos.
Farmacia	Encapsulamiento de productos, elaboración de granulados.
Cosmetología	Producción de pastas dentífricas.
Síntesis orgánica	Síntesis de ésteres, interesterificación.
Microbiología médica	Auxiliar en la identificación de cepas patógenas.
Química clínica	Análisis de triglicéridos y fosfolípidos en suero.
Perfumería	Síntesis de ésteres terpénicos.
Análisis químico	Resolución de mezclas racémicas y alcoholes isoméricos terpénicos en base a la estereoespecificidad enzimática al esterificar.
Taxonomía	Clasificación de bacterias en base a producción de enzimas.
Alimentos	Industrias de aceites, quesos y helados.

Tomada de Harwood, 1989 (27).

Por lo anteriormente expuesto, observamos que existe un mercado importante para enzimas lipolíticas. En este proyecto, se ha considerado a las lipasas como una enzima que potencialmente pueda ser utilizada en detergentes.

Las razones y criterios que permitieron llegar a esta propuesta son las siguientes:

1.- La eliminación de grasa en ropa es un problema que los detergentes comunes no tienen resuelto adecuadamente.

2.- En la composición de los detergentes, el uso de enzima lipasa tiende a bajar los niveles de fosfatos (los cuales son un fuerte contaminante del medio ambiente).

3.- La eliminación de grasa en ropa (ejemplo tintorerías) se hace utilizando solventes tóxicos y de uso restringido.

De tal manera, se puede concluir que hay necesidad y mercado para una enzima que pueda eliminar grasa de una manera eficiente y barata, además que evite el uso de solventes químicos. Se considera que es posible aislar una lipasa, de algún microorganismo específico para la elaboración de detergentes que reúna las siguientes características (17):

- Estable y con actividad lipolítica a temperaturas entre 50 y 55°C.**
- Alcalina, que opere a velocidades altas de reacción en un pH de 7-10.**
- Que la actividad no se disminuya por la presencia de agentes oxidantes, sequestradores y surfactantes.**
- Estable durante la vida de anaquel del detergente.**
- Resistente a proteasas alcalinas.**

II.- ANTECEDENTES.

2.1 Búsqueda de enzimas lipasa de origen microbiano.

En un trabajo previo (63), realizaron una búsqueda de lipasas de origen microbiano con características para ser usadas en la elaboración de detergentes. Se partió de una selección de 66 cepas bacterianas crecidas en aceite de oliva como fuente de carbono, las cuales se caracterizaron y seleccionaron para eliminar aquellas cepas que no tuvieran actividad lipolítica buscada. Resultaron 11 cepas bacterianas seleccionándose por su capacidad para producir extracelularmente una lipasa activa a un pH de 9 y a 55°C (Tabla 6).

Tabla 6.-Características de las cepas seleccionadas.

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

(1) Centro de fijación de Nitrógeno.

(2) Barra de San José

* Es la misma cepa

Tomada de Tamayo, 1989 (63).

Sin embargo, de acuerdo a su procedencia, 3 de estas (32, 80, 83) resultaron ser la misma cepa, por lo que el trabajo solo se continuó con 9 cepas, a las cuales, en primera instancia, se les practicó la tinción de Gram, resultando Gram (-). Estas cepas bacterianas utilizan como fuente de carbono y energía una gran variedad de compuestos orgánicos. En donde mejor crecieron fué en el citrato, el glicerol y el etanol, mientras que la fuente de carbono que inhibió el crecimiento fué el fenol. Una segunda base para la selección de estas cepas fué el verificar su estabilidad génica para seguir produciendo la enzima lipasa después de 90 generaciones en medio LB. Las cepas 52 y 73 presentaron inestabilidad génica. Posteriormente, una selección importante fué el observar la actividad enzimática, cualitativa y cuantitativamente en un rango de pH de 7-9 y a una temperatura de 55°C.

Las cepas 3, 4 y 5 presentaron una actividad lipolítica menor que las cepas 32, 80 y 83. Por cuestiones de caracterización microbiológica, se consideraron una misma especie a las dos últimas cepas (80 y 83) y, en base a este criterio, se seleccionó a la cepa 83, la cual resultó tener una alta actividad enzimática en relación a las demás cepas.

2.2. Caracterización de la cepa productora de lipasa.

La clasificación taxonómica, hasta género y especie (con ayuda de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), solo se realizó para la cepa 83, la cual fué la más activa a pH's alcalinos y a una temperatura de 55°C, siendo estas algunas de las condiciones más importantes para su posible uso en detergentes.

De esta forma, se llegó a la conclusión que la cepa era Pseudomonas aeruginosa, especie que ha resultado ser la mas representativa del género y cuyas características mas sobresalientes para poder llegar a esta conclusión fueron:

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

b) Aerobios estrictos y nitrificantes capaces de crecer en condiciones de laboratorio.

c) La presencia de un pigmento azul-verdoso llamado piocianina, el cual fué responsable de que los cultivos y sobrenadantes presentaran una coloración azul-verdosa (33).

La regulación fisiológica de la actividad lipolítica de Pseudomonas aeruginosa (IGB 83) fué investigado por el crecimiento de esta bacteria en diferentes fuentes de carbono. Observándose que el glicerol y los triacilglicéridos inducen la actividad lipolítica, mientras que el acetato la inhibe. La temperatura de medición para la actividad lipolítica fué a los 55°C y a un pH de 10. Posteriormente, la lipasa fué purificada y tuvo un peso molecular de 58 kd y su punto isoelectrico de 8, (50).

Una comparación con otras cepas de Pseudomonas productoras de lipasa se resume en la tabla 7.

Tabla 7.- Características bioquímicas de lipasas de diferentes cepas de Pseudomonas.

Cepa	Peso molecular (kda)	pH óptimo	Temperatura óptima °C	Punto isoeléctrico	LPS
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>					
IGB83	58	10	55	8.0	+
TE3285	29	7-9	48	5.9	ND
PACIR	29	8	37	5.7	+
YS-7	39	7	30	ND	ND
EF2	29	8.7	50	4.9	+
NovSp109	29	7-10	45	5.3	+
	ND	6.5	37	7.0	ND
<u>Pseudomonas fluorescens</u>					
MC50	55	8.5	35	ND	+
LS107D2	50	ND	ND	ND	+
SIKW1	52	8.0	34	ND	ND
<u>Pseudomonas fragi</u>					
IFO3458	15	ND	ND	ND	ND
IFO12049	29	ND	ND	ND	ND
NCDO752	25	8.3	ND	ND	+

Pseudomonas cepacia

DSM50181	33	8.5	37	ND	+
----------	----	-----	----	----	---

Pseudomonas glumae

PGI	33	9	30	6.0	ND
-----	----	---	----	-----	----

Tomada de Soberón, 1994 (58).

Se observa que a pesar de que las lipasas provienen de un mismo género microbiano en este caso Pseudomonas, tienen diferencias importantes en el peso molecular, pero la mayoría de ellas tienen actividad lipolítica en un pH alcalino además de ser termoestables (7, 17, 36). Por lo que al haber obtenido una lipasa con las características antes señaladas nos llevó a realizar un estudio más amplio y así poder determinar su posible uso en detergentes y considerarla como un candidato a ser de las enzimas de uso industrial.

2.3 Motivos para transferir el gen de lipasa de Pseudomonas aeruginosa a Xanthomonas campestris

Al seleccionar Pseudomonas aeruginosa cepa IGB 83, la cual produce una lipasa activa a 55°C y pH 8.5 tenemos que ésta tiene las características para ser incorporada en detergentes pero también sabemos que Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista del hombre que produce varias

proteínas extracelulares implicadas en su patogenicidad, tales como toxina A, proteasa alcalina, fosfolipasa, elastasa, etc. (55,15).

Existen normas para el empleo de microorganismos a nivel industrial establecidas por la FDA (Food and Drug Administration), las cuales únicamente permiten la utilización de microorganismos, considerados como seguros (GRAS). Por esta razón la cepa IGB 83 no puede ser usada para producir lipasa a nivel industrial.

Por lo anterior, se decidió transferir la información genética que codifica para la lipasa en un microorganismo considerado como seguro. Una de las bacterias utilizadas industrialmente es Xanthomonas campestris para la producción de un exopolisacárido, la goma xantana el cual tiene gran aplicación en alimentos y en la extracción de petróleo (20, 21). Por la relación taxonómica con Pseudomonas, la patogenicidad de Pseudomonas aeruginosa y porque Xanthomonas campestris produce enzimas extracelulares, se decidió expresar la lipasa en esta bacteria, mediante conjugación, que es una forma de transferencia de DNA de una célula donadora a una receptora (52).

III.- OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General

Expresión de una lipasa producida por Pseudomonas aeruginosa (IGB-83), en diferentes cepas de Xanthomonas campestris y en distintos medios de cultivo.

3.1.1 Objetivos Particulares.

I.- Obtención de la cepa recombinante de Xanthomonas campestris IBT 148 (pBP13), incluyendo estudios de:

- a) Estabilidad del gen de lipasa en la cepa.
- b) Evaluación de la actividad lipolítica en distintos medios de cultivo
- c) Estudio de la influencia de los inductores.
- d) Caracterización cinética de la cepa IBT 148(pBP13)

II.- Expresión de lipasa en diferentes cepas de Xanthomonas campestris utilizando el plásmido pBP13.

3.2 Contribución y Perspectiva del presente trabajo.

Las principales contribuciones y perspectivas de este trabajo a los campos de microbiología industrial y tecnología de las fermentaciones son las siguientes:

- a) El mejoramiento genético de Xanthomonas campestris IBT 148 (pBP13) en la producción de una enzima lipasa con posibilidades para usarse en detergentes.

b) Contribuir al conocimiento de fenómenos involucrados en los procesos fermentativos en la producción de metabolitos de interés industrial.

IV.- MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos.

En el desarrollo experimental se usaron los reactivos que se detallan a continuación.

Acido bórico

Acido sulfúrico

Agar

Agua destilada

Arginina

Carbencilina

Cloruro de amonio

Cloruro de calcio

Cloruro de cobalto

Cloruro de níquel

Cloruro de sodio

EDTA

Estreptomicina

Extracto de levadura

Fosfato ácido de potasio

Fosfato ácido de sodio

Glicerol

Glucosa

Isopropanol
Isopropil β -tio-galactopiranosido
Lactosa
Membrana Millipore
Molibdato de cobre
Nitrato de sodio
Peptona
Rifampicina
Rojo de cresol
Sulfato de cobre
Sulfato de fierro
Sulfato de manganeso
Sulfato de magnesio
Sulfato de potasio
Sulfato de zinc
Tributirina
Tris-HCl
Yoduro de potasio

4.1.2 Equipo

Agitador magnético
Agitadora para matraces New-Brunswick
Autoclave
Calentador
Centrífuga Beckman J2-21
Colorímetro

Espectrofotómetro
Incubadoras para cajas petri
Mecheros Bunsen
Potenciómetro
Rotor JA-20
Vortex

4.1.3 Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepa o Plásmido	Características	Referencia
<u>Escherichia coli</u>		
HB101	rec A, str ^r	9
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>		
PAO 2003	arg ⁻ , str ^r , cb ^r , recA	53
IGB 83	actividad lipolítica	50
<u>Xanthomonas campestris pv. campestris</u>		
IBT 148	rif ^r derivada de la cepa NRRL B1459	44
IBT 149	rif ^r derivada de la cepa NRRL B1459	
8004	rif ^r cepa silvestre	65
8288	rif ^r no secreta proteínas defecto en los genes xcp.	14
B100	str ^r cepa silvestre colección alemana (productora de goma xantana).	29

B100-13	str ^r no produce goma	20
CHE1	rif ^r derivado de la cepa IBT 148	44
CHE2	rif ^r derivado de la cepa IBT 148	
CHE3	rif ^r derivado de la cepa IBT 148	

Plásmidos

pMMB22	Tiene un promotor tac, Ap ^r , str ^r	6
pBP13	Lip ^r , str ^r , cb ^r	Este trabajo

Las cepas fueron conservadas en gliceroles a -15°C.

4.2 Métodos

4.2.1 Medios de cultivo

Medio FAM

Sales	100 ml (ver adelante)
Trazas	2.5 ml (ver adelante)
Agar	1.5 gr

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

Sales

Se preparó una solución 10x (g/L)

NaNO ₃	(100 mM)	0.85
KH ₂ PO ₄	(41 mM)	0.56
Na ₂ HPO ₄	(160 mM)	2.17
K ₂ SO ₄	(9.8 mM)	0.17
MgSO ₄	(1.5 mM)	0.037
CaCl ₂	(0.6 mM)	0.007
EDTA + Fe ⁺⁺⁺	(0.1 mM)	0.004

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Trazas (g/L)

ZnSO ₄	(0.8 mM)	0.232
MnSO ₄	(1.1 mM)	0.178
H ₃ BO ₃	(0.9 mM)	0.056
CuSO ₄	(6.0 mM)	0.1
Na ₂ MoO ₄	(0.2 mM)	0.039
CoCl ₂	(0.2 mM)	0.092
KI	(0.4 mM)	0.066
EDTA + Fe ⁺⁺⁺	(0.3 mM)	0.1
FeSO ₄	(0.1 mM)	0.04
NiCl ₂	(1.7 mM)	0.4
H ₂ SO ₄	(0.8 mM)	0.1

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Medio M-9 (g/L)

Na ₂ HPO ₄	6.0
KH ₂ PO ₄	3.0
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1.0

Ajustar pH= 7.4, esterilizar, enfriar y adicionar:

1.0 M	MgSO ₄	2 ml
1.0 M	CaCl ₂	0.1 ml

Se esterilizan por separado.

Medio PY

Peptona de caseína	0.5 %
Extracto de levadura	0.3 %
CaCl ₂	7mM (agregar después de esterilizar).

Se adicionaron en diferentes combinaciones glicerol al 2%, IPTG 5 mM, lactosa 1.8% y glucosa al 0.2 % (los cuales se esterilizan por separado).

En todos los casos, la esterilización se llevó a 121°C durante 20 minutos.

4.2.2 Concentración de antibióticos usados: (µg/mL)

Carbencilina (cb)	800
Rifampicina (rif)	50
Estreptomicina (str)	200
Tetraciclina (tc)	10

4.2.3 Condiciones de cultivo

Las cepas se crecieron en matraces erlenmeyer de 125 mL, los cuales contenían 20 mL de medio FAM, M9 y PY, usando como inductor al glicerol y lactosa, en diferentes combinaciones. Para solidificar se utilizó agar Difco 1.5 %.

La temperatura de crecimiento fué 29°C. los cultivos líquidos se agitaron 24 horas a 200 r.p.m. en baño de temperatura de agua y los cultivos sólidos se incubaron 48 horas hasta obtener colonias aisladas.

El crecimiento celular fué medido por densidad óptica a 565 nm, en un espectrofotómetro, contando con un blanco de agua destilada.

4.2.4 Obtención de la enzima

Dado que la lipasa es una enzima extracelular, el medio de cultivo después del tiempo indicado de incubación, se centrifugó a 8,000 r.p.m. (en un rotor JA-20, para centrífuga Beckman J2-21) por 15 minutos para separar células y obtener el sobrenadante conteniendo la enzima. Este sobrenadante es filtrado a presión a través de una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.22 μm de diámetro, recibiendo el filtrado en matraces previamente esterilizados.

4.2.5 Ensayo de actividad lipolítica.

4.2.5.1 Método cualitativo agar-tributirina.

En cajas petri se midió el diámetro del halo que se forma con la hidrólisis de la tributirina, las cajas contienen una emulsión de tris-HCl 50 mM a pH 8.5, más tributirina 3% (P/v) solidificado con agar 1.5% + rojo de cresol 1%. Después, en cada caja se hicieron pozos uniformes con sacabocados y vacío, en los cuales se adicionaron 25 μl de sobrenadante conteniendo la enzima; se incubó a 55°C por un periodo de 24 a 48 horas, tiempo en el cual aparece el halo formado alrededor del pozo.

4.2.5.2 Método cuantitativo por titulación con NaOH 50 mM.

La actividad lipolítica se realizó como lo describe Nahas (45), con algunas modificaciones. El ensayo de lipasa se realizó de la siguiente forma: como sustrato se usó una emulsión al 5% de tributirina (v/v) preparada en tris-HCl 50 mM homogeneizada por 20 minutos en licuadora: el pH fue ajustado a 8.5.

Solución problema.- La reacción contiene 2.5 mL de sustrato, 3.5 de buffer tris-HCl 50mM, pH 8.5 y 4 mL de sobrenadante del cultivo centrifugado, ajustando el pH a 8.5.

La reacción se determinó titulando a pH 8.5 contra NaOH 50 mM después de incubar a 55°C por 30 minutos. Las determinaciones se hicieron por duplicado, la actividad se expresó en U/mL. Definiéndose una unidad de enzima como la cantidad en la cual se libera un μmol de ácidos grasos libres por mL a 55°C y a pH 8.5.

Solución Control.- Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en la solución problema, pero en este caso se inactivó la enzima a una temperatura de 96°C por 10 minutos.

4.2.5.3 Método cuantitativo usando como sustrato paranitrofenilpalmitato (p-npp).

1.- 10 mL de isopropanol (2-propanol) contienen 30 mg de p-npp, el cual se afora a 100 mL con tris-HCl, 50 mM, pH 8.5.

2.- De la solución preparada se hace una dilución 1:100 cada vez que se haga un ensayo de actividad con buffer tris-HCl 50 mM pH 8.5.

3.- 490 ML de sustrato fresco se preincuban con 100 mL de enzima a la temperatura de reacción (50°C por 15 minutos).

4.- El ensayo se mide a la temperatura de reacción y a una longitud de onda de 410 nm contra un control libre de enzima (blanco).

5.- Bajo este sistema, una unidad de enzima se define como: 1 nmol de p-npp enzimáticamente liberado de sustrato/ μ L/min (46).

4.2.6 Segregación del plásmido.

Esta fué determinada por medio de subcultivos de las cepas de Xanthomonas campestris en medio PY sin antibiótico, durante cuatro días diluyendo cada 24 horas 1:100 (aproximadamente 50 generaciones). Al término de este período se tomaron 100 colonias y se crecieron en cajas con los antibióticos marcadores tanto de la cepa (rif) como del plásmido (cb). Se llevó a cabo un control positivo en cajas sin antibiótico.

4.2.7 Construcción del plásmido conteniendo al gen de lipasa.

El vector pMMB22 fué seleccionado para construir un plásmido conteniendo el gen de lipasa alcalina de Pseudomonas aeruginosa cepa IGB83 (49), (figura 3). Se purificó el DNA de la cepa IGB83, y se digirió parcialmente con la enzima de restricción EcoR1, los fragmentos se clonaron en el vector pMMB22, previamente digerido también con EcoR1. Posteriormente, vehículo y pasajero fueron ligados, y se procedió a transformar en E. coli, obteniéndose alrededor de 500 colonias. Las cuales fueron crecidas en medio M9 + glicerol + aceite de olivo + IPTG por 2 días a 37°C. Se seleccionaron aquellas que dieron halo (por hidrólisis del aceite de oliva) y se obtuvieron 13 colonias, lo cual indicaba que llevaban el gen que codifica para la lipasa.

Se procedió a congregar la cepa de *E. coli* (conteniendo los plásmidos recombinantes) con la cepa PAO 2003 (Arg^- , str^r) y se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en medio FAM arg^- , str^r utilizando como fuente de carbono aceite de olivo. Esto con el objeto de que el plásmido se transfiriera a la cepa PAO 2003. Se obtuvieron 28 colonias, de las cuales, la colonia 1 y 13 mostraban un halo mayor al evaluarse cualitativamente la actividad lipolítica, de esta forma se obtuvieron las transconjugantes PAO 2003/pBP13 y PAO 2003/pBP1. Figura (4).

4.2.8 Conjugación de las cepas.

Fueron realizadas plateando cultivos 1:1 de las cepas donadoras y receptoras sobre medio PY y manteniendo esto por 24 horas. Posteriormente la mezcla fué plateada en medio con el marcador selectivo tanto de la cepa como del plásmido.

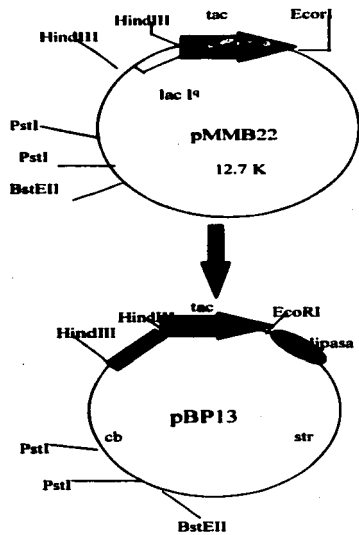


Figura No. 3 Vector para clonar el gen de lipasa

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 Obtención y expresión de la cepa recombinante de Xanthomonas campestris conteniendo el gen de lipasa.

5.1.1 Estrategia utilizada para transferir el gen de lipasa de Pseudomonas aeruginosa a Xanthomonas campestris.

La transconjugante PAO2003 (pBP13), conteniendo el gen de lipasa (y que puede utilizar aceite de olivo como fuente de carbono) fué usada como donadora en la conjugación con Xanthomonas campestris IBT 148 (rif, str^r).

La conjugación fué realizada en un medio selectivo (PY, rif, cb). Con esto nos aseguramos que solo crecerá la cepa de Xanthomonas campestris, ya que no existen los marcadores para la cepa PAO 2003; y el plásmido pBP13 fué incorporado a la cepa de X. campestris. IBT148(pBP13) (figura 4).

Posteriormente esta cepa recombinante fué cultivada en condiciones para producir enzima lipasa y observar cualitativamente su actividad lipolítica. El resultado fué positivo.

5.1.2 Estabilidad del plásmido pBP13 en la cepa de Xanthomonas campestris pv campestris.

En los procesos industriales, cuando se trabaja con microorganismos recombinantes, se usan plásmidos como vectores de expresión, los cuales al replicarse autónomamente, no son esenciales para la viabilidad de las células y en ocasiones son segregados de una generación a otra (37). Las células que pierden plásmidos poseen una tasa de crecimiento mayor a las que lo han conservado. Así, tras un cierto número de generaciones, el medio de cultivo

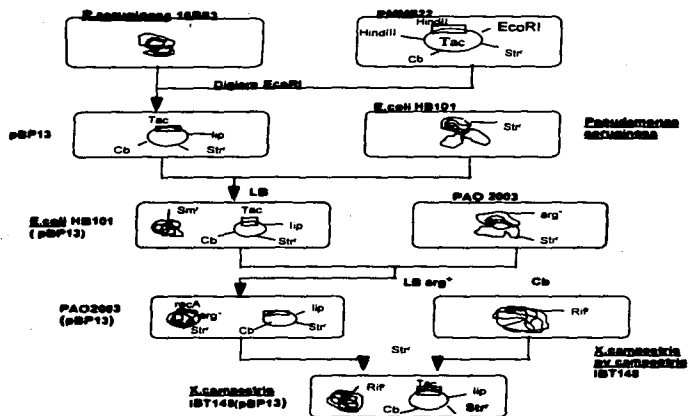


Figura 4: Obtención de la cepa de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* con el gen de lipasa (pBP13).

queda invadido de células sin interés, lo que redituará una deficiente producción (62).

La segregación del plásmido es de suma importancia, sobre todo en el escalamiento, en donde es necesario desarrollar a las bacterias por varias generaciones y por lo tanto se incrementa la probabilidad de segregación. Por otra parte, el mantenimiento de condiciones selectivas con la presencia de un marcador (que nuestro caso es carbencilina) resultaría muy costoso en los fermentadores de volumen considerable, además de que este marcador ejerce su efecto en un corto tiempo lo que no nos aseguraría la pureza del cultivo.

Por lo anterior, se realizó un estudio con el fin de establecer la necesidad de la presencia de la carbencilina cuantificando los porcentajes de segregación del plásmido (pBP13) sin presión selectiva en la cepa de Xanthomonas campestris.

Después de subcultivos (aproximadamente 50 generaciones) los resultados fueron de un 2% de segregación global promedio. Lo que nos muestra que el plásmido pBP13 tiene una alta estabilidad en la cepa IBT 148 de Xanthomonas campestris. De acuerdo con estos datos, la carbencilina solo debe usarse como medida de seguridad en los inóculos. Aunque hay que hacer notar que la presencia del plásmido no es un indicador que nos asegure una elevada biosíntesis de lipasa ya que el plásmido puede sufrir deleciones en la región del operón lac o bien en los mismos genes estructurales, impidiendo la producción de lipasa, y aún así seguir conservando la resistencia al antibiótico.

5.1.3 Evaluación de la actividad lipolítica de la cepa IBT 148 (pBP13) crecida en un medio de cultivo con diferentes condiciones.

La cepa IBT 148 tiene al plásmido pBP13 que contiene un promotor híbrido lac, que consiste en la región -35 trp (triptofano) unida a la región -10 lac (lactosa), es un promotor fuerte ya que causa que el mRNA se inicie a una alta frecuencia. Este promotor lac es regulado por el represor lac y puede ser inducido por la adición de IPTG (isopropil β -D-tiogalactósido). En lo que respecta a la adición de glicerol, es posible que el gen clonado en el plásmido pBP13 conserve sus propias zonas reguladoras ya en la cepa de Pseudomonas aeruginosa, la adición de triglicéridos al medio de crecimiento mostró un incremento sustancial en la producción de lipasa (35) y esto mismo se repetía cuando se adicionaba glicerol al medio de cultivo de la cepa recombinante de Xanthomonas campestris en cuanto a la producción de lipasa. Se podría pensar que existía un incremento de actividad lipolítica porque el cultivo crecía más al tener una fuente adicional de carbono; sin embargo los resultados muestran (figura 5) que, al crecer la cepa IBT 148(pBP13) con medio PY y PY- glucosa no existe actividad enzimática por no ser estos inductores del plásmido.

Sin embargo, cuando crecimos en PY-glicerol mostró un incremento sustancial en la producción de lipasa y cuando utilizamos PY-glucosa glicerol esta se incrementó en un 58% más con respecto a la anterior, posiblemente debido a que la glucosa incrementó la biomasa; finalmente se trabajó con el medio PY-glucosa-glicerol-IPTG mostrando un efecto aditivo en lo que respecta a la actividad lipolítica ya que ésta se incrementó en un 90% mostrando también que tanto el glicerol como el IPTG funcionaban como

inductores con un efecto aditivo ya que cuando alguno de ellos faltaba, la actividad disminuía.

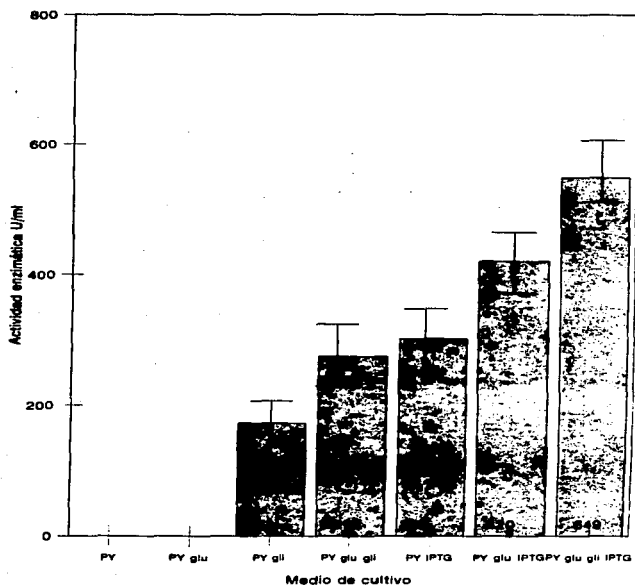


Figura 5.- Actividad lipolítica de la cepa IBT 148(pBP13) crecida en diferentes condiciones de cultivo.

5.1.4 Evaluación de la actividad lipolítica de la cepa IBT148 (pBP13) crecida en diferentes medios de cultivo.

Se evaluó la actividad enzimática de la cepa IBT148(pBP13) en medios de cultivo diferentes para conocer la producción de enzima en cada uno de ellos, ya que es importante tener conocimiento en términos cuantitativos para elegir al medio adecuado de producción. Los medios de cultivo fueron M9 (que es un medio mínimo), FAM (medio mínimo) y PY (que es un medio rico), adicionando a cada uno de ellos glucosa, glicerol e IPTG desde el inicio de la fermentación.

En la figura 6, se ilustran los datos de las cinéticas de las fermentaciones en los medios M9-glu-gli-IPTG, FAM-glu-gli-IPTG y PY-glu-gli-IPTG, respectivamente. En el primero de ellos (M9) se logró un $\mu=0.097 \text{ hr}^{-1}$, el cual deja de crecer a las 12 horas alcanzando una concentración celular máxima de 1.8 g/L y una producción específica de lipasa de 169 U/g.

En el caso del medio (FAM) se observa un crecimiento del organismo con una $\mu=0.082 \text{ hr}^{-1}$, llegando a su estado estacionario a las 12 horas, donde la concentración celular es de 1.8 g/L, su producción específica de lipasa es de 133 U/g, mostrando una disminución en relación con la anterior.

Por último, el medio PY, en donde el microorganismo creció con una $\mu=0.12 \text{ hr}^{-1}$ alcanzando su estado estacionario a las 12 horas en donde tiene una concentración celular de 2.5 g/L y su producción específica de lipasa fué de 194 U/g.. Esta actividad fué la más alta por lo que pensamos que este medio, por ser un medio rico, es el más adecuado para su producción.

Por otra parte, adicionamos, IPTG desde el inicio de la fermentación y a las 12 horas (que es tiempo en que deja de crecer en cada medio de cultivo) observamos que existe una mayor actividad cuando agregamos IPTG desde el inicio de la fermentación en cada uno de los medios que cuando es agregado a las 12 horas, figura (No. 7), esto pudiera deberse a que, a medida que la concentración de biomasa va aumentando, esta se va induciendo mientras que a las 12 horas la propia producción aunque mínima de goma podría interferir en la asimilación del inductor.

Cabe hacer mención que los inóculos fueron en las mismas cantidades y en el mismo medio (PY) sometidos a presión selectiva (cb) para asegurarse que no se desarrollarán segregantes que no contengan la información genética contenida en el plásmido.

Con el fin de determinar el momento de suspender la fermentación, se estableció como parámetro cosechar los cultivos a las 24 horas.

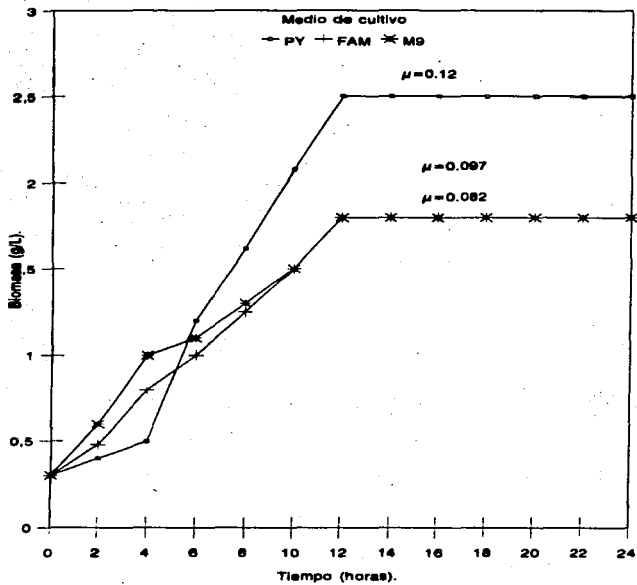


Figura 6: Cinética de crecimiento de la cepa IBT 148 (pBP13) en diferentes medios de cultivo.

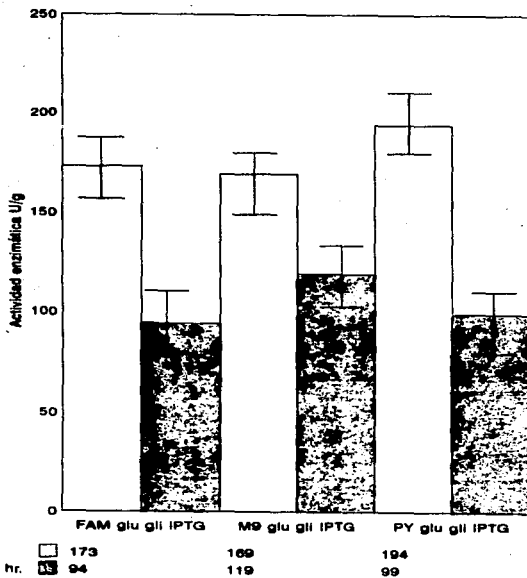


Figura 7.- Actividad de la cepa IBT 148(pBP13) en tres medios (FAM, M9, PY) con diferentes tiempos de inducción.

5.1.5 Influencia de los inductores en la actividad lipolítica de la cepa IBT 148 (pBP13).

Se tiene que la inducción es el aumento específico en la concentración de una enzima como respuesta a la presencia de una sustancia química determinada (inductor). Generalmente, el inductor es un sustrato del sistema enzimático, aunque en algunos casos puede ser producto de la reacción, pero, con frecuencia existen análogos químicos relacionados con el inductor que estimulan también la formación (inductores gratuitos).

Para conocer el comportamiento de la cepa híbrida IBT 148 (pBP13) respecto al fenómeno de inducción (en donde según experimentos mostrados se ve influenciada por los inductores que son el glicerol e IPTG); el primero por ser un producto del sistema enzimático de la cepa de Pseudomonas aeruginosa y que el gen al ser clonado conservó sus regiones reguladoras. En el caso del inductor gratuito IPTG, el gen fué clonado en un plásmido que tiene un promotor híbrido lac, por lo que la expresión del gen ocurre cuando se adiciona este inductor (21,32)

Con el fin de sustituir el IPTG (que es un potente inductor pero su costo lo hace inaplicable para propósitos biotecnológicos) se probó a un azúcar metabolizable como es la lactosa, que inactiva también al represor lac, por lo que se evaluó cuantitativamente su inducción por medio de la actividad lipolítica producida por la cepa híbrida.

Para encontrar la concentración más adecuada del inductor en la producción de enzima de la cepa híbrida, se realizaron cultivos a diferentes concentraciones de IPTG (3,5 y 7 mM) y lactosa (0.9, 1.8 y 2.5 %) (figura 8).

Se obtuvo una actividad lipolítica de 485, 705 y 595 (U/ml) cuando se trabajó con IPTG siendo la mayor a una concentración de 5mM. En el caso de la lactosa, las actividades fueron en el orden de 502, 749 y 605 (U/ml), siendo la mayor cuando se trabajó a una concentración del 1.8%. Cabe mencionar que experimentos posteriores a mayor volumen (1 litro) y con un medio de cultivo (AL1 y AL2) derivado del que se utiliza en la producción de goma xantana (con un incremento de nitrógeno para disminuir la relación C/N y de esta forma minimizar la producción de goma xantana) se obtuvieron mejores resultados cuando se trabajó a una concentración de 2mM de IPTG. Esto pudiera deberse a que, la producción de goma xantana de la cepa híbrida varíe al cultivarse en diferentes medios y que esta este relacionada en la estabilización de la enzima.

Como se observa (figuras 9,10, y 11) la actividad se ve disminuida cuando el medio PY IPTG/lactosa carece de glucosa y glicerol. Esto pudiera deberse a que, en el primer caso (ausencia de glucosa), la cepa híbrida agota la fuente de carbono del medio de cultivo necesitando una fuente externa de este elemento para complementar su desarrollo. En el caso del glicerol, este es un inductor que pudiera estar relacionado con partes reguladoras del gen original de Pseudomonas aeruginosa ya que, al adicionar a este, se observó un incremento sustancial en la actividad. Mostrando nuevamente un afecto aditivo con los otros inductores (IPTG/lactosa). En lo que respecta a las cinéticas, fueron muy parecidas cuando utilizamos a la lactosa o IPTG, obteniendo una mayor actividad lipolítica cuando utilizamos el primero como inductor (figura 12).

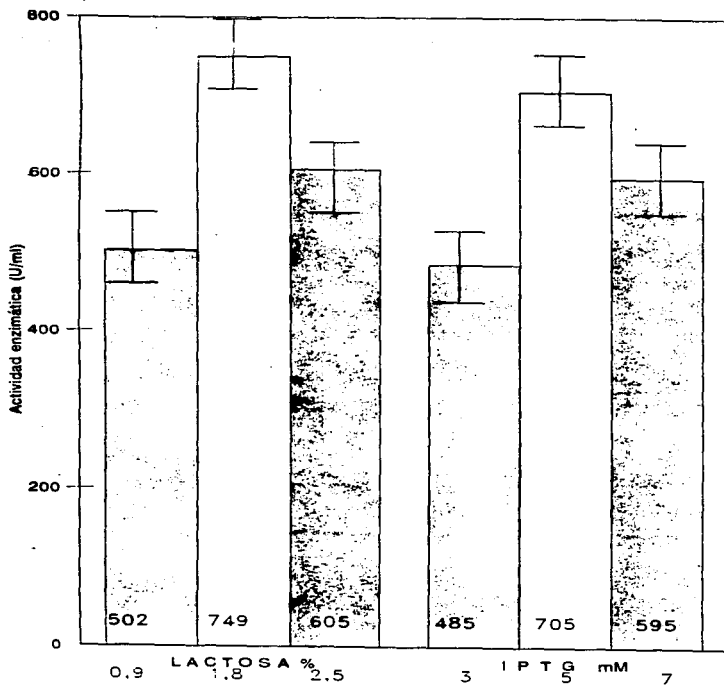


Figura 5. Producción de lipasa de la cepa IBT 146(pBP13) utilizando lactosa e IPTG como inductores a diferentes concentraciones.

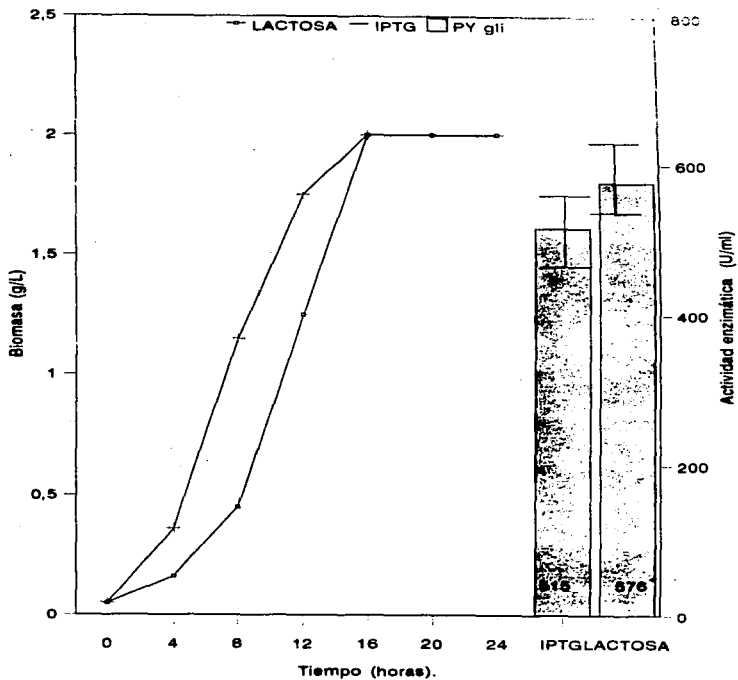


Figura 9: Producción de lipasa en la cepa IBT 148(pBP13) utilizando (PY gli lac) y (PY gli IPTG).

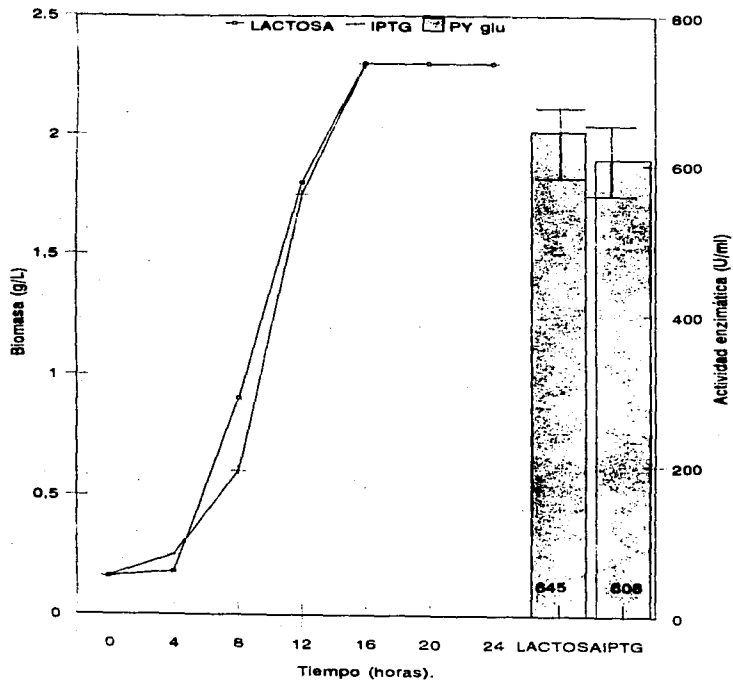


Figura 10 Producción de lipasa en la cepa IBT 148(pBP13) utilizando (PY glu lac) y (PY glu IPTG).

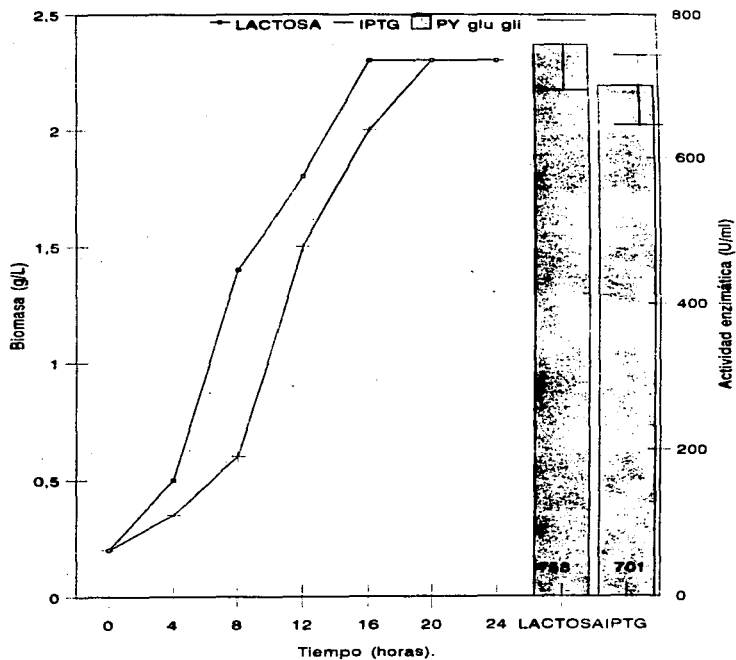


Figura 11: Producción de lipasa en la cepa IBT 148(pBP13) utilizando (PY glu gli lac) y (PY glu gli IPTG).

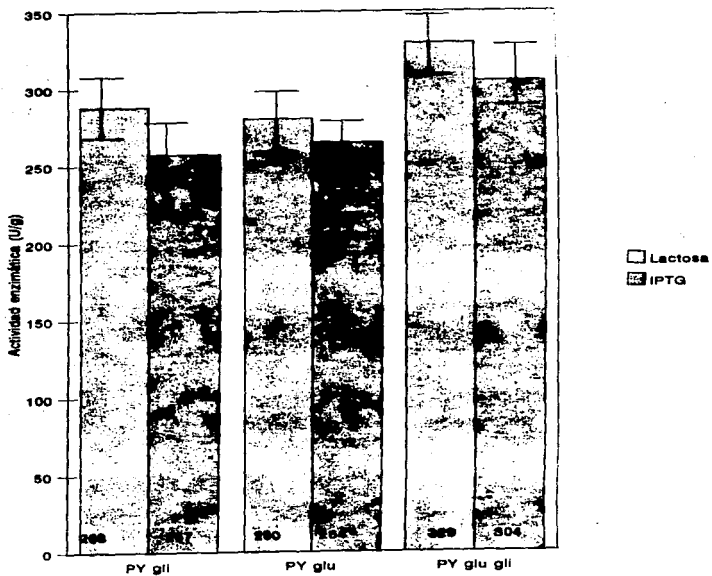


Figura 12: Comparación de la actividad lipolítica por gramo de células de la cepa IBT 148 (pBP13) utilizando lactosa e IPTG como inductores.

5.1.6 Cinética de crecimiento y producción de lipasa de la cepa de Xanthomonas campestris IBT 148 (pBP13).

La tecnología de las fermentaciones está basada en la búsqueda de factores limitantes a partir de estudios de la cinética de crecimiento. Esto es importante para entender el comportamiento de cualquier fermentación, en términos de las velocidades de síntesis celulares o la formación de productos, así como también de los efectos del medio ambiente. Teniendo como marco de referencia lo anterior se llevó a cabo una caracterización de los datos cinéticos del crecimiento de la cepa de Xanthomonas campestris IBT 148 (pBP13) con la producción de lipasa utilizando el medio PY glucosa-glicerol-lactosa. Se observa (figura 13), que la producción de enzima se da desde el inicio de la fermentación y la mayor producción se obtiene entre un periodo de las 13 horas a las 20 horas alcanzando un máximo a las 16 horas. Por ello, experimentos posteriores se llevaron tomando en cuenta estos tiempos. También se observó que la cepa recombinante tiene una μ de 0.17 hr^{-1} .

En lo que respecta a la enzima lipasa, su actividad fué evaluada a una temperatura de 55°C y se observó que mantiene su actividad, lo que nos sugiere que es termoestable. El pH en el cual se realizó esta medición de actividad fué de 8.5, es importante la medición a estas condiciones ya que son las que se requieren para su posible uso en detergentes.

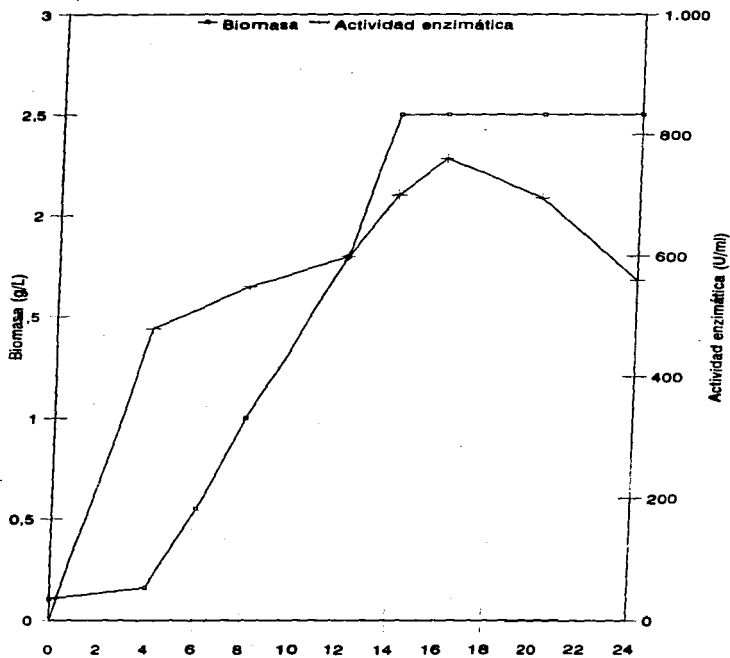


Figura 13: Cinética de crecimiento de la cepa 148(pBP13) y la producción de lipasa, utilizando medio PY glucosa-glicerol-lactosa.

5.1.7 Expresión de lipasa en diferentes cepas de Xanthomonas campestris utilizando el plásmido pBP13.

Se evaluó la actividad lipolítica del gen de lipasa proveniente de Pseudomonas aeruginosa en diferentes cepas de Xanthomonas campestris con diferentes características en cuanto a la producción de goma xantana y la secreción de proteínas.

Las cepas IBT 148 y 149 son derivadas de la NRLB 1459 productoras de goma xantana en donde la cepa IBT 149 forma colonias blancas y la IBT 148 forma colonias amarillas. La cepa 8004 es una cepa silvestre productora de goma y la cepa 8288 es una mutante de la cepa 8004 la cual no secreta proteínas ya que tiene un defecto en los genes xcp que están relacionados en la ruta de secreción. Las cepas provenientes de una colección alemana B100 (sm⁺) (29) es una productora de goma y la B100-13 es una mutante de la cepa B100 y tiene como particularidad ser deficiente en la producción de goma xantana. Por otra parte se trabajó con las cepas CHE1, CHE2 y CH3 que son mutantes quimiotácticas derivadas de la cepa IBT 148 y que tienen como característica que al crecerlas en condiciones de producción de goma xantana (en relación con la cepa original) solo producen el 60%, 9% y 7% ya que son mutantes que están alteradas en su fenotipo de producción de goma xantana.

Para conjugarles el plásmido pBP13 a cada una de éstas, la estrategia seguida fué la que se ilustra en las figuras 14, 15, 16. La transconjugante IBT 148(pBP13 rif^r, sm⁺,cb^r), fué usada como donadora para conjugarse con las cepas; B100 (sm⁺), B100-13(sm⁺) obteniéndose las cepas recombinantes B100 (pBP13) y B100-13 (pBP13).

Por otra parte, utilizamos a la cepa PAO 02003 (pBP13) (rec a, arg⁻, str^r, cb^r) usada como donadora y la conjugamos con las cepas 8288 (rif^r), 8004

(rif) y las CHE1, CHE2, CH3 (rif) obteniéndose las cepas recombinantes respectivas, 8288 (pBP13), 8004 (pBP13), CHE1 (pBP13), CHE2 (pBP13) y CHE3 (pBP13).

Posteriormente, a cada una de las cepas híbridas les fué evaluada la estabilidad del plásmido, realizando un crecimiento seriado sin presión selectiva durante cuatro días (diluyendo cada 24 horas 1:100). Al término de este periodo se realizaron diluciones continuas con agua estéril, se plateó la dilución 10^5 , se tomaron 100 colonias y se crecieron con los antibióticos marcadores tanto de la cepa como del plásmido. Paralelamente se llevó un control positivo en cajas, obteniéndose finalmente que el plásmido tiene una gran estabilidad en cada una de las cepas (tabla 8).

5.1.7.1 Cinéticas de crecimiento y cuantificación de actividad lipolítica de diferentes cepas de Xanthomonas campestris utilizando el plásmido pBP13.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas así como la cuantificación de actividad lipolítica. Se observó que, en todos los casos, las cepas híbridas crecen a una menor velocidad específica de crecimiento que las cepas silvestres, (figuras 17,18, 19, 20, 21 y 22).

En cuanto a su actividad lipolítica por gramo de células (figura 23), se observó que las cepas: IBT 148(pBP13), B100 (pBP13) y CHE1 (pBP13) producen más actividad que las otras cepas. Estas cepas son productoras de goma xantana por lo que podemos inferir que de alguna forma existen mecanismos en la ruta de secreción del exopolisacárido que faciliten la secreción de lipasa. El fenómeno también podría estar relacionado con la estabilidad de la enzima ya que en el caso de las CHE2 (pBP13), CHE3

(pBP13) y B100-13 (pBP13) -que son mutantes que no producen goma- la actividad fué menor. En el caso de la cepa 8004(pBP13) -que tambien produce goma- pero que no tuvo actividad, probablemente se debió a que el medio de cultivo para esta no fue el adecuado y las rutas de secreción de la goma no permitieron la producción de enzima y, por lo tanto, la actividad lipolítica fué nula. En el caso de la cepa 8288(pBP13) este resultado se esperaba ya que esta era una mutante que no secretaba proteínas, probablemente por tener deleciones en los genes xep que están relacionados con la ruta de secreción y no produce actividad por no existir secreción de lipasa.

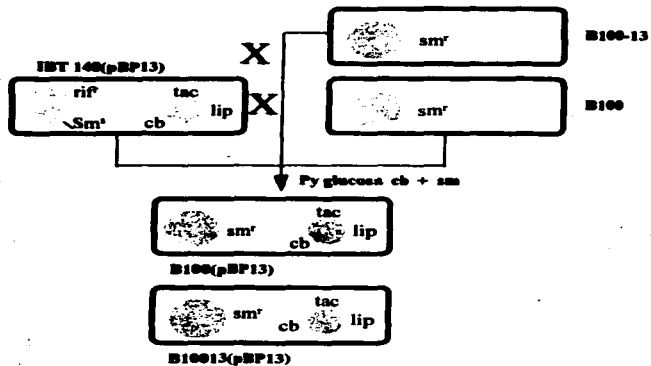


Figura 14: Obtención de las cepas B100 Y B100-13 de *X. campestris* con el gen de lipasa (pBP13).

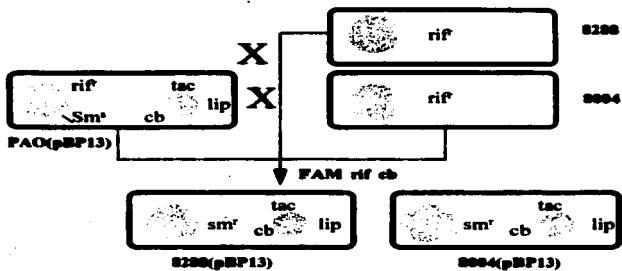


Figura 15: Obtención de las cepas 8288 y 8004 de *X.campestris* con el gen de lipas (pBP13).

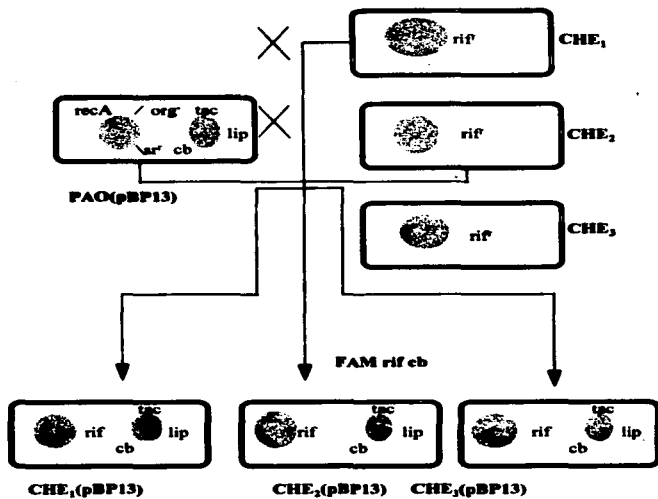


Figura 16: Obtención de las copas quimiotácticas CHE₁, CHE₂ y CHE₃ de *X. camestrin* con el gen de lipasa (pBP13).

ESTABILIDAD DE LOS PLASMIDOS

CEPAS/PLASMIDOS	% PERDIDA DE PLASMIDO
148(pBP13) RIF/CB	2
149(pBP13) RIF/CB	3
8288(pBP13) RIF/CB	2
8004(pBP13) RIF/CB	2
B100(pBP13) SM/CB	5
B10013(pBP13) SM/CB	2
CHE1(pBP13)	2
CHE2(pBP13)	2
CHE3(pBP13)	2

Tabla No. 8: Estabilidad del plásmido (pBP13) en cepas de *Xanthomonas campestris*.

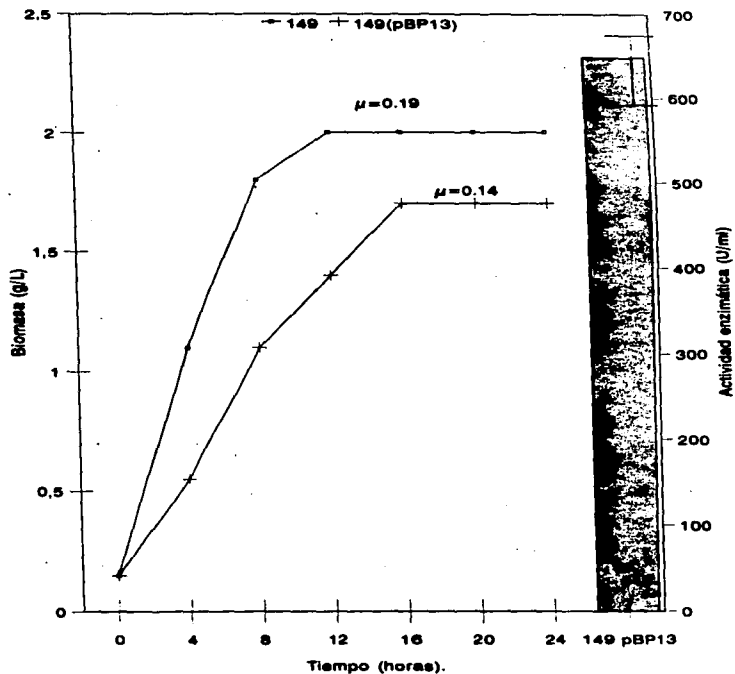


Figura 17: Cinética de crecimiento de las cepas IST 149, IST 149(pBP13) con producción de lipasa.

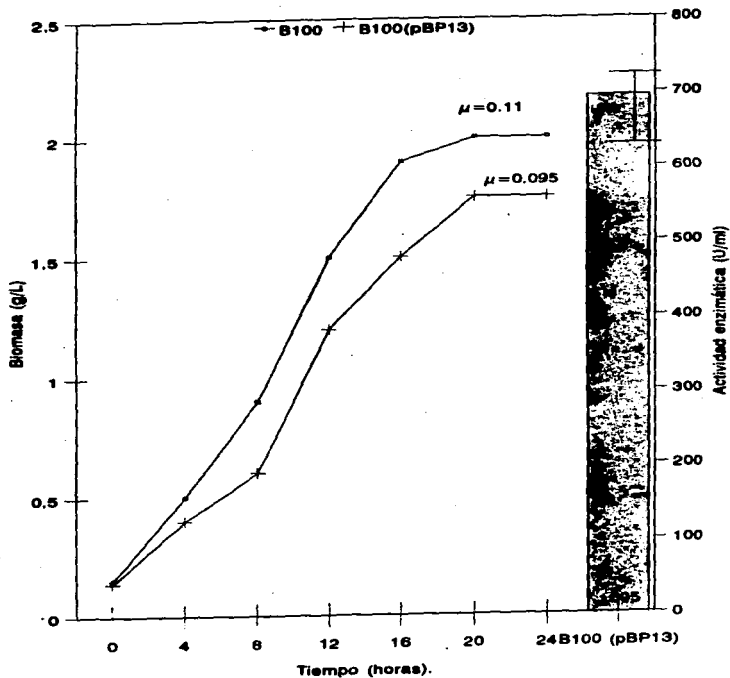


Figura 18: Cinética de crecimiento de las cepas B100, B100(pBP13) con producción de lipasa.

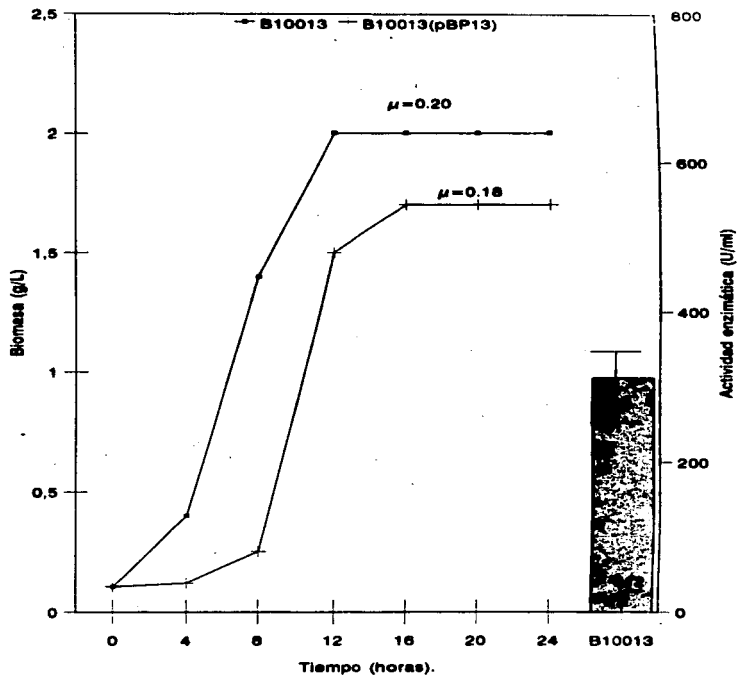


Figura 19: Cinética de crecimiento de las cepas B10013, B10013(pBP13) con producción de lipasa.

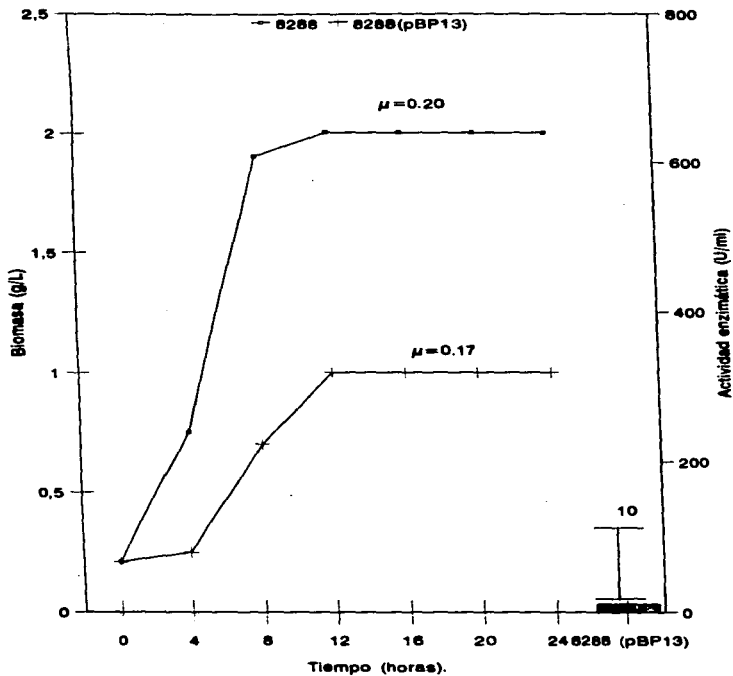


Figura 20: Cinética de crecimiento de las cepas 6266, 6266(pBP13) con producción de Ilpasa.

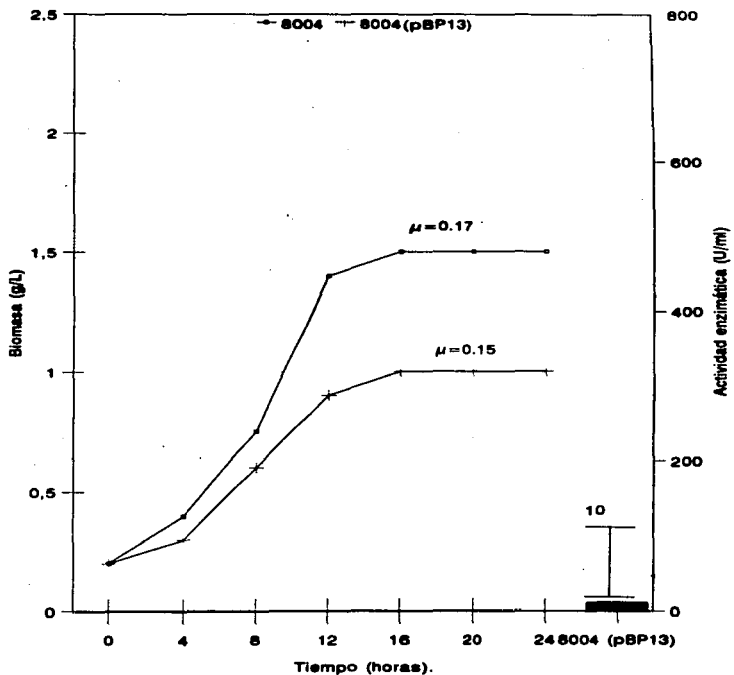


Figura 21: Cinética de crecimiento de las cepas 8004, 8004(pBP13) con producción de lipasa.

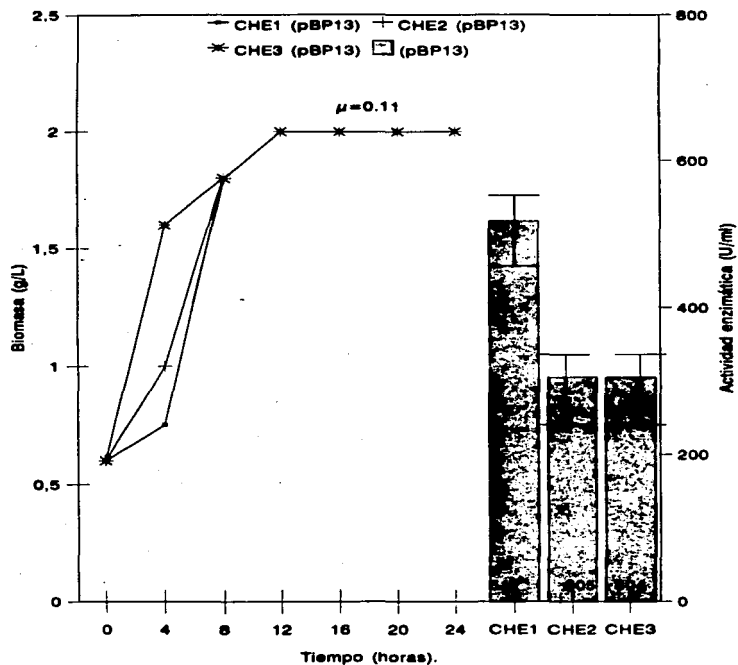


Figura 22 Cinética de crecimiento de las cepas quimiotácticas CHE1(pBP13), CHE2(pBP13), CHE3(pBP13) con producción de lipasa.

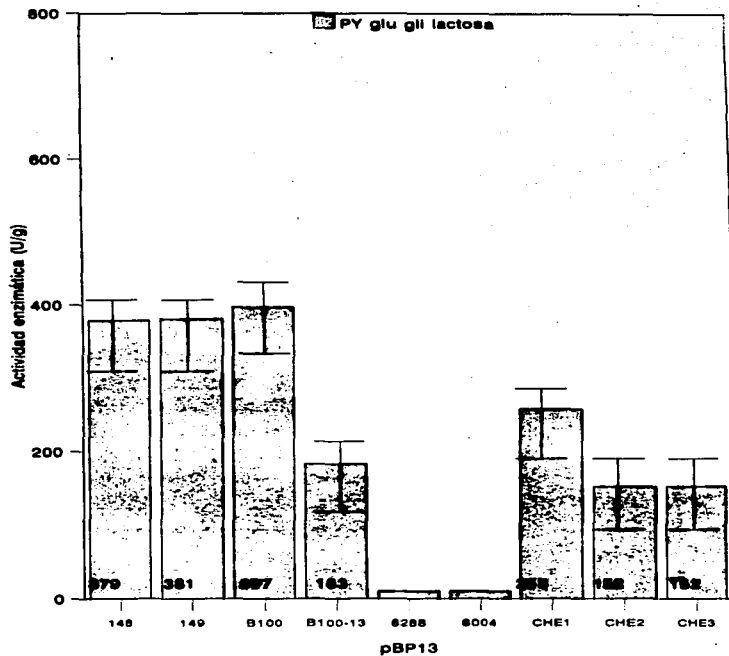


Figura 23.- Comparación de actividad lipolítica por gramo de células de diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* con el plásmido (pBP13).

VI.- CONCLUSIONES

1.- El gen de la lipasa de Pseudomonas aeruginosa IGB83, contenido en el plásmido pBP13, se expresa en la cepa de Xanthomonas campestris, formando la cepa recombinante IBT 148 (pBP13).

2.- Existe una alta estabilidad del plásmido pBP13 en la cepa de Xanthomonas campestris.

3.- En la cepa IBT 148 (pBP13), la expresión de lipasa es inducida por la adición de IPTG y lactosa.

4.- La adición de los inductores a la cepa IBT 148 (pBP13) muestra un efecto aditivo en cuanto a la actividad lipolítica.

5.- Los mecanismos de secreción de goma xantana parecen facilitar la expresión de la lipasa.

VII.- RECOMENDACIONES.

- 1.- Se debe realizar una caracterización bioquímica de la enzima lipasa producida por Xanthomonas campestris IGB 148(pBP13).
- 2.- Optimizar el medio de cultivo.
- 3.- Estudiar el escalamiento del proceso a mayores volúmenes.

NOTA: La parte experimental de este trabajo se terminó en diciembre de 1992 y con base a los resultados presentados aquí se ha seguido investigando la producción de lipasa de Pseudomonas aeruginosa IGB 83 en Xanthomonas campestris. Los resultados de esta investigación se presentan en el artículo: Xanthomonas campestris as a host for the production of a recombinant Pseudomonas aeruginosa IGB 83 lipase. Leza, Palmeros, García, Galindo y Soberón-Chávez. 1995. J. Ind. Microbiol.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

1. Adler-Nissen., New uses in microbial enzymes in food processing. Tibtech (1987): 5: 170-174.
2. Andree, H., Muller, R. W., and Schmid, D.R., Lipases as detergents components. J. Appl. Biochem. (1980): 2: 218-229.
3. Arbige, M. And Pitcher, W. H. Industrial enzymology: a look towards the future. Tibtech (1989): 7: 330-335.
4. Arnold, G. R., Shanani, M. And Dwivedi, B., Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci. (1995): 58(8): 1127-1143.
5. Aunstrup, K., Production, isolation and economics of extracellular enzymes. Appl. Biochem. Bioeng. (1979):2: 2: 27-79.
6. Bagdasarian, M. M., Amann, E., Lurz, R., Ruckert, B. and Bagdasarian, M., Activity of the hybrid trp-lac (tac) promoter of Escherichia coli in Pseudomonas putida. Construction of broad-host-range, controlled expression vector. Gene. (1983): 26: 273-282.

7. Bozolu, F., Swaisgood, E. H., and Adams, M. D. Jr., Isolation and characterization of an extracellular heat-stable lipase produced by Pseudomonas fluorescens. J. Agr. Food Chem. (1984):32:2-6.
8. Bahn, M. And Schmid, R.D. Enzymes for detergents, Biotechnol. (1987): 1: 119-130.
9. Boyer, H. B., Roulland-Dussoix D., A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in E. Coli J. Mol. Biol. (1969): 41: 459.472.
10. Cadiux, J. Kuzio J. Micazzo, H.F. and Kropinski, M. D. , Spontaneous release of lipopolysaccharide by Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. (1983): 155:2: 817-825.
11. Cárdenas, R. Curso de microbiología, Folleto para la Facultad de Ciencias/UNAM (1987).
12. Coleman, W., La biología en el siglo XIX. Editorial Fondo de Cultura Económica. México (1985): 219-220; 229-230.
13. Cheetman, P. S., Screening for novel biocatalysts. Enzyme Microbial Technol. (1987): 9: 194-213.

14. Daniels, M. J., Barber, C.E., Turner, P. C., Clearly, W. G., Sawezyc, M. C., Isolation of mutants of Xanthomonas campestris pv campestris showing altered pathogenicity. J. Gen. Microbiol. (1984): 130: 2447-2455.
15. De Groot, A., Fillous, A. And Tommansen, J., Conservation of xcp genes involved in the two step protein secretion process in diferent Pseudomonas species and other gram-negative bacteria. Mol. Gen. Genet. (1991): 229: 278-284.
16. Dounzou, P., Las biotecnologias. Fondo de Cultura Económica. México (1986): 229-230.
17. Dring, R. And Fox, P. R. Purification and characterization of a heat-stable lipase from Pseudomonas fluorescens AFT 29 Ir., J. Food. Sci. Technol. (1983): 7: 157-171.
18. Fuji, T., Tatara, T. And Minagawa, M., Studies on application of lipolytic enzyme in detergency. Amer. Oil Chem. Soc. (1983): 6: 796.
19. Fukumoto, J., Iwai, M. And Tsujisaka, Y., Studies on lipase. Purification and crystallization of a lipase secreted by Aspergillus niger. J. Gen. Appl. Microbiol. (1969): 9: 353-361.
20. Galindo, E., Aspects of the process for xanthan production. Trans. I. Chem. E. pmC (1984): 72: 227-237.

21. Galindo, E., Bolívar, F., Quintero., Maximizing the expression of recombinant proteins in E. coli by manipulation of culture conditions. J. Ferment Bioeng. (1990): 69: 3: 1-6.
22. Gilbert, J. E., Cornish, A. And Jones, W. C., Purification and properties of extracellular lipase from Pseudomonas aeruginosa EF-12. J. Gen. Microbiol. (1991): 137: 2223-2229.
23. Godfrey, T. And J. Reichelt., Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. The Nature Press, New York. (1983): 1-7.
24. Gormsen, E., Høge-Jensen, B., Christensen, T., Boel, E. And Stentebjerg-Olsen. (1988). Lipolase. A microbial lipase for detergents, developed by applications of r-DNA technique Novo Industri A/S, BSD/AIR. (Patente d-81372 USA).
25. Haeho, H., Bioquímica de las fermentaciones. Editorial Aguilar, Madrid España., 26,28,31,35-37.
26. Han., D. And Shick, R. J., Characteristic of lipase-catalyzed hidrolisis of oil in AOT-Isooctane reversed micelles. Biotechnol. Bioeng. (1986): 28: 1250-1255.
27. Harwood, J., The versatility of lipase for industrial uses. Trends Biochem (1989): 14: 125-127.

- 28.Hata, Y., Matsuura, Y., Tanaka N., Kakudo M., Lipase enzyme review. J. Biochem. Tokyo (1979): 86: 182.
- 29.Hott, B., Rath-Arnold, J., Puhler, A., Simon, R., Cloning analysis of a 35.3 kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by Xanthomonas campestris pv campestris. J. Bacteriol (1990): 5: 2284-2807.
- 30.Iwai, M. And Tsujisaka., The purification and properties of three kind of lipases from Rhizopus delemar. Agr. Biol. Chem. (1974): 38: 6: 1241-1247.
- 31.Jager, E.K. and Winkles, U. K. The effect of native and modified hyaluranate upon the formation of exolipase by Pseudomonas aeruginosa FEMS Microbiol. Lett (1983): 19(1): 54-63.
- 32.Kapralek, F., Jecmen, P., Sedlacek, J., Fabry, M., and Zadrazil, S., Fermentation conditions for high-level expression of the tac-promoter-controlled calf proquymosin DNA in E.coli HB 101. Biotechnol. Bioeng. (1991): 37: 71-79.
- 33.Knig, R.N. and Holt, G. J. (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, Williams and Williams, USA., 140-199.
- 34.Kokuscho, Y., Machida, H. And Iwasaki, S., Studies on alkaline lipase; isolation and identification of lipase producing microorganisms. Agr. Biol. Chem. (1982) 46: 5: 1159-1164.

35. Kosugi, Y. and Kamibagashi, A. J. Ferment. Technol. (1971) 49: 966-968.
36. Kugimiya, W., Otani, Y. H., Hashimoto, Y. And Takagi, Y., Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from Pseudomonas fragi. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986): 141(1): 185-190.
37. Kumer, P. K., Maschke H. E., Friehs K. And Schugerl., Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. Tibtech (1991): 9: 210-218.
38. Lazar, G. Estersynthesen mit. Liposen., Fett Seifen Anstrichm (1985). 87:(10): 394-400.
39. Lehninger, A. (1985). Bioquímica. Editorial Omega Barcelona, España: 1075.
40. López Munguía, A. (1985). Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación industrial. Prospectiva de la Biotecnología en México. Fundación Javier Barros Sierra/Concacyt México. 285-304.
41. López Munguía, A. (1987). Tecnología enzimática, UNAM, 17.
42. Lu, J. Y., Liska, J. B., Lipase from Pseudomonas fragi properties of the enzyme. Appl-Microbiol, (1969): 18: 108-113.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

43. Macrae, A. R. And Hammond R., Present an future applications of lipases. Biotechnol. Gen. Eng. Reviews (1985): 3: 193-197.
44. Martinez, S., Palacios, A. N., Sánchez, R., Caro A. and Soberón-Chávez, G., Genetic stability and xanthan gum production in Xanthomonas campestris pv. campestris NRLLB 1459. Mol. Microbiol. (1993):8:1053-1051.
45. Nahas, E., Control of lipase production by Rhizopus oligosporus under various growth conditions, J. Gen Microbiol.(1988):134: 227-233.
46. Norin, M., Boutelje J., Holmberg, E. and Hult K+, Lipase immobilized by absorption efecct of support hydrophobicity on the reaction rate of esther synthesis in cicloexane. Appl. Microbiol Biotechnol. (1988): 28: 527-530.
47. Office of Technology Assessment (OTA), Commercial Biotechnology: an International Assessment, Congress of the United States, Washington D. C. (1984). 150-155.
48. Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y., Positional specifities of four kind of microbial lipases. Agr. Biol. Chem. (1976): 40: 4: 655-660.
49. Pal, N., Das, S. And Kundu, K., Influence of culture and nutritional conditions of the production of lipase by sumerged culture of Aspergillus niger. J. Ferment. Technol. (1978): 56: 6: 593-598.

50. Palmeros, B., Gúereca, L., Alagón, A. and Soberón-Chavéz, G., Biochemical characterization of the lipolytic activity of Pseudomonas aeruginosa IGB83. Process Biochem. (1994): 29: 207-212.
51. Quintero, R. (1981) Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. Edit. Alhambra. México: 27-37.
52. Renata S., Yoko B. R. and Spartaco A. F., Subcloning and expression of the α -amilasa gene from Bacillus subtilis in Xanthomonas campestris. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1989) 31: 512-517.
53. Sano, Y. and Kageyama M., The sequence and function of the rec A gene and its protein in Pseudomonas aeruginosa PAO. Mol. Gen. Genet. (1987): 208: 412-419.
54. Seitz, W. E., Industrial applications of microbial lipases; a review J. Amer. Oil Chem. Soc. (1974): 51: 216.
55. Semeriva, M., Benzoana G. and Denuelle, P., Some properties of a lipase from Rhizopus arrhizus. Separation of a glicopeptide bound to the enzyme. Biochem. Biophys. Acta (1969): 191: 598-610.
56. Shabatai, W., and Mishne, D. N., Production, purification and properties of a lipase from a bacterium (Pseudomonas aeruginosa, Ys-7) capable of growing in water-restricted environments. Appl. Evirom. Microbiol. (1992):58: 1:174-180.

57. Sikyta, B., (1983). *Methods in Industrial Microbiology*. Ellis Horwood Limited, 13-14.
58. Soberón-Chávez, G., Palmeros, B., Pseudomonas lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. Critical Rev. Microbiol. (1984): 20 (95-105).
59. Strauch, M. M., *Historia de la Biotecnología. Ciencia y Desarrollo*, volumen 14 (1990): 19-32.
60. Stuer, W., Jaeger, E. K. and Winkler, K. V., Purification of extracellular lipase from Pseudomonas eruginosa. J. Bacteriol (1986): 168: 3: 1070-1074.
61. Sugiura, M. and Isobe, M., Studies on the lipase of Chromobacterium viscosum: Purification of a low molecular weight lipase and its enzymatic properties. Biochem. Biophys. Acta. (1974): 341: 195-200.
62. Summers, K., The kinetics of plasmid loss. Tibtech. (1991): 9: 220-227.
63. Tamayo, L. E., Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas productoras de enzima lipasa capaces de ser usados en la elaboración de detergentes. Tesis de licenciatura (1989) Biología. México. UNAM.

64. Tomisuka, N., Ota, Y. And Yamada K., Studies on lipase from Candida cylindracea. Part I: purification and properties. Agr. Biol. Chem. (1966) 30: 6: 576-584.
65. Turnor P. C., Barber C. E., Daniels MJ. Behaviour of the transposon Tn5 and Tn7 in Xanthomonas campestris pv campestris Mol. Gen. Genet. (1984): 101-107.
66. Winkhens, H. D., The detergent and cleanser market in Europe. Chimica oggi. (1987): 41-46.
67. Winkler, F. K., Arcy, A. D., Hunziker, W. ,Structure of human pancreatic lipase. Nature (1990):343:22.

Xanthomonas campestris as a host for the production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* lipase

A Leza¹, B Palmero¹, JO García¹, E Galindo² and G Soberón-Chávez¹

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca, Mor 62250, México

Abstract The plasmid pGP13, which expresses the alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83 under the lac promoter, was transferred to *Xanthomonas campestris* 87146. Different fermentation conditions were tested for lipase productivity by strain 87146 carrying plasmid pGP13, and a fermentation process was established in an instrumental bioreactor, where lipase production was increased more than 12-fold with respect to the initial culture conditions in shake flasks. Xanthan gum diminished the activity of alkaline lipase.

Keywords: lipase; recombinant *Xanthomonas*; fed-batch; bioreactor

Introduction

Lipases are esterases that hydrolyse water-insoluble esters such as long-chain triglycerides. Lipases also catalyse the formation of esters (esterification) and the exchange of ester bonds (transesterification), when present in non-aqueous media [2,14]. Lipases display a high degree of specificity and enantioselectivity for esterification and transesterification reactions, thus their potential uses in industry are very wide [2,15]. These potential industrial applications have been an important driving-force for lipase research, and in particular for the study of bacterial lipases [15]. *Pseudomonas* lipases display special biochemical characteristics not common among the lipases produced by other microorganisms, such as thermo-resistance and activity at alkaline pHs. Recently, several *Pseudomonas* genes encoding lipases have been cloned and sequenced, and the regulation of their expression is beginning to be understood [13,15,31].

We have characterized the lipase produced by *Pseudomonas aeruginosa* IGB83 [22]. This strain was isolated after screening natural populations for lipolytic bacteria native to the Mexican tropical rain forest. The apparent molecular weight of this enzyme (58 kDa), is similar to that of *P. fluorescens* lipases, but substantially different from those of other *P. aeruginosa* strains. The optimum condition for the strain IGB83 lipase activity are 55°C and pH 10; it has a half life at 55°C and pH 8.5 of 13 min, and has an isoelectric point of 8. The lipase from strain IGB83 is completely inactivated by freezing. This behavior suggests that hydrophobic interactions are important for the structure of the enzyme. Inactivation upon freezing has not been reported for other lipases.

Lipases produced by Gram-negative bacteria, including pseudomonads, are secreted to the culture medium as an aggregate with lipopolysaccharide [31]. Secretion of the *P.*

aeruginosa lipase has been reported to depend on the 'acp pathway', which is a general route for the translocation of extracellular proteins from the periplasmic space through the outer membrane of Gram-negative bacteria [24,34]. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* has been reported to present the acp pathway, and the genes coding for the proteins which participate in this route are homologous to the *P. aeruginosa* genes [6,8]. The similarity between *P. aeruginosa* and *X. campestris* is not restricted to their mechanism for protein secretion since they are closely related organisms, and their phylogenetic distance is similar to the distance between different *Pseudomonas* species belonging to RNA group I [20]. The phylogenetic relationship between *P. aeruginosa* and *X. campestris* was the rationale behind the use of *X. campestris* pv *campestris* as a host to express the alkaline lipase from *P. aeruginosa* IGB83 that we report here. The IGB83 lipase cannot be expressed in the native bacteria for its production at an industrial scale since *P. aeruginosa* is an opportunistic human pathogen, and strain IGB83 in particular, has a very high virulence (unpublished results).

X. campestris pv *campestris* produces the exopolysaccharide xanthan gum. This biopolymer has several commercial applications due to its high viscosity and pseudoplastic behavior under a wide range of pHs, temperatures and salt concentrations [11]. Polysaccharides increase protein stability [29]. Xanthan gum is a very good viscosifying and emulsifying agent [11], and the activity of *P. aeruginosa* lipase increases in the presence of polysaccharides [10,31]. We evaluate here the effect of xanthan gum on the stability of the alkaline lipase from *P. aeruginosa* IGB83.

We used an expression plasmid containing the *lac* promoter since it is active in a broad spectrum of Gram-negative bacteria [1], and has been used specifically for the expression of *P. aeruginosa* genes [2]. Another advantage of the *lac* expression system is its simple induction and the high ratio between repression and de-repression.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids are shown in Table 1. *X. campestris* strain 87146 was routinely grown on NYG8

Correspondence: G Soberón-Chávez, Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca, Mor 62250, México.
Received 4 April 1993; accepted 1 September 1993.

Table 6. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Bacteria:		
HB101	<i>ltn</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>cpk1</i>	[31]
<i>P. aeruginosa</i>	<i>argH32</i> , <i>str-JR</i> , <i>rec-2</i>	[28]
PAC2003	wild type strain, highly lipolytic	[28]
<i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	Rif ^r derivative of strain NRRL B1459	[18]
Plasmids:		
pMMB22	RSP1010 derivative containing the <i>lac</i> promoter, <i>Ap</i> ^r , <i>Sir</i> ^r	[11]
pB311	RPM derivative, <i>Tet</i> ^r , <i>Ap</i> ^r , <i>Tc</i> ^r	[4]
pB1	pM34B22 derivative containing the <i>P. aeruginosa</i> IG8A3 lip	This work
pB13	<i>gms</i> , <i>Lip</i> ^r , <i>Ap</i> ^r	This work
pB13	<i>gms</i> ? isoenzyme with pB311, <i>Lip</i> ^r , <i>Tet</i> ^r , <i>Ap</i> ^r , <i>Tc</i> ^r	This work

medium [5], lacking glycerol. The two culture media used in the fermentations are: AL1 medium which contains (g L⁻¹): NH₄Cl 4.12, (NH₄)₂PO₄ 0.6978, KH₂PO₄ 3.06, citric acid 1.3, MgSO₄ · 5H₂O 0.23, FeCl₃ · 6H₂O 0.0014, ZnO 0.0072, CaCO₃ 0.0024, boric acid 0.0028, and sucrose 20, pH 7.5; and medium AL2 which contains (g L⁻¹): NH₄Cl 4.12, KH₂PO₄ 5.0, citric acid 2.3, Na₂SO₄ 0.114, MgCl₂ · 6H₂O 0.163, CaCl₂ 0.012, boric acid 0.006, Na₂CO₃ 0.5, FeCl₃ · 6H₂O 0.0014, ZnO 0.007, sucrose 20 and pH 7.5. AL1 and AL2 media were derived from media described previously for xanthan gum production [9,23], but have decreased C/N ratio (by increasing N) to minimize xanthan gum production. *P. aeruginosa* and *E. coli* strains were cultured on LB medium [19]. *X. campestris* IBT148 and *E. coli* HB101 were grown on M9 minimal medium [21]; in the case of *E. coli* HB101 leucine and proline were added. *P. aeruginosa* strains were grown on FAM minimal medium [22], using 1% olive oil as carbon source. Xanthan gum production was determined by its dry weight and culture viscosity was determined as described previously [25]. Biomass concentration was monitored by optical density at 600 nm, and was converted to cell dry weight using a calibration curve done with *X. campestris* pv *campestris* IBT148(pB13). Sucrose was determined as described previously [9].

The antibiotic concentrations used (µg ml⁻¹) were: carbenicillin 800, rifampicin 50, streptomycin 200 and tetracycline 30. Carbenicillin was used instead of ampicillin to select for the presence of plasmid pMMB22 and derivatives, since different *Pseudomonas* strains have high basal levels of resistance to the latter antibiotic. 1-[4-propyl-5-(2-D-1-thiophalactopyranoside) (IPTG) was used at a concentration of 2 mM as reported previously to be optimum for *Pseudomonas putida* [1], unless otherwise stated.

Matings were done by plating a 1:1 mixture of the donor and recipient strains on agar plates of NYCB medium without glycerol, and increasing the mixture overnight at 30°C, the mixture was serially diluted and plated onto selective medium.

Fermentation conditions

Batch fermentations were carried out in a 2-L tank bioreactor with a working volume of 1 L. This tank was fitted with two Rushton turbines. Temperature was kept at 29°C, pH was controlled between 7.3 and 7.7, and dissolved oxygen tension (DOT) was maintained at 10% with respect to air saturation. The fermentations were conducted at 200 or 500 rpm (depending on the oxygen demand). DOT was kept constant by an automatic control operated via a Macintosh computer which manipulated the oxygen partial pressure, using pure oxygen and pure nitrogen. Fed-batch fermentations were carried out under the same conditions as the batch cultures, and 20 ml of a 10x salt stock solution of medium AL1, lacking citric acid and CaCO₃, was intermittently supplemented after 12 h of incubation.

All fermentations were inoculated with 100 ml of a culture of *X. campestris* IBT148(pB13) grown overnight on NYCB medium without glycerol, and supplemented with rifampicin and carbenicillin. The fermentations presented here were done twice and the results were reproducible with a variability of ±5%.

Lipase assay

Lipase was quantified by titrating the butyric acid released from tributyrin at pH 8.5 and 55°C with 50 mM NaOH. Lipase activity was calculated from the rate of alkali consumption, corrected for the rate given by a boiled sample and expressed as lipase units (U; 1 unit is defined as the release of 1 µmol of titratable fatty acid min⁻¹). This method has a variability of approximately ±20 U.

A qualitative method to measure lipolytic activity on plates was developed which consisted of a 33-mM tributyrin emulsion in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.5 supplemented with the pH indicator *m*-cresol purple and solidified with 1.5% agarose. When these plates were incubated at 37°C, lipolytic activity was visualized by halo formation and from the change of color of the medium from purple to yellow.

Nucleic acid procedures

DNA isolation and cloning procedures were carried out as described by Sambrook *et al.* [27]. Plasmid visualization was done as described by Rosenberg *et al.* [26].

Isolation of clones coding for the alkaline lipase

A genomic library of *P. aeruginosa* IGBR3 was made in plasmid pM18B2 [11] digested with *EcoRI* endonuclease. *P. aeruginosa* IGBR3 total cellular DNA was partially digested with *EcoRI** and ligated. This ligation mixture was transformed into *E. coli* HB101 and cells containing the genomic library were grown on plates of M9 medium with 2% (vol/vol) of glycerol as carbon source, proline and leucine, and supplemented with 33 mM tributyrin and 1 mM IPTG. Clones which formed a halo after 2 weeks at room temperature were considered as putative lipase clones. One of these, containing plasmid pBP1, was used in this study.

Plasmid pBP1 was transferred to *P. aeruginosa* PAO2003 using plasmid pB331 for its mobilization, a conjugate was formed between these two plasmids which is called plasmid pBP13 and which was further characterized in this work.

Results**Construction of plasmid pBP13 and transfer to *X. campestris* IBT148**

Plasmid pBP13 is a conjugate between the broad host range plasmid pB331 and the recombinant plasmid pBP1 which expresses the alkaline lipase under the *lac* promoter of the vector pM18B2 (Figure 1). In the *P. aeruginosa* and *X. campestris* genetic backgrounds pBP13 plasmid was maintained without dissociating into its components, since in gel electrophoresis the band with the expected size of plasmid pBP1 is not apparent (Figure 1). *P. aeruginosa* strain PAO2003(pBP13) has a lipase activity of 1100±200 U ml⁻¹ when induced with IPTG, but has no activity if not induced (Table 2). Strain PAO2003 did not present lipolytic activity, under our experimental conditions (Table 2).

Plasmid pBP13 was transferred by conjugation to *X. campestris* either from *E. coli* HB101 or from *P. aeruginosa* PAO2003. Carbenticillin-resistant clones were selected and those which present lipolytic activity in the presence of IPTG were selected. As shown in Table 2, strain IBT148(pBP13) exhibited a lipase activity as high as that of *P. aeruginosa* PAO2003(pBP13) under the same culture conditions.

Stability of plasmid pBP13 and conditions for inoculum production

In order to determine the stability of plasmid pBP13 in *P. aeruginosa* PAO2003, this strain was grown for approximately 25 generations on LB medium without selective pressure for the plasmid. All the colonies retained the plasmid carbenticillin resistance after the subculturing. When lipolytic activity was measured through halo formation of the colonies on FAM plus olive oil, only 2% of the bacteria lost lipase activity.

In *X. campestris* IBT148(pBP13) a similar stability was found and 100% of the colonies tested retained carbenticillin

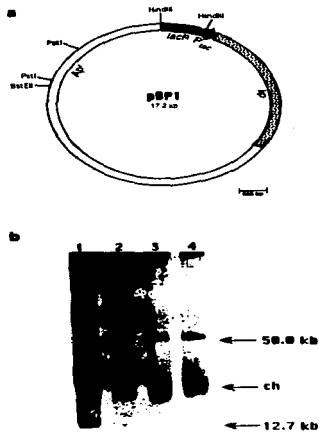


Figure 1 (a) Schematic representation of plasmid pBP1. (b) Plasmid electrophoretic profiles correspond to 11.2 kb HB101(pM18B22) (L), *E. coli* HB101(pBP13), *P. aeruginosa* PAO2003(pBP13), and *X. campestris* IBT148(pBP13). The size in kilobases (kb) of plasmids pM18B2 and pBP13 and the origin of the chromosome (ch) are shown.

resistance even after seven subcultures (approximately 50 generations) without selective pressure. However, in contrast with the results obtained with PAO2003(pBP13), the stability of lipase production was very low (Figure 2). The lipolytic activity of four IBT148(pBP13) independent transconjugants (two obtained from the cross with HB101(pBP13) and two using strain PAO2003(pBP13) as donor in mating) was completely lost after approximately 50 generations on SYGH medium supplemented with 0.2% glucose and 2 mM IPTG. Even after six subcultures (approximately 40 generations), none of the 40 colonies tested derived from one of the clones mentioned above presented a halo of lipolytic activity.

Table 2 Intracellular lipolytic activity of different strains grown on minimal medium*

Strain	IPTG	Carbon source	Lipase activity (U ml ⁻¹)
<i>P. aeruginosa</i>			
ICB83	—	glucose	2890 ± 200
ICB83	—	glucose	ND
PAG2003	—	glucose	308 ± 150
PAG2003	—	glucose	ND
PAG2003/pBP13	—	glucose	1100 ± 150
PAG2003/pBP13	—	glucose	ND
<i>X. campestris</i>			
IBT148	—	glucose	ND
IBT148/pBP13	—	glucose	ND
IBT148/pBP13	+	glucose	1500 ± 210

*Lipolytic activity was measured in the cell-free supernatant after 24 h of growth in the case of *P. aeruginosa* strains, and in the case of *X. campestris* strains activity was measured after 48 h of growth. ND = not detectable.

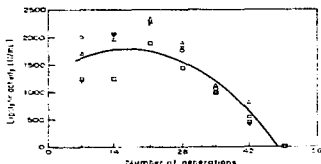


Figure 2 Instability of lipase production by *X. campestris* IBT148/pBP13. Different symbols represent the lipolytic activity exhibited by different sublines of the strain during subcultures.

In order to circumvent the instability of lipase production by strain IBT148/pBP13, the inoculum for all the fermentations presented in this work was done with recently isolated trans-conjugants which had lipolytic activity, and in no case were bacteria used that had been subcultured more than three times (approximately 20 generations).

Influence of medium composition on lipase production

Lipase productivity of strain IBT148/pBP13 was higher on AL1 medium than on AL2 medium (data not shown). The effect of other variables was analysed using AL1 medium, since it gave the best results. When IPTG concentration was increased to 5 mM, a decrease in both growth rate and final biomass concentration of the strain IBT148/pBP13 was found (data not shown), but similar lipase production was attained (fermentations 1 and 2, Table 3).

Lipase production on fed-batch cultures

In order to increase the biomass concentration of the fermentations, 20 ml of a 10x salt stock solution of medium, lacking citric acid and CaCO₃ was added every 2 h after

12 h of culture. This scheme of salt addition was established since neither sucrose availability, which was high at the end of these fermentations, nor dissolved oxygen, which was maintained at 10%, were limiting for the growth of strain IBT148/pBP13 (data not shown). This fed-batch fermentation resulted in a marked increase in biomass concentration and sucrose consumption (Figure 3). Under this fermentation condition, IPTG was added after 26 h of culture and lipase production was followed for 12 additional hours. We found a much higher lipase production with this scheme of induction under fed-batch conditions since we obtained 13 200 U ml⁻¹ fermentation 3), compared with the 3400 U ml⁻¹ obtained on fermentations 1 and 2 (Table 3).

In order to increase lipase productivity, by increasing biomass yield and time of lipase production, a fed-batch fermentation similar to that described above was done, but at 60 h of growth sucrose was supplemented, and at 46 h of cultivation, 2 mM IPTG was added. This fermentation resulted in a very high lipase activity and productivity, reaching 19 800 U ml⁻¹ of culture (Figure 3 and Table 3).

Influence of xanthan gum concentration on lipase thermostability

We determined the lipolytic activity remaining after 20 min at 55°C of a *P. aeruginosa* ICB83 supernatant medium in the presence of different xanthan gum concentrations (Figure 4). Xanthan gum stabilized lipase activity. A similar experiment was carried out with the alkaline lipase produced by strain IBT148/pBP13, where the time of total inactivation at 55°C of the lipase was measured as a function of the xanthan gum concentration. The increased lipase stability in the presence of xanthan gum concentrations was also apparent (Table 4).

Discussion

We report the construction of a recombinant plasmid which expresses the alkaline lipase from *P. aeruginosa* ICB83 under the control of the *lac* promoter. The recombinant lipase is efficiently produced and secreted by *X. campestris*. Plasmid pBP13 was stably replicated both in *P. aeruginosa* PAG2003 and in *X. campestris* IBT148, but the lipolytic activity which it encodes is very unstable in the *X.*

Table 3. Comparison of lipase production under different culture conditions.

Fermentation number	Type of culture	Growth phase* induction (IPTG)	Lipase activity*	
			(U ml ⁻¹)	(U/g cells ⁻¹) × 10 ⁶
1	batch	start (2 mM)	3400	4.5
2	batch	start (5 mM)	3700	8.4
3	fed-batch	log (2 mM)	13200	10.0
4	fed-batch	late log (2 mM)	19800	12.0

*The growth phase was determined from the growth curve and corresponds to a different time, depending on the specific growth rate during each fermentation.

†The maximum lipase activity attained in each fermentation is reported.

‡Dried cell weight.

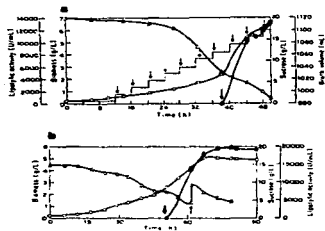


Figure 3. Lipase production on a fed-batch culture on medium AL1. (a) Fermentation number 3. Arrows indicate the addition of 20 ml salt stock to the culture. The addition of 2 mM IPTG is indicated (bold arrow). (b) Fermentation number 4. Conditions are the same as in (a) but IPTG was added at 40 h (bold arrow), and at 60 h 50 ml of a IPTG solution of 5000 mg/ml was added (arrow). Symbols correspond to biomass (□), sucrose (△), and lipase activity (▲).

compestri IBT148 genetic background, and stable in *P. aeruginosa* PAO2003. The difference in stability might be due to the fact that strain PAO2003 is a *recA* mutant [28], while strain IBT148 is proficient in homologous genetic recombination [18]. We have recently isolated a *recA* mutant derived from *X. campestris* IBT148 [17], and we are currently evaluating the stability of the lipolytic activity encoded by plasmid pBP13 in it.

Under the conditions studied, the recombinant lipase was more efficiently expressed by strain IBT148(pBP13) as the *lac* promoter was induced at the late log phase of growth, this result is in accordance with the production of heterologous proteins by other recombinant bacteria such as *E. coli* [26,37]. The IPTG concentration used in this work was established on the basis of the results reported by Bagdasarian *et al.* [1]. For the expression in *Pseudomonas putida* of genes cloned in plasmid pMMH22, they routinely used

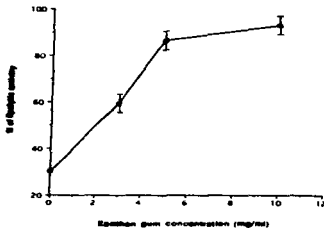


Figure 4. Effect of xanthan gum concentration on the stability of the alkaline lipase produced by *P. aeruginosa* IBT148. The percentage of lipase activity remaining after 20 min of incubation at 55 °C is shown. IPTG = 21.20 ± 150 U ml⁻¹ (lipase activity prior to incubation).

Table 4. Effect of xanthan gum concentration on the stability of the recombinant alkaline lipase produced by strain IBT148(pBP13).

Xanthan gum (g L ⁻¹)	Time of lipase inactivation at 55 °C (min)
0	2
1	10.0
5	16.2
10	16.3

*The time of inactivation was considered as the last time when NaOH was added and pH remained unaltered for 2 additional minutes.

a concentration of 5 mM IPTG, but their reported level of gene expression was the same with a concentration of 2 mM IPTG. In *P. aeruginosa* PAO2003 and *X. campestris* IBT148 we found a good level of lipase expression with IPTG at a concentration of 1 mM and 2 mM, respectively. At 5 mM, IPTG decreased the growth rate of *X. campestris*.

The effect on lipase expression of lower IPTG concentrations was not determined.

Lipase activity reached a maximum when strain IBT148(pBP13) was grown on medium AL2 and then it declined (data not shown). This decline in lipase activity suggests that the enzyme is inactivated after its secretion. The presence of proteases in *X. campestris* has been reported [7], and the different stability of the lipase on medium AL1 and AL2 might be due to differences in protease expression on these culture media. An important advantage of AL1 medium is that it is suitable for the production of lipase and other enzymes, since chemically defined, it does not show any problems in downstream operations.

Xanthan gum stabilizes the *P. aeruginosa* IGB83 alkaline lipase. This stabilizing effect was apparent whether the lipase was produced by strain IGB83 or, as a heterologous protein, by *X. campestris*. In this respect *X. campestris* presents advantages to be used as host for the expression of heterologous proteins: it is able to secrete at least some proteins which are related to Gram-negative bacteria and can produce xanthan gum which acts as a protein-stabilizing agent. Our results indicate that *X. campestris* has potential as a host for the production of recombinant extracellular proteins [32].

The stability of the alkaline lipase under the assay conditions was much higher when produced by *P. aeruginosa* IGB83 than when expressed by *X. campestris* IBT148(pBP13) (Figure 4 and Table 4). We have previously reported that the lipase half life at 55°C when produced by strain IGB83 is 13 min [22], and we report here that when produced by *X. campestris*, after less than 8 min at the same temperature, lipase was completely inactivated (Table 4). *Pseudomonas* lipases have been reported to form very tight aggregates with lipopolysaccharides, and it has also been reported that the enzyme is much more labile when this polymer is removed [18,31]. The different stability of the alkaline lipase when produced by these two different bacteria might be related to different interaction of the enzyme with the diverse lipopolysaccharides which they produced. Another possibility is that the different stability is a reflection of differences in the processing of the enzyme during the secretion process.

The manipulation of the culture conditions of recombinant bacteria can have a very important effect on the yields of recombinant proteins [10,12,37]. In the case of the lipases from *Pseudomonas*, the optimization of the fermentation conditions has been reported only for lipase production by the native *Pseudomonas* strain [16,33]. This is the first report on the manipulation of culture conditions for increased production of a recombinant *Pseudomonas* lipase: a high increase of lipase productivity was achieved by manipulation of the fermentation conditions of the recombinant strain IBT148(pBP13).

Acknowledgements

This research was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) through grant no 1617-89280.

References

1. Bagdasarian MM, E. Amann, R. Lutz, B. Beckert and M. Bagdasarian. 1983. Activity of the hybrid *trp* locus: *in vivo* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of hybrid *trp* genes: a sensitive expression vector. *Gene* 26: 273-282.
2. Boyer F, S. G. Orlowski and G. Kirk. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol* 9: 360-363.
3. Boyer HB and D. Ruzland-Davies. 1989. Complementation analysis of the resection and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 4: 455-472.
4. Brown NJ, Bennett and AWB Johnston. 1989. Plasmid mediated insertion of host range specificity between two strains of *Mitobacterium fumigatum*. *J Gen Microbiol* 130: 413-420.
5. Daniels MJ, CE Barber, PC Turner, WG Cleary and MK Sawczuk. 1984. Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* ssp. *campestris* showing altered pathogenicity. *J Gen Microbiol* 130: 2447-2450.
6. de Groot A, A. Fillos and J. Tomasz. 1991. Conservation of *trp* genes involved in the inactivator protein secretion process in different *Pseudomonas* species and in other gram-negative bacteria. *Mol Gen Genet* 229: 278-284.
7. Dow JM, BR Clarke, TH Milligan, JL Tang and MJ Daniels. 1989. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* ssp. *campestris*, the brick red pathogen. *Appl Environ Microbiol* 56: 2944-2949.
8. Dunn F, JM Dow and MJ Daniels. 1991. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relationship to secretion systems of other gram-negative bacteria. *Mol Gen Genet* 230: 157-164.
9. Flores JJ, LC Torres and F Galindo. 1989. Effect of dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on lipase production and stability of xanthan gum. *J Biotechnol* 14: 165-171.
10. Frisch K and M. Reardon. 1993. Estimator: influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivation. *Sis Biotechnol Eng* 8: 61-78.
11. Galindo K. 1988. Aspects of the process for xanthan production. *Trends J Chem Ecol* 7: 227-237.
12. Galindo L, F. Bolívar and R. Quintero. 1989. Maximizing the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*: optimization of culture conditions. *J Biotechnol Bioeng* 30: 1-6.
13. Hailstone J. 1983. Physicochemical, rheological properties and molecular cloning. *Enzyme Microb Technol* 15: 63-68.
14. Harwood J. 1989. The seriatim of industrial lipases. *Trends Biochem Sci* 14: 25-27.
15. Jager K-E, S. Ramba, JM Dinkler, C. Colson, M van Hevel and F. Mayer. 1984. Bacterial lipases. *Biochim Biophys Res Commun* 119: 29-33.
16. Maron C, L. Katz, R. Greenbaum and M. Chertan. 1993. Optimization of lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* NRRL 3449 on *h*24x cultivation. *J Mol Microbiol* 12: 29-34.
17. Martínez S, JM Martínez-Salazar and A. Sotero-Chavez. 1995. Isolation of *Xanthomonas campestris* ssp. *campestris* NRRL 3449 *h*24x mutants and evaluation of the effect of culture conditions on the growth which affecting chemotaxis and xanthan gum production. *Microbiol Biotechnol* (submitted).
18. Martínez-Salazar JA, AN Palacios, R. Sánchez, M. Castro and G. Sotero-Chavez. 1993. Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* ssp. *campestris* NRRL 3449. *Mol Microbiol* 8: 105-109.
19. Miller JE. 1992. A short course on bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
20. Olson GJ, CW Wilson and R. Detric. 1989. The role of the cell wall in recombinant change. *Healthcare new info on microbiology*. *J Biotechnol* 17: 1-6.
21. Oscheit LA, A. Fischer and J. Renner. 1984. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *h*24x gene encoding a thermolabile protease involved in ethylenediamine hydrochloride synthesis. *J Biol Chem* 259: 19783-19787.
22. Palacios A, E. Guerrero, A. Alagón and G. Sotero-Chavez. 1994. Biochemical characterization of the lipase activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. *Process Biochem* 29: 207-212.
23. Peters H, H. Herber, PCM Haselink, A. Schmitt and WD Deckwer. 1989. The influence of agitation rate on the oxygen gain produced by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Bioeng* 34: 431-435.
24. Pugliese AP. 1986. Genetic control of secretory pathways in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 50: 41-109.

- 25 Ramirez ME, L Burkowski, P Garcia-Ramirez, B Quintero and E Galindo. 1988. Kanthax gene production by altered plasmidcopy variants of *Xanthomonas campestris*. Appl Microbiol Biotechnol 29: 3a-10
- 26 Rosenberg C, H Cesar-DelPort, J Durkin, M Elmal and C Boucher. 1982. Magnaporin in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Parachanna oryzae*. resour. J Biotechnol 130: 402-406.
- 27 Sambrook J, EF Fritsch and T Maniatis. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 28 Sano Y and M Kageyama. 1987. The sequence and function of the *oraA* gene and its protein in *Parachanna oryzae*. FAO Mol Gen Chem 208: 412-419.
- 29 Schen CH. 1990. Solubility as a function of protein structure and solvent composition. BioTechnology 8: 308-313.
- 30 Schube G, E Rohne and UK Winkler. 1983. Glycogen and various other polysaccharides stimulate the formation of zymospores by *Parachanna oryzae*. Can J Microbiol 28: 636-642.
- 31 Sobrón-Chávez G and B Palmero. 1994. *Parachanna lipase*: molecular genetics and potential industrial applications. Crit Rev Microbiol 20: 93-105.
- 32 Sobrón-Chávez G. 1995. Process to obtain extracellular recombinant products using *Parachanna campestris* P. campestris at IITA Universidad Nacional Autónoma de México. I & S Pointe No. 5447000.
- 33 Suzuki T, Y Moshaga, T Yamane and S Shimizu. 1988. Mass production of lipase by fed-batch culture of *Parachanna oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol 27: 417-423.
- 34 Tommasen J, A Follon, M Bally, M Margier and A Ludzinski. 1992. Protein secretion in *Parachanna oryzae*. FEMS Microbiol Rev 101: 71-80.
- 35 Wajsbom J, S Vozl and UK Winkler. 1987. Inoculation of extracellular *Parachanna lipase* with algae and its potential use in biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 27: 139-142.
- 36 Yee L and HW Blanch. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *E. coli*. BioTechnology 10: 1550-1556.
- 37 Zabriskie DW and J Arcus. 1988. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. Enzyme Microb Technol 8: 709-717.