

03072



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA LIPASA
DE *Penicillium candidum***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial del Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

Agradecimientos

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

**Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Dra. Amelia Ferrés González-Saravia
Dr. Jesús Aguirre Linares**

por sus valiosos comentarios y aportaciones durante la realización de este proyecto.

Gracias al jurado formado por:

**Dra. Amelia Ferrés González-Saravia
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Dra. Ms. Del Carmen Wachter Rodarte
Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Dr. Guillermo Aguilar Osorio**

por sus consejos y apoyo profesional en el contenido de este trabajo.

**Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para realizar
mis estudios de maestría, así como al proyecto 400313 1500N
por el uso de reactivos y equipo.**

**Agradezco la ayuda de José Luis Roque Reséndiz
en la elaboración de los geles SDS-PAGE y de
isoelectroenfoque.**

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	1
Resumen	2
1. Introducción	3
2. Generalidades sobre las lipasas	5
2.1 Definición y características generales	5
2.2 Reacciones que catalizan las lipasas	9
2.3 Fuentes y usos de las lipasas	12
2.4 Clonación de genes de lipasa	13
3. Antecedentes	15
4. Objetivos	20
5. Material y métodos	21
5.1 Microorganismo empleado y su conservación	21
5.2 Medios de cultivo y preparación del inóculo de <i>Penicillium candidum</i>	21
5.3 Determinación del crecimiento de <i>P. candidum</i>	22
5.4 Precipitación de la enzima	23
5.5 Determinación de actividad enzimática	23
5.6 Electroforesis de proteínas y determinación de actividad <i>in situ</i>	25
5.7 Determinación de pH y temperatura óptimos del ensayo	26
5.8 Determinación de estabilidad frente al pH y la temperatura	27
5.9 Efecto de iones metálicos y SDS sobre la actividad de lipasa	27
5.10 Determinación de especificidad por sustrato	28
5.11 Determinación del punto isoelectrico de la lipasa	28
5.12 Determinación de presencia de carbohidratos en la lipasa	29
5.13 Determinación de actividad proteolítica	30
6. Resultados y discusión	31
6.1 Cinética de crecimiento y producción de lipasa de <i>P. candidum</i>	31
6.2 Purificación parcial de la enzima	31
6.3 Determinación del peso molecular de la lipasa	35
6.4 Características bioquímicas de la lipasa	40
6.4.1 Efecto de la temperatura	40
6.4.2 Efecto del pH	45

6.4.3 Efecto de iones metálicos y SDS sobre la actividad de la lipasa	48
6.4.4 Punto isoeléctrico de la lipasa	51
6.4.5 Glicosilación de la enzima	52
6.4.6 Especificidad por el sustrato	55
6.5 Discusión final	57
7. Conclusiones	62
8. Bibliografía	63
9. Anexo	71

Abreviaturas

DEPC	dietilpírocarbonato
D.O.	densidad óptica
DPF	fosforfluoridato de diisopropilo
Ea	energía de activación
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
His	histidina
kDa	kilodaltones
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico
PDA	papa-dextrosa-agar
pH _{op}	pH óptimo
p-NFL	p-nitrofenil laurato
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS	lauril sulfato de sodio
Ser	serina
TCA	ácido tricloroacético
Top	temperatura óptima

RESUMEN

Las lipasas son un grupo de enzimas capaces de hidrolizar enlaces éster en la interfase agua-aceite. La importancia de estas enzimas se ha incrementado considerablemente en los últimos años a causa de las nuevas aplicaciones industriales de éstas en sistemas no acuosos (fluidos supercríticos y solventes orgánicos). En nuestro laboratorio se ha venido trabajando con la lipasa de *Penicillium candidum*, hongo que fue seleccionado de entre 15 cepas distintas, debido a su alta producción de lipasa y comparativamente baja actividad de proteasas, así como por generar lipolizados con características organolépticas que fueron preferidas por paneles sensoriales mexicanos. En el presente trabajo se planteó realizar una caracterización bioquímica de la lipasa de *P.candidum*, con el fin de establecer no sólo la metodología de purificación de la misma, sino también las condiciones de reacción óptimas de la lipasa. En este sentido se determinó que el valor de pH óptimo fue de 8 y que la temperatura óptima del ensayo de actividad de la enzima fue de 34-37°C. Se observó que la enzima fue estable en un rango de pH 5-8 durante 24 h a 37°C aunque baja su actividad en un 30%. El único ión que estimuló la actividad de la lipasa fue el Ca^{2+} mientras que Cu^{2+} y Fe^{2+} la inhibieron fuertemente. Cuando se determinó la especificidad por sustrato se vio que la lipasa de *P.candidum* prefería sustratos de cadena corta, presentando su máxima actividad con tributirina. Así también, esta enzima prefirió a los triacilglicerolos sobre los mono y diacilglicerolos. Por último, se observó que la lipasa posee un peso molecular de 29 kDa y que se encontraba glicosilada. Se determinaron 2 puntos isoelectrónicos, 5.35 y 5.5 mediante isoelectroenfoque.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que catalizan casi todas las reacciones químicas que ocurren en la naturaleza, ya que intervienen en todas las reacciones de síntesis y degradación que se llevan a cabo en los organismos vivos (31). Son además catalizadores muy eficientes, frecuentemente superiores a los catalizadores químicos (30). Las ventajas del uso de enzimas se basan en su especificidad por sustrato y su capacidad para catalizar reacciones bajo condiciones suaves de operación, propiedades que no se encuentran frecuentemente en la catálisis convencional (15).

Aproximadamente el 80% de las enzimas producidas por fermentación y vendidas a escala industrial son hidrolíticas y casi todas ellas son extracelulares. Los avances en técnicas de DNA recombinante, ingeniería enzimática, tecnología de las fermentaciones y procesos de recuperación continúan bajando el costo de las enzimas y mejorando las propiedades de las mismas. El uso de enzimas para la síntesis o la biotransformación de componentes como péptidos y creación de nuevas grasas y aceites es promovido por el uso eficiente de las enzimas en sistemas de solventes orgánicos (4, 25).

De la amplia variedad de enzimas, las lipasas han recibido una creciente atención en los últimos años, ya que además de ser usadas en la maduración de quesos y como agentes activos de detergentes, se ha encontrado que son capaces de catalizar una amplia variedad de reacciones de importancia potencial para diversas aplicaciones industriales como son la síntesis de saborizantes, producción de biosurfactantes, transesterificación y la resolución de mezclas racémicas (27, 59, 67).

Cada aplicación requiere de propiedades específicas de las lipasas con respecto a su especificidad por sustrato, estabilidad y dependencia a temperatura y

a pH, así como capacidad para catalizar reacciones de síntesis de ésteres en solventes orgánicos y en fluidos supercríticos (78).

De lo anterior se desprende la importancia de la caracterización bioquímica de las diferentes lipasas, con el fin de conocer el tipo de aplicaciones en las que pueden ser usadas potencialmente. Por ello, se consideró importante realizar la caracterización bioquímica de la lipasa de *P.candidum*, no sólo para establecer otros posibles usos de la enzima además de alimentos, sino también para determinar parámetros importantes para su posible aplicación industrial

2. GENERALIDADES SOBRE LAS LIPASAS

2.1 Definición y características generales.

Las lipasas son glicerol éster hidrolasas (EC 3.1.1.3.) que hidrolizan ésteres de tipo éster de tri, di y monoacilgliceroles, cuando se encuentran en la interfase agua-solito. La diferencia entre las lipasas y las carboxilesterasas ordinarias (esterasas y acilhidrolasas) no se basa en el tamaño del radical del ácido graso del sustrato, sino en el estado físico de este último: las lipasas son incapaces de atacar moléculas de sustrato completamente dispersas en agua (37, 53).

La mayoría de las lipasas que se conocen son proteínas glicosiladas con pesos moleculares que varían entre 20 a 60 kDa (27, 34) y contienen de un 2 a un 15% de carbohidratos de los cuales el principal es la manosa. Kilara propone que estos residuos de azúcar facilitan el paso de la enzima a través de la pared celular microbiana hacia el medio de cultivo (52). Se tiene reportado que las lipasas pregástricas de varios orígenes están altamente glicosiladas, ya que llegan a tener un 10-15% de carbohidratos con respecto a la masa total de la proteína (19, 33).

Las lipasas son inhibidas frecuentemente por agentes surfactantes como el Tween y las sales biliares, además, algunas son sensibles a la presencia de cationes divalentes como el calcio. Se ha encontrado que las lipasas de *Pseudomonas* y *Chromobacterium* son sensibles a la presencia de calcio. En el caso de la enzima de *Chromobacterium* se observó un comportamiento anómalo en el enfoque isoelectrónico y se supuso que esta conducta se debía a que el calcio permite la estabilización de agregados de la enzima (82, 85). Hay que señalar que no todas las lipasas son metaloenzimas, como ejemplo están la lipasa de *Aspergillus oryzae* (86) o la de *Fusarium* sp. YM-30 (64).

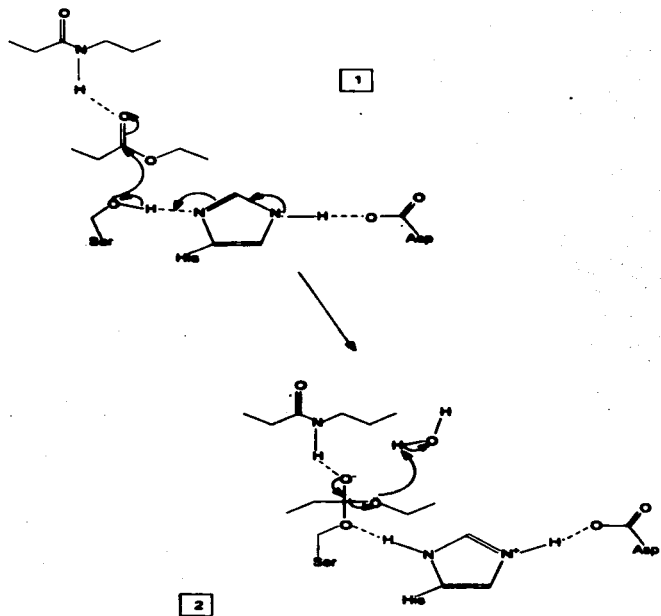
Un amplio número de laboratorios ha trabajado en la cristalización de lipasas bacterianas para determinar la estructura tridimensional de las mismas. En la

actualidad se han elucidado nueve estructuras de lipasas microbianas por rayos-X, siete de ellas son de origen fúngal -*Rhizomucor miehei* (21), *Geotrichum candidum* (73), *Penicillium camembertii* (45), *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delamar* (22) *Candida rugosa* (35), *Candida antarctica* (62) y *Fusarium solani* (49)-; así como una bacteriana -*Pseudomonas glumae* (34, 49)-.

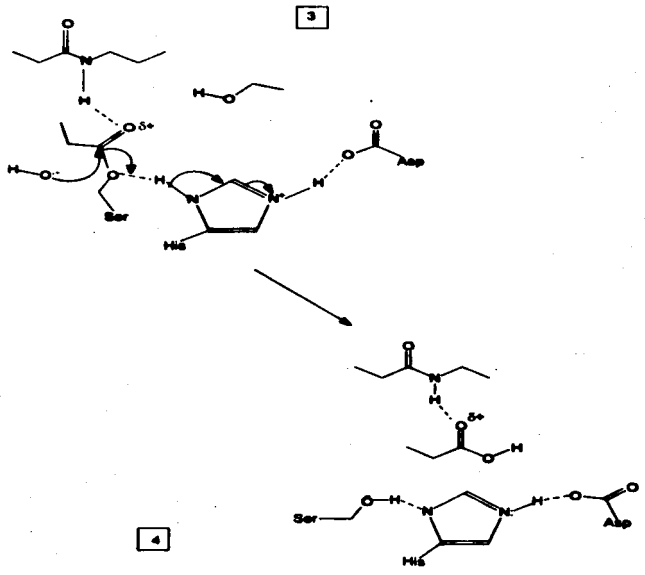
En las estructuras de lipasas que se han obtenido por rayos-X se observa una estructura $\alpha\beta$ con un centro β -hoja plegada que contiene los residuos catalíticos, aunque varían las uniones entre los elementos estructurales conservados. Este patrón de plegamiento α/β se ha considerado como general para una gran familia de diferentes hidrolasas como la acetilcolinesterasa, la carboxipeptidasa serínica, etc. (21, 94).

El centro catalítico de las lipasas contiene una tríada catalítica similar al de las proteasas serínicas que consiste en residuos de Ser-His-Asp, donde el residuo del sitio activo se localiza en un motivo β - ϵ Ser- α , en el cual la serina nucleofílica adopta una estructura secundaria que parece ser común a todas las lipasas y esterases dependientes de serina (49, 73, 94). Se sabe ya desde algún tiempo que las proteasas serínicas hidrolizan enlaces peptídicos a través de un ataque nucleofílico mediante el residuo de Ser el cual se activa vía un acoplamiento Asp-His y la acción de un agujero-oxianión el cual proporciona un ambiente electrofílico que estabiliza la carga negativa generada durante el ataque nucleofílico sobre el enlace amido (esquema 1 a y b). Las similitudes entre las estructuras electrónicas de los enlaces éster y amido explican por qué el mecanismo catalítico de las proteinasas serínicas abarca a las lipasas. A diferencia de otras lipasas, la de *Geotrichum candidum* tiene su tríada formada por Ser-His-Glu, donde el residuo Glu tiene la función carboxilato equivalente necesaria para activar a la serina que cataliza el ataque nucleofílico (73).

Una característica poco usual e interesante de la estructura de las lipasas, es que su sitio activo está inmerso en una estructura parecida a una "tapa" compuesta



Esquema 1a. Mecanismo detallado de la hidrólisis de un enáncico éster catalizado por una lipasa. Pasos 1 a 2. Tomado de Jaeger, 1994 (49).



Esquema 1b. Mecanismo detallado de la hidrólisis de un enlace éster catalizado por una tripepsa. Pasos 3 a 4. Tomado de Jaeger, 1994 (48).

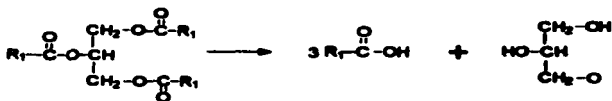
de una o dos α -hélices. Esto apoya la hipótesis de que los triacilglicerol lipasas sufren un cambio conformacional en respuesta a la adsorción en la superficie agucosa (activación interfacial). Se ha propuesto que la cubierta se mueve permitiendo que el sitio activo se vuelva accesible al sustrato. Otro resultado de este cambio conformacional es un considerable aumento en la superficie hidrofóbica de la enzima, la cual está implicada en el reconocimiento superficie-lípido (49, 64).

Sin embargo, en los últimos estudios se ha visto una lipasa que no tiene esta cubierta o "tapa". La lipasa CALB de *Candida antarctica* no posee esta estructura y aunque se le encontró una pequeña α -hélice de 5 residuos que se pensaba podía ser su "tapa", se descubrió sin embargo que CALB no presenta activación interfacial como ocurre por ejemplo con *Humicola lanuginosa*, sino que por el contrario muestra un comportamiento cinético similar al que tiene la cutinasa de *Fusarium solani* (62). La ausencia de esta característica en la cutinasa se estudió mediante cristalografía de rayos-X y se encontró que además de no contar con la "tapa", tiene su agujero-oxianión preformado, lo que contribuye a la ausencia de activación interfacial. Diversos estudios filogenéticos parecen apoyar la teoría de que la cutinasa es un puente entre las esterases y las lipasas, ya que posee capacidad para desplegar su máxima actividad tanto hacia sustratos monoméricos como hacia una interfase agua/aceite (63).

2.2 Reacciones que catalizan las lipasas:

Las lipasas son capaces de catalizar reacciones tanto en sistemas acuosos como en medios orgánicos. En medios acuosos realizan reacciones de hidrólisis y en sistemas no acuosos pueden llevar a cabo reacciones de transesterificación y de síntesis. En la reacción de hidrólisis (esquema 2) hay una ruptura del enlace éster de los triacilglicérols teniendo como producto final glicerol y ácidos grasos libres (67, 77). La velocidad de la reacción de hidrólisis puede ser muy variable dependiendo de varios factores como: a) la naturaleza del sustrato, ya sea éste tri,

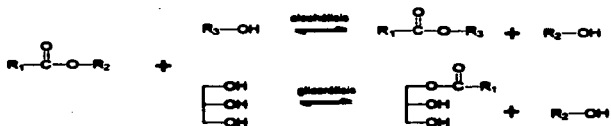
di o monoacilglicerol; b) la posición del enlace éster, ya que puede haber hidrólisis específica de ésteres primarios o hidrólisis no-específica tanto de ésteres primarios como secundarios; c) preferencia por algunos ácidos grasos de acuerdo al grado de insaturación o del tamaño de la cadena; d) la estereoespecificidad, que puede favorecer la hidrólisis en la posición *sn*-1 o *sn*-3 en los triacilgliceroles y 1,3-diacilgliceroles (58).



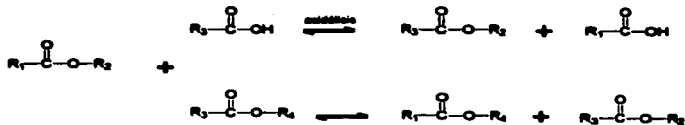
Esquema 2. Reacción de hidrólisis catalizada por lipasas. Tomado de Sonnet, 1988 (77).

Las reacciones de síntesis o de "hidrólisis reversa" que catalizan las lipasas son útiles en la formación de ésteres a partir de diversos alcoholes (alcoholes), ácidos grasos (acidólisis) y otros ésteres de ácidos grasos (esquema 3). Sin embargo, este tipo de reacciones tiene como factor limitante la eficiencia en la eliminación del agua del medio de reacción (11, 12, 25, 93). Se pueden distinguir dos tipos de reacciones de síntesis: la transesterificación y la interesterificación. La transesterificación implica la transferencia de un grupo acilo de un triacilglicerol a un alcohol o a glicerol. En la interesterificación el grupo acilo se intercambia entre un (tri)glicérido y un ácido graso (acidólisis) o un éster de ácido graso (otro (tri)glicérido).

Transesterificación



Interesterificación



Esquema 3. Reacciones de síntesis que catalizan las lipasas. Tomado de Jaeger, 1994 (49).

2.3 Fuentes y usos de las lipasas.

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son producidas por plantas (germen de trigo, *Vernonia galamensis*), animales (lipasas pregástricas de bovinos, porcinos, etc.) y microorganismos (52). Las lipasas de plantas no tienen aplicaciones comerciales en la producción de ingredientes modificados enzimáticamente, pero las lipasas microbianas y animales han sido usadas con éxito en la producción de nuevos ingredientes.

De manera tradicional las lipasas se han aplicado en alimentos para el desarrollo de sabores y aromas, como en el caso del proceso de maduración de quesos tipo italiano, como el Provolone, Parmesano, Mozzarella, etc.; así como en la producción de lipolizados para la elaboración de saborizantes (5, 6, 26, 52). Otra de las aplicaciones que ha resultado de gran interés es su uso en formulaciones de detergentes. Actualmente existen al menos seis productos que contienen lipasa para ser usados como aditivos en detergentes de uso casero (48).

La deposición de resinas en los cilindros de secado es un serio problema que afecta la calidad del papel. El tratamiento de la pulpa con lipasas permite considerables mejoras en productividad y calidad requiriéndose con menor frecuencia la limpieza de los cilindros de secado (12).

Las reacciones de síntesis abarcan varios aspectos dentro de las aplicaciones industriales. La principal aplicación de este tipo de reacciones se encuentra en la producción de compuestos ópticamente activos (77). Por ejemplo, las lipasas se utilizan en la resolución de mezclas racémicas por hidrólisis asimétrica de los ésteres correspondientes. De este modo, esta reacción se ha utilizado en la producción de insecticidas, en la producción de saborizantes como el acetato de geraniol, o en la síntesis de diversos péptidos (81). Por otro lado, las lipasas tienen aplicación en la síntesis de bloqueadores β -adrenérgicos, los cuales son medicamentos quirales para el tratamiento de la hipertensión y la angina de pecho.

En 1985 las ventas de bloqueadores β -adrenérgicos fueron de 2.2 billones de dólares (12, 83). Hasta los 80's aún se usaba el proceso químico, sin embargo con el uso de las lipasas este procedimiento se ha vuelto mucho más selectivo en la producción no sólo de éste sino también de otros medicamentos quirales.

La transesterificación ha encontrado una aplicación limitada a escala comercial. El ejemplo más conocido es el de la transformación de un triacilglicerol de bajo costo como el aceite de palma, en triacilgliceroles de mayor valor agregado como los que componen a la manteca de cacao, que se usa en formulaciones de alimentos y cosméticos (12, 58, 83). Otro producto potencial de la reacción de transesterificación son los lípidos que han sido nombrados como "estructurados" que se pueden usar en la nutrición parenteral: en este caso se producen triacilgliceroles que se pueden degradar fácilmente por las lipasas lipoproteicas del torrente sanguíneo (12).

Por otro lado, el interés médico en las lipasas ha sido estimulado de manera significativa por la observación de que la malfunción de las enzimas lipolíticas humanas podría estar ligada a la aterosclerosis y a la obesidad. Mutaciones en ambos genes de las lipasas hepática y lipoproteica han mostrado ser responsables de algunos trastornos familiares del metabolismo de lípidos (49).

2.4. Clonación de genes de lipasa.

En la actualidad existe un gran interés en la clonación de los genes de lipasa, debido a que con ello es posible realizar estudios posteriores, ya sea estructurales, funcionales o para sobreproducción de la enzima. Por ello es que numerosas lipasas han sido clonadas, tanto de origen bacteriano como fungal. Dentro de las lipasas bacterianas se encuentran los genes de lipasa provenientes de *Bacillus subtilis* (18), *Streptomyces lividans* (88), varios de *Staphylococcus* (49) y algunos otros de bacterias psicrófilas como los géneros *Pseudomonas* (31, 34, 50, 86) y *Moraxella* (28).

En el caso de los hongos se ha visto un creciente interés en la clonación de los genes de lipasa, debido a que se han encontrado aplicaciones industriales interesantes. La clonación se ha apegado a estudios de regulación de la expresión de la enzima como es el caso de la lipasa de *Rhizopus delemar* (38), en donde ésta se sintetiza en forma de precursor (preproenzima) y mediante modificaciones postraduccionales se convierte a la enzima madura que puede ser secretada al exterior de la célula. Por este tipo de procesamiento de las proteínas, cuando se intentó expresar la lipasa en *Escherichia coli* se tuvieron algunos problemas ya que esta bacteria no puede llevar a cabo las modificaciones postraduccionales y se obtenía enzima sin modificar.

La lipasa de *Rhizomucor miehei* se clonó primeramente en *E.coli* y posteriormente se hizo una construcción con el gen de lipasa clonado y se transformó una cepa de *Aspergillus oryzae* la cual mostró la actividad normal de la enzima, ya que al ser un eucariote sí pudo realizar el procesamiento correcto de la proteína (42).

3. ANTECEDENTES:

Las enzimas lipolíticas que fueron introducidas inicialmente en el mercado eran lipasas páncreáticas de ternera o de certero. Sin embargo, la producción de enzimas de fuentes animales presenta con frecuencia problemas de disponibilidad y manejo, además de que se requieren importantes extensiones de terreno y mucha mano de obra para su producción. En cambio, la utilización de microorganismos como fuente de enzimas ofrece muchos atractivos, toda vez que su cultivo puede llevarse a cabo en espacios reducidos y en condiciones controladas, además de ser susceptibles de manipulación genética y ambiental.

Los hongos filamentosos son las fuentes de lipasa preferidas para el uso industrial, ya que producen enzimas extracelulares. Las especies más productivas pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Penicillium candidum es un hongo deuteromiceto que produce lipasa, ésta genera un lipolizado con mejores características organolépticas que las proporcionadas por enzimas provenientes de otros microorganismos. Lo anterior fue demostrado experimentalmente mediante un análisis sensorial, utilizando una prueba de rango de preferencia sobre un lipolizado de crema. Además se observó que de 15 cepas probadas, *P.candidum* presentó una alta actividad lipolítica así como una actividad proteolítica relativamente baja (tabla 1). Esta baja actividad de proteasa tiene ventajas en cuanto que se evita la hidrólisis de la lipasa, mejorándose el rendimiento de la misma, además de evitar sabores amargos en productos lácteos modificados (87).

Se ha visto que la producción de lipasa por *P.candidum* es inducible, es decir, que hay que añadir algún lípido al medio de cultivo para observar su producción. Díaz (24) estudió el efecto que tenían diferentes tipos de aceites sobre la producción de enzima: en este estudio se concluyó que el mejor inductor de la producción de la

TABLA 1. Actividad lipolítica y proteolítica de hongos.

MICROORGANISMO	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA (UL/ml) ¹	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (UI/ml) ²
<i>Aspergillus niger</i>	2.8	8.8
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	1.4	0.0
<i>Geotrichum candidum</i> (2)	1.1	16.0
<i>Mucor nidulans</i>	28.1	16.8
<i>Penicillium camemberti</i>	24.8	13.2
<i>Penicillium candidum</i>	38.8	12.6
<i>Penicillium chrysogenum</i> IAM 12842	7.4	48.0
<i>Penicillium chrysogenum</i> NRRL 1851	14.0	27.8
<i>Penicillium caseicola</i>	14.0	12.7
<i>Penicillium glaucum</i>	8.1	8.8
<i>Penicillium roqueforti</i> Milano CNRZ 883	8.1	8.8
<i>Penicillium roqueforti</i>	8.0	38.8
<i>Penicillium roqueforti</i> Milano	1.7	32.0
<i>Rhizopus arrizus</i>	0.8	2.8
<i>Rhizopus delemar</i> CDSB H313	1.7	4.4

1) UL/ml: micromoles de ácido butírico liberados en un minuto de reacción por mililitro de extracto enzimático.

2) UI/ml: miligramos de tirosina liberada en un minuto de reacción por mililitro de extracto enzimático.

Fuente: Tineo, 1988 (87).

lipasa era el aceite de oliva, siguiéndole como mejores inductores los aceites de cártamo y girasol. Posteriormente, se trató de definir cuál era el metabolito responsable del fenómeno de inducción, para ello se probaron diferentes componentes del aceite de oliva entre los cuales se incluyeron tanto triacilglicérols (C18:1, C18:0 y C16:0) como monoacilglicérols (C4:0, C10:0, C16:0, C18:0 y C18:1), además del glicerol. De este experimento se observó que la mayor producción de lipasa se tenía usando trioleína y oleato como inductores.

Se ha visto además que la producción de lipasa de *P.candidum* se ve afectada por la concentración de la fuente de carbono. Concentraciones mayores al 3% de glucosa ejercen un efecto negativo sobre la producción de lipasa; este efecto se observó también con galactosa y fructosa. Lo anterior contrasta con lo que se ha visto en otros hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, el cual a una concentración de 1% de glucosa presenta represión de la síntesis de enzima. En el caso de *A. nidulans* utilizando mutantes se vio que esta represión no sigue el mecanismo conocido del gen *creA* (81), en el cual la proteína represora CreA se une en la caja de G-C del promotor de *alcR* que codifica para el activador de los genes *alc* relacionados con el metabolismo del etanol.

En los últimos años ha aumentado el número de lipasas que han sido purificadas y caracterizadas (Tabla 2), esto se debe principalmente a que las diferentes lipasas presentan amplias variaciones en sus propiedades y por ello los investigadores continúan la búsqueda de lipasas que puedan tener nuevas aplicaciones (3, 72).

Algunos hongos muestran la presencia de dos o más lipasas, este es el caso de *A.niger*, *G.candidum* y *Candida rugosa* (Tabla 2). Asimismo las temperaturas óptimas de los ensayos de estas enzimas se encuentran en un rango de 30-40°C y sus pHs óptimos van de 5 a 8. La adición de metales como Fe²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ de manera general ejercen efecto negativo sobre la actividad de las lipasas tanto fungales como bacterianas. Sólo en algunos casos se ha visto efecto positivo con

Ca^{2+} y se ha observado que las sales monovalentes no tienen por lo general ningún efecto sobre la actividad de la enzima. Finalmente, en lo que se refiere a la acción de agentes quelantes y desnaturalizantes, se han podido observar efectos sólo en algunos casos. Por ejemplo, el EDTA tiene efecto sólo en lipasas que requieren de un ión metálico. En el caso de SDS se ha visto que presenta generalmente un efecto inhibitorio sobre estas enzimas. En los casos del uso de agentes específicos de grupo como el DEPC (diisopirocarbonato) y DPF (fluoruro de diisopropilo) sólo afectan a algunos residuos de aminoácidos que posiblemente se encuentran en el sitio activo de la enzima.

Tabla 2. Características bioquímicas de algunas lipasas.

Origen de la lipasa (referencia)	Peso molecular (kDa) ^a y pI ^b	pH ^c y Temp. óptimas	Estabilidad frente a la temperatura	Estabilidad a pH	Efecto de la acción de metales y SDS
<i>Aspergillus niger</i> (41)	31, 18 ^a 4.0, 3.5 ^b	5-6 ^c 40°C	por debajo de 40°C	7-8 a 30°C por 10 min	CaCl_2 y MgCl_2 aumentan la actividad, MnSO_4 disminuye, SDS y AgNO ₃ la inhiben.
<i>Aspergillus oryzae</i> (88)	41 ^a	7 ^c 30°C	30°C por 3 h	6-8 a 25°C por 18 h	NaCl y EDTA no le afectan, DEPC la inhibe completamente.
<i>Fusarium</i> sp YM-30 (62)	12 ^a 7.20 ^b	7-8 ^c 37°C	40°C por 15 min.	5-9 a 40°C por 15 min	Ag^+ , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y DPF la inhiben; no se afecta con Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y EDTA
<i>Geotrichum candidum</i> (7, 89)	56, 56 ^a 4.56, 4.46 ^b	6, 6.6 ^c 37°C	n.d.	4-8, 6-8 a 4°C por 30 min	NaCl , KCl sin efecto, EDTA, SDS inhibición completa, CaCl_2 , MgCl_2 inhibición.

DEPC: diisopirocarbonato

SDS: lauril sulfato de sodio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

DPF: difluoruro de diisopropilo

n.d. no determinado

Características como termoestabilidad y estabilidad a pHs extremos se han encontrado con frecuencia en las lipasas de origen bacteriano. Las lipasas de *Pseudomonas* y *Chromobacterium* son usadas generalmente en la producción de surfactantes, insecticidas, medicamentos quirales, lactonas macrocíclicas y ésteres de acrilato. El uso de estas enzimas no se permite en alimentos por no ser consideradas como GRAS (Generally Recognized As Safe), para ello en general se utilizan lipasas de origen fungal. No obstante esto, algunas lipasas fungales han adquirido importancia en aplicaciones dentro de la síntesis orgánica debido a características sobresalientes en cuanto a su regio y estereo especificidad, éste es el caso de una lipasa de *Geotrichum candidum* (lip A) que es capaz de discriminar entre ácidos grasos insaturados y saturados dentro del triacilglicerol (9, 10, 16, 47, 48, 76, 80).

Los estudios sobre cinética enzimática de las lipasas son con frecuencia complicados, debido al hecho de que su cinética no puede ser descrita con el modelo de Michaelis-Menten, puesto que este modelo sólo es válido en el caso de fases homogéneas, esto es, para enzimas y sustratos solubles. Por esto se ha propuesto un nuevo modelo que describe el caso de las lipasas, este consiste en dos etapas: 1) la adsorción física de la enzima a la interfase lipídica que puede incluir una activación de la enzima (se abre la "tapa" que bloquea el sitio activo); 2) formación del complejo enzima-sustrato, que puede ser hidrolizado hasta dar el producto y regenerar la enzima adsorbida. Por todo esto, la determinación de cinéticas de inhibición enzimática se lleva a cabo usando técnicas de monocapa, lo cual permite utilizar el modelo de Michaelis-Menten (88).

De esta manera debido a la creciente importancia de encontrar lipasas con características bioquímicas interesantes tanto desde el punto de vista industrial para usos potenciales en este ramo, como con el fin de incrementar el conocimiento acerca del modo de acción de esta enzima, en nuestro laboratorio se decidió plantear el presente proyecto con los siguientes objetivos:

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar las propiedades bioquímicas de la lipasa de *Penicillium candidum* y emplear estos conocimientos para establecer un método racional de purificación.

Objetivos particulares:

- Determinar el peso molecular de la lipasa de *P.candidum*.
- Determinar pH óptimo de la enzima de *P.candidum*.
- Determinar la temperatura óptima para el ensayo de la lipasa.
- Determinar estabilidad frente a pH y a la temperatura de la enzima.
- Establecer la especificidad por sustrato de la lipasa.
- Determinar efecto de algunos iones y del SDS sobre su actividad.
- Determinar el punto isoelectrónico de la lipasa.
- Determinar la presencia de carbohidratos en la enzima.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo empleado y su conservación.

La cepa utilizada es el hongo *Penicillium candidum* procedente del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Esta cepa se conservó a 20°C bajo cero como suspensión de esporas en glicerol al 40% o en forma de micelio en tubo inclinado con tapón de roca en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Ager) a 4°C.

5.2 Medios de cultivo y preparación del inóculo de *Penicillium candidum*.

El hongo se inoculó en medio sólido de PDA y se incubó a 27°C durante 6 días, tiempo en que el hongo esporuló. Posteriormente, este medio de cultivo se sustituyó por el medio "A" (tabla 3) en donde el hongo produjo la mayor cantidad de esporas, facilitando de este modo la obtención del inóculo (87). Las esporas se cosecharon y con éstas se preparó una suspensión a 1.4×10^8 de células viables/ml, en una solución de sales con elementos traza (tablas 4 y 6). Para el crecimiento y producción de la enzima, se colocaron 100 µl de esta solución de esporas en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio "D" (tabla 5), suplementado con 0.2% de aceite de oliva como inductor de la producción (13, 20). Los matraces se incubaron a 27°C con una agitación de 160 r.p.m. durante 3 días o el tiempo necesario para el tipo de experimento realizado en cada caso.

TABLA 3. Composición del medio "A".

Componentes	g/l
maíz quebrado tamizado	40.0
ager-ager	20.0
solución salina	40.0 ml

TABLA 4. Composición de la solución de sales.

Componente	g/l
K_2HPO_4	13.48
KH_2PO_4	16.68
$MgSO_4$	0.5
solución de elementos traza (tabla 6)	1 ml

TABLA 5. Composición del medio "D".

Componente	g/l
glucosa	10.0
caseínoácidos	10.0
KNO_3	2.0
KH_2PO_4	1.0
$MgSO_4$	0.5
elementos traza (tabla 6)	1.0 ml

TABLA 6. Composición de la solución de elementos traza.

Componente	mg/l
sulfato de zinc	436.9
nitrato de hierro (II)	723.5
sulfato de manganeso	203.0

5.3 Determinación del crecimiento de *Penicillium candidum*.

La determinación del crecimiento del hongo se realizó siguiendo el incremento en peso seco. Para ello se filtró el caldo de fermentación en papel filtro Whatman 540, previamente secado y tarado, para así separar el micelio. Posteriormente se secaron

estos papeles durante 24 horas a 60°C y se pesaron. El crecimiento se expresa como miligramos de biomasa por mililitro de caldo de fermentación (20, 24).

5.4 Precipitación de la enzima.

Como la enzima se encuentra en el medio junto con otras proteínas y demás componentes del medio de cultivo, es necesario hacer una purificación parcial para concentrar la actividad y eliminar las interferencias con estos componentes; por ello se hizo una precipitación selectiva entre 65 y 85% de sulfato de amonio. Este tipo de precipitación que utiliza sales se basa en las características hidrofóbicas de las proteínas (15).

Método de precipitación con sulfato de amonio. Se filtró el cultivo y se enfrió el líquido a 0°C, una vez frío, se le adicionó el sulfato de amonio hasta tener un 65% de saturación (39.8 g/100 ml), se dejó agitando durante 1 hora y se centrifugó a 15 000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se puso nuevamente a enfriar a 0°C (el precipitado se descartó), se adicionó nuevamente sulfato de amonio hasta saturación de 85% (13.2 g/100 ml) y se dejó agitando durante toda la noche en el cuarto frío. Al día siguiente se precipitó centrifugando en las condiciones ya mencionadas y se decantó el sobrenadante haciendo lo posible porque el precipitado quedara lo más seco posible. El botón se disolvió en 1.5 ml de amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.0 y se guardó en refrigeración hasta su uso.

5.5 Determinación de actividad enzimática.

A. Método con emulsión. Este método se basa en la determinación de la acidez debida a los ácidos grasos liberados durante la reacción de lipólisis, esta acidez generada puede ser observada por titulación o por cambio de pH (41). Procedimiento: se preparó amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.0; se tomaron 3 ml de este amortiguador y se mezclaron con 80 μ moles de tributirina (23.5 μ l), se pusieron en agitación y se les adicionó la enzima (85 μ l dilución 1:100). Entonces se midió el pH inicial de la muestra

y se incubó la mezcla de reacción durante 30 minutos a 35°C; una vez pasado el tiempo de incubación se midió el pH final de la mezcla, se determinó entonces la diferencia de pH, la cual se interpoló en una curva de ácido butírico (fig. 1), para el cálculo de las μ moles de ácido butírico liberadas por minuto (definición de una unidad de lipasa).

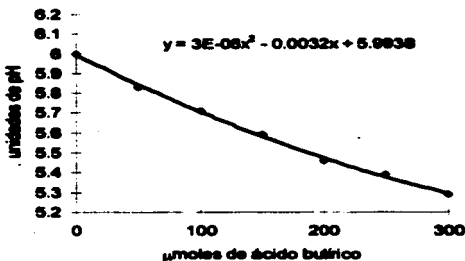


Figura 1. Curva estándar de ácido butírico. La determinación se hizo usando un potenciómetro Beckman #40.

B. Método con p-nitrofenil laurato (p-NFL). En este método se utiliza un sustrato que al ser hidrolizado por la lipasa genera un compuesto que es colorido (p-nitrofenol), éste se mide espectrofotométricamente a 410 nm (44, 66). **Procedimiento:** se disolvieron 25 μ moles del sustrato p-NFL en 200 μ l de Tritón X-100 y se dispersó esta solución en 9.8 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM a pH 7.2. De esta solución final se tomaron 950 μ l para realizar la prueba con 50 μ l de muestra enzimática y se midió la D.O. 410 nm al

inicio de la incubación (a 35°C) y 20 minutos después. Como control se hizo un blanco de enzima desnaturalizada del cual también se leyó su D.O. 410 nm al inicio y al final de la incubación. Con estos datos se calculó la diferencia de densidad óptica de la muestra y se determinó la actividad de la enzima, sabiendo que el coeficiente de extinción molar es $4.8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad de lipasa es la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto.

5.6 Electroforesis de proteínas y determinación de actividad *in situ*.

Se hicieron geles de electroforesis desnaturalizante de proteína según el método propuesto por Laemmli (55). Los geles se hicieron de tipo discontinuo usando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10% de poliacrilamida. Cuando los geles iban a ser revelados por actividad se adicionaban 20 μg de albúmina sérica bovina (ASB) con el fin de facilitar la posterior renaturalización de la enzima.

Las muestras se diluyeron a una concentración de 20-25 μg de proteína/ μl , se calentaron a ebullición durante un minuto y se aplicaron 10 μl en cada pozo. La electroforesis se corrió a 30 mV durante 2-3 h en una cámara vertical Miniprotean II de BioRad (geles de actividad) o en una SE-600 de Hoefer Scientific Instruments (geles para determinar glicosilación). Terminada la electroforesis los geles se tificaron según el método de Coomassie (8, 71) o con peryodato-Shift según el caso.

Para revelar por actividad, el gel de electroforesis se lavó tres veces del siguiente modo: primero se hizo un lavado con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.5 durante 30 minutos con agitación constante. El segundo lavado se realizó en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.5) con 5% de Tritón X-100 y se incubó como el primer lavado. Se continuó con un tercer lavado en amortiguador de fosfatos con 0.5% de Tritón X-100 y se incubó de igual manera que los anteriores lavados.

inicio de la incubación (a 35°C) y 20 minutos después. Como control se hizo un blanco de enzima desnaturalizada del cual también se leyó su D.O. 410 nm al inicio y al final de la incubación. Con estos datos se calculó la diferencia de densidad óptica de la muestra y se determinó la actividad de la enzima, sabiendo que el coeficiente de extinción molar es $4.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad de lipasa es la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto.

5.6 Electroforesis de proteínas y determinación de actividad *in situ*.

Se hicieron geles de electroforesis desnaturalizante de proteína según el método propuesto por Laemmli (55). Los geles se hicieron de tipo discontinuo usando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10% de poliacrilamida. Cuando los geles iban a ser revelados por actividad se adicionaban 20 μg de albúmina sérica bovina (ASB) con el fin de facilitar la posterior renaturalización de la enzima.

Las muestras se diluyeron a una concentración de 20-25 μg de proteína/ μl , se calentaron a ebullición durante un minuto y se aplicaron 10 μl en cada pozo. La electroforesis se corrió a 30 mV durante 2-3 h en una cámara vertical Miniprotein II de BioRad (geles de actividad) o en una SE-600 de Hoefer Scientific Instruments (geles para determinar glicosilación). Terminada la electroforesis los geles se tiñeron según el método de Coomassie (6, 71) o con peryodato-Shift según el caso.

Para revelar por actividad, el gel de electroforesis se lavó tres veces del siguiente modo: primero se hizo un lavado con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.5 durante 30 minutos con agitación constante. El segundo lavado se realizó en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.5) con 5% de Tritón X-100 y se incubó como el primer lavado. Se continuó con un tercer lavado en amortiguador de fosfatos con 0.5% de Tritón X-100 y se incubó de igual manera que los anteriores lavados.

Por otro lado, se hizo el gel de sustrato de la siguiente manera: se prepararon 50 ml de gel de agarosa al 0.8 % en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.5). Una vez disuelta la agarosa se dejó enfriar un poco y se le adicionó el sustrato p-NFL previamente disuelto en Tritón X-100 (125 μ mol de p-NFL en 1 ml de Tritón). Se dispersó el sustrato en la agarosa, se vertió en un molde para gales y se dejó solidificar.

Una vez lavado, el gel de proteína se sobrepuso al gel de sustrato previamente preparado. Se puso a incubarse a 35°C en cámara húmeda hasta la aparición de una mancha de color amarillo (4-5 h aproximadamente); luego se marcó cuidadosamente la mancha con una espátula y se tiñó con azul de Coomassie.

Alternativamente, el ensayo de actividad se hizo también utilizando un gel de agarosa con tributirina emulsionada. Para ello se colocaron 60 μ moles de tributirina en 8 ml de agarosa al 0.8% en amortiguador Tris (20 mM, pH 8.0), se homogenizó perfectamente y una vez que la mezcla se entibió se le adicionaron 100 μ l de rodamina G al 0.1%, este ensayo permite discriminar adecuadamente si se tiene o no una lipasa. Al igual que en el caso anterior al gel de electroforesis se le hicieron tres lavados y después se acopló este al gel con sustrato, observándose un halo de hidrólisis en caso de reacción positiva (en 1 h aproximadamente).

5.7 Determinación de pH y temperatura óptimos del ensayo.

Para la determinación de pH óptimo de la enzima, se prepararon amortiguadores de pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9 de 4 a 6 con acetato de sodio/ácido acético 0.1 M y de pH 6 a 9, con fosfato de potasio 0.1 M. Se hizo una dilución 1:100 de enzima (obtenida después del fraccionamiento con sulfato de amonio), de esta dilución se tomaron 25 μ l y se determinó actividad según el método de p-NFL incubando a 29°C durante 20 min. Sin embargo, como el sustrato se degrada a pH mayor de 8, se utilizó también el método de emulsión con tributirina empleando amortiguador MOPS 20 mM (pH 8-9) y Gly 20 mM (pH 8-9).

En la determinación de la temperatura óptima del ensayo también se usó el método de p-NFL. De una dilución 1:100 de enzima se tomaron 25 μ l para cada reacción y se incubó en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 durante 20 minutos a diferentes temperaturas desde 25 a 50°C subiendo de cinco en cinco grados.

5.8 Determinación de la estabilidad frente al pH y la temperatura.

Para medir la estabilidad frente al pH se usaron soluciones amortiguadoras a pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9 que al igual que en el punto anterior se prepararon con acetato de sodio 0.1 M (pH 4 a 6) o fosfatos de potasio 0.1 M (pH 6 a 9). Se tomaron 10 μ l de la preparación original de enzima y se diluyeron a 1 ml con cada uno de los diferentes amortiguadores, después se incubaron a 37°C por 24 h. De cada una de estas diluciones de enzima con diferente pH, se tomaron 25 μ l y se determinó actividad residual en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 usando el método de p-NFL y teniendo como control un tubo con enzima sin tratamiento.

Para la determinación de la estabilidad frente a la temperatura, se prepararon varios tubos con dilución de enzima (1:100) en amortiguador de fosfatos a pH 6. Cada tubo fue incubado 10 min a diferente temperatura (35-70°C). Después de esta incubación se tomaron 25 μ l de solución de enzima de cada tubo y se les determinó actividad residual a 35°C según el método de p-NFL, comparando contra un control sin tratamiento térmico.

5.9 Efecto de iones metálicos y SDS sobre la actividad de lipasa.

Al medio de reacción de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.2 con sustrato se le adicionó la sal o el compuesto a probar hasta tener la concentración deseada (1 ó 10 mM); se añadieron entonces 25 μ l de la enzima dializada (dilución 1:100) y se continuó

con el procedimiento para determinar actividad según el método de p-NFL. Se hizo el cálculo de actividad relativa comparando con un control, al cual no se le adicionó ningún compuesto o sal.

5.10 Determinación de la especificidad por el sustrato.

Se probó la actividad que presentaba la enzima hacia diferentes sustratos. En este caso se ensayaron mono, di y triacilglicérolos de diferente longitud de cadena, con o sin insaturaciones. Se utilizó el método de emulsión para determinar la actividad enzimática, en el caso de los experimentos con triacilglicérolos se usaron 80 μ moles de sustrato y en el caso de mono y diacilglicérolos, se utilizaron 40 μ moles emulsiificados en 3 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Al final de la determinación se calculó la actividad relativa en porcentaje con respecto al sustrato hacia el que tuvo mayor actividad (88).

5.11 Determinación del punto isoelectrónico.

El punto isoelectrónico se determinó con el equipo PhastSystem (Pharmacia), utilizando placas de isoelectroenfoque con un gradiente de pH 3-9 y colocando muestras de 5 μ g proteína en cada pozo. La determinación de proteína se hizo por el método de Lowry (8).

En este equipo se corrió la electroforesis durante 35 minutos. Inmediatamente después se fijó en una solución de ácido tricloroacético al 20% por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con una solución para desteñir de metanol-agua (3:1) y se dejó incubando en ella durante 2 minutos. Después se tñó con la solución Phastigel blue R (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Sweden), incubando a 50°C durante 10 minutos con ligera agitación. Finalmente se colocó en una solución de destinción (metanol:ácido acético:agua, 3:1:6) incubando igualmente a 50°C por 10 minutos; ya desteñido se secó el gel a temperatura ambiente durante una hora (Development Technique File No. 200, Pharmacia Biotechnology).

Para determinar las bandas que correspondían a la lipasa, se corrió un gel bajo las condiciones antes mencionadas, pero sin fijar e inmediatamente se acopló a un gel de sustrato preparado como se describió en la sección 4.6.

5.12 Determinación de presencia de carbohidratos en la lipasa.

Se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se cortaron dos carriles, en uno de los cuales se aplicaron 50 µg de muestra concentrada (filtrado sin precipitar); en el segundo carril se colocó un control de proteína con contenido de carbohidratos conocido (10%). El ensayo se realizó con un sistema de determinación de proteínas glicosiladas (Glycoprotein Detection Kit, Sigma). Este sistema tiene un límite de detección de 25-100 ng de carbohidratos, límite que depende de la naturaleza y grado de glicosilación de las proteínas a ensayar.

El gel de poliacrilamida se cortó y fijó inmediatamente en una solución metanol-agua desionizada (1:1) y se incubó en esta mezcla durante 30 minutos. Posteriormente se hicieron dos lavados con 200 ml de agua desionizada. Una vez terminados estos lavados, el gel se transfirió a una solución oxidante de ácido peryódico (H_2O_2), se dejó incubando en ella durante 35 minutos a temperatura ambiente con ligera agitación. Se lavó nuevamente el gel dos veces con 200 ml de agua desionizada, después se pasó a una solución de tinción o reactivo de Schiff (sulfato de fucsina), se dejó en esta solución hasta la aparición de bandas color magenta (40 minutos aproximadamente). Finalmente se hicieron lavados con agua desionizada (al menos tres veces) y se transfirió a una solución reductora compuesta de metabisulfito de sodio, se incubó durante 45 minutos en agitación suave y luego se volvió a lavar el gel con agua desionizada. Las bandas que pertenecen a la proteína glicosilada adquieren un color magenta cuya intensidad depende del grado de glicosilación de la proteína (Sigma Tech. Bulletin No. GDP-K (3-94)).

5.13 Determinación de actividad proteolítica.

Se preparó caseína al 2% disolviendo en agua y adicionando NaOH concentrada. La solución se diluyó a 125 ml con agua y después con dos volúmenes de amortiguador de fosfatos 0.25 M, pH 7-7.5.

Antes de realizar el ensayo se equilibraron las soluciones a 25°C. Para comenzar el ensayo se adicionaron 2 ml de la solución de caseína ya equilibrada, a 1 ml de la muestra y se mezclaron cuidadosamente. Se incubó la mezcla a 35°C durante 30 minutos y se detuvo la reacción añadiendo 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%; el precipitado formado se removió centrifugando a 6500 r.p.m. durante 15 minutos. El blanco se preparó combinando TCA con la enzima sola. Se determinó la tirosina liberada leyendo densidad óptica a 280 nm, los datos así obtenidos fueron interpolados en una curva patrón de tirosina (fig.2).

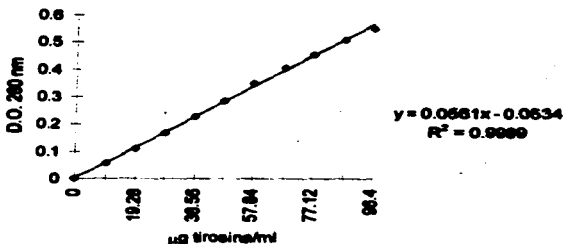


Figura 2. Curva estándar de tirosina determinada a 280 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Spectronic Instruments).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cinética de crecimiento y producción de lipasa de *Penicillium candidum*.

Para determinar el tiempo de cosecha apropiado para obtener la mayor concentración de enzima en el medio de producción, se realizó una cinética de crecimiento y producción de lipasa del hongo. El crecimiento se determinó por peso seco y la actividad lipolítica se determinó por el método de p-NFL.

En la figura 3 se puede observar que la producción se inició a las 48 h, alcanzando su máximo a las 72 h, después de este tiempo empieza a decaer debido probablemente a la entrada a la fase estacionaria del crecimiento del hongo. De acuerdo al comportamiento de la cinética de producción, podemos inferir que la enzima es de vida media corta, de ahí que al llegar a la fase estacionaria la caída en la producción sea tan pronunciada. La actividad específica nos indica la velocidad de síntesis de la enzima; bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo la actividad específica y volumétrica son proporcionales.

Este tipo de comportamiento cinético no se parece al presentado por otras cepas fúngicas como *Candida parapsiloticus* y *Rhizopus japonicus*, las cuales tienen su mayor producción de enzima al inicio de la fase estacionaria pero sin tener caída posterior de la misma lo que nos indica que estas enzimas tienen una vida media mas larga (58).

6.2 Purificación parcial de la enzima.

La purificación parcial de la enzima consistió en separar a la lipasa de otras proteínas y componentes del medio de cultivo que pueden interferir con la caracterización. Por ello se consideró importante llevar a cabo esta purificación parcial, ya que de este modo la enzima es más estable y se facilita su manipulación posterior.

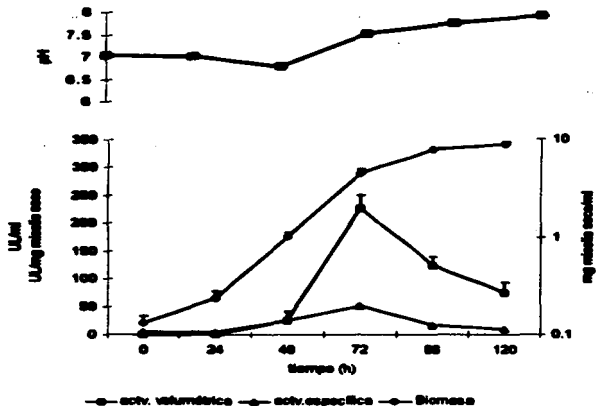


FIGURA 3. Cinética de crecimiento y producción de lipasa de *Penicillium caseatum*. El hongo se cultivó en medio "D" (ver sección 5.2) con agitación de 160 r.p.m. a 27°C durante 120 h. Se tomó muestra cada 24 h para realizar las determinaciones de crecimiento (por peso seco), pH y actividad lipolítica (método de p-NFL). UL: μ moles de p-nitrofenol liberados por minuto.

Un método sencillo de hacer la purificación parcial es mediante la precipitación diferencial, ésta puede hacerse ya sea con solventes o con sales. En este caso se probaron dos solventes: el etanol y la acetona; en ambos casos se perdió totalmente la actividad lipolítica debido posiblemente a una desnaturalización irreversible de la enzima, ya que la actividad no se recuperó aún después de dializar 24 h en amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7).

La sal que se probó fue el sulfato de amonio, con la cual hubo poca pérdida de actividad lipolítica. Entonces se hicieron precipitaciones a diversas concentraciones de sulfato de amonio (de 25, 55, 85 y 100 %). En la figura 4 se presentan los resultados de la precipitación diferencial del filtrado, en ella se ve que al 85% de saturación se obtuvo la mayor actividad lipolítica en el precipitado. Con esta precipitación se enriqueció la actividad lipolítica en casi 20 veces y se recuperó un 48% de su actividad original (tabla 7). La mayoría de las lipasas de origen fúngal se precipitan con sulfato de amonio, ya que este método además de relativamente barato se considera como "suave" por su bajo efecto desnaturalizante sobre las enzimas y por su efecto estabilizador sobre algunas proteínas.

Tabla 7. Purificación parcial de la lipasa de *Penicillium candidum*.

muestra	actividad total (UL)	proteína total (mg de proteína)	actividad específica (UL/mg proteína)	factor de enriquecimiento	% de recuperación
original	82 826.1	471.21	175.77	1	100
precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35 441.3	10.537	3 363.51	19	48

UL: μ moles de p-nitrofenol liberadas en un minuto de reacción a 35°C.

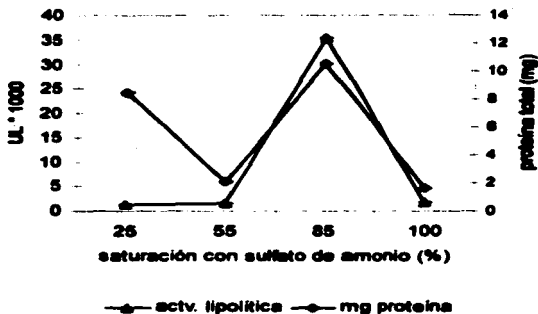


FIGURA 4. Perfil de precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Se utilizó el filtrado de un cultivo de 72 h de *P.candidum* y se precipitó a 0°C utilizando las diferentes concentraciones de sulfato de amonio que se indican. La actividad lipolitica se midió utilizando el método de p-NFL (sección 5.4-B) y la cantidad de proteina se determinó con el método de Lowry. UL: μ molea de p-nitrofenol liberados por minuto.

Muchas de las lipases se desnaturalizan fácilmente por efecto de solventes sobretudo con aquellos miscibles en agua. Como una excepción a lo anterior, se tiene reportado que lipases de *Fusarium* sp. YM-30 (84) y de *Aspergillus oryzae* (86) han sido precipitadas con etanol sin observarse ninguna pérdida de actividad.

6.3 Determinación del peso molecular de la lipasa

Para poder hacer un monitoreo de la proteína antes y después de la precipitación se hizo necesario conocer su peso molecular, para lo cual se hicieron electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se menciona en la sección 4.6. Se utilizaron gels al 12% de poliacrilamida y para localizar la banda que correspondía a la lipasa de *P.candidum* se hizo un ensayo de actividad *in situ*, para lo cual se utilizaron dos métodos de detección: el de rodamina y el de p-NFL. Esto fue necesario debido a que aunque el método de p-NFL es muy sensible también es capaz de detectar otras esterases, de ahí que se prefiriera corroborar resultados usando el método de rodamina que permite la diferenciación entre lipases y esterases. En la figura 5 se muestra un gel de poliacrilamida al 12% revelado con azul de Coomassie que presenta muestra del filtrado concentrado por ultracentrifugación (carries 1 y 2). La banda correspondiente a 29 kDa pertenece a la lipasa de *P.candidum*, ya que ésta mostró una mancha amarilla al revelar con p-NFL después de aproximadamente 4-5 h y en tributirina emulsionada se observó un halo de hidrólisis después de 1 h.

Como se mencionó arriba solamente se encontró una banda con actividad lipolítica lo cual difiere de lo visto en la cepa que proviene de la Facultad de Química: *Penicillium candidum* (FQ), misma que bajo condiciones de cultivo similares produce dos lipases con pesos moleculares de 24 y 29 kDa (1).

Anteriormente se habían hecho estudios sobre la inducción de la producción de la lipasa de *P.candidum* en medio sumergido. Como ya se dijo, Díaz (24) observó que

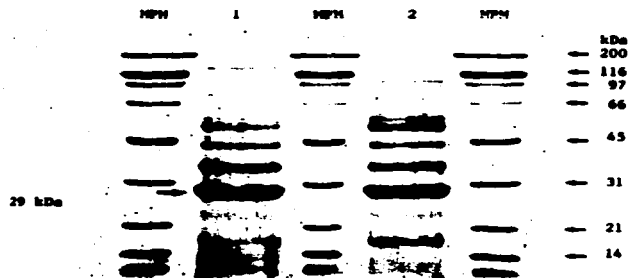


FIGURA 8. Gel de electroforesis de poliacrilamida al 12% corrido bajo condiciones desnaturalizantes. MPM: marcadores de peso molecular, carril 1: muestra de filtrado de cultivo concentrado y sin hervir; carril 2: muestra del filtrado de cultivo concentrado y hervida durante 1 minuto. El gel se corrió a 30 mV durante 2 h y se tiñó con azul de Coomassie.

el causante de la inducción era el ácido oleico. En el presente caso se trató de corroborar esta observación, para lo cual se realizaron cultivos con y sin inductor. Los filtrados de dichos cultivos se analizaron luego en gels SDS-PAGE al 10% aplicando muestras del filtrado obtenido del cultivo sin inductor (58.8 μg de proteína) y con inductor (53.12 μg de proteína). En el gel revelado con azul de Coomassie (figura 6) se puede notar claramente la aparición de la banda de 29 kDa con actividad lipolítica (carril 2).

Con el fin de determinar cuántas proteínas podrían ser eliminadas a través de la precipitación con sulfato de amonio, se corrió un gel de poliacrilamida al 10% (figura 7) en el cual se colocó una muestra del filtrado original concentrado (84.71 μg de proteína) y una muestra del filtrado después de la precipitación con sulfato de amonio (56.72 μg de proteína). En este gel se observa una menor intensidad relativa de bandas pertenecientes a otras proteínas, especialmente de aquellas de alto peso molecular. Para confirmar cuantitativamente lo observado, se llevó a cabo una determinación del porcentaje relativo de concentración de proteínas de este gel de poliacrilamida mediante el uso de un densitómetro (CAMAĞ Scanner). Esto nos permitió saber que en la muestra antes de la precipitación había aproximadamente un 18.9% de la enzima (respecto a la concentración total proteica), mientras que en la muestra después de la precipitación con sulfato de amonio hubo un 63.85% correspondiente a la banda de lipasa de *P.candidum* (anexo). Lo anterior es una medida de la eficiencia en separación específica de proteína con actividad lipolítica.

Asimismo se determinó la presencia de proteases antes y después de la precipitación para saber si con ella se lograba la separación de las dos actividades (tabla 8). Los resultados indican que después de la precipitación se elimina la actividad proteolítica en la preparación de la lipasa, lo cual contribuye a mejorar la vida media de esta actividad enzimática en la preparación.

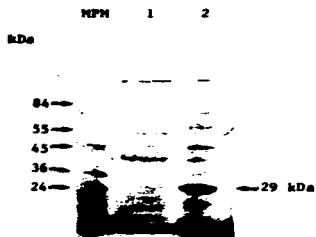


FIGURA 8. Gel de electroforesis de polisacrilamida al 10% corrido bajo condiciones desnaturalizantes. MPM: marcadores de peso molecular, carril 1: muestra del cultivo sin inductor, carril 2: muestra del cultivo con inductor. El gel se corrió a 20 mV durante 2.5 h y al final de la corrida se tiñó con azul de Coomassie.



FIGURA 7. Gel de electroforesis de poliacrilamida al 10% corrido bajo condiciones desnaturalizantes. MPM: marcadores de peso molecular, carriles 1 y 2: muestra del filtrado concentrado por liofilización; carril 3: muestra del filtrado después de la precipitación con 85% de sulfato de amonio. El gel fue corrido a 20 mV durante 3 h y al terminar se tiñó con azul de Coomassie.

Tabla 8. Determinación de actividad proteolítica.

Muestra	Actividad proteolítica (μg tiracina liberada/ml)	volumen total de muestra (ml)	μg tiracina total soluble en TCA
filtrado original	51.94	100	5194
precipitada con sulfato de amonio	0	1	0

6.4 Características bioquímicas de la lipasa.

Al contar con una preparación enriquecida en la actividad de interés y parcialmente pura, se realizó la determinación de las principales características bioquímicas de la enzima. Cabe señalar que para la caracterización se utilizó muestra sin dializar (es decir sin desalar) ya que al hacerlo se pierde un 30% de actividad. En el caso de la determinación del efecto de metales se usó la muestra dializada para evitar interferencias con otros iones que pudieran encontrarse en la preparación.

6.4.1 Efecto de temperatura.

Para llevar a cabo reacciones con la enzima es preferible hacerlo utilizando sus condiciones óptimas de incubación. Del mismo modo, es importante saber la estabilidad de la lipasa a diferentes temperaturas con el fin de determinar las mejores condiciones de almacenamiento y saber que tan estable es esta enzima a la temperatura de incubación. Por todo esto se determinó el efecto que tenía la temperatura sobre la actividad de la enzima y sobre su estabilidad.

La temperatura óptima para el ensayo de la lipasa se encontró en un rango de 34-37°C al haberse incubado en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.0) durante 20 min (figura 8 a). Este rango de temperatura óptima coincide con las reportadas para otros hongos como *Fusarium* sp., *G.candidum*, *P.cescicofum* y *P.simplicissimum* (tablas 2 y 10).

A partir de la curva de temperatura óptima para el ensayo de la lipasa se calculó el valor de su energía de activación (Ea) para la hidrólisis de p-NFL (figura 8b). El valor de Ea promedio fue de 11.12 kcal/mol, resultado similar a las energías de activación reportadas para otras lipasas (tabla 9).

Tabla 9. Energías de activación de algunas lipasas.

Origen de la lipasa	Sustrato	Ea (kcal/mol)	Referencia
<i>Candida rugosa</i>	Aceite de oliva	10.42	66
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aceite de oliva	19.55	32
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 69V	p-nitrofenil palmitato	9.54	29
Pancreática humana	Aceite de oliva	6.56	66

Cuando se probó su estabilidad frente a la temperatura (figura 9), se hizo el análisis en un rango de 25 a 70°C incubando durante 10 minutos en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6 y se encontró que a 70°C desaparece su actividad completamente, mientras que a 35°C se conservó sólo un 70% de actividad, al comparar con el control (lipasa conservada a 4°C). A 25°C se observó que la actividad lipolítica disminuyó solamente un 2.5% valor que se encuentra dentro del error de determinación (5%).

La baja estabilidad de la lipasa de *P.candidum* a la temperatura es similar a la observada en algunas lipasas provenientes de hongos del mismo género *Penicillium* (tabla 10). En contraste se ha reportado que las cepas de *P.citrinum* y *P.simplicissimum*

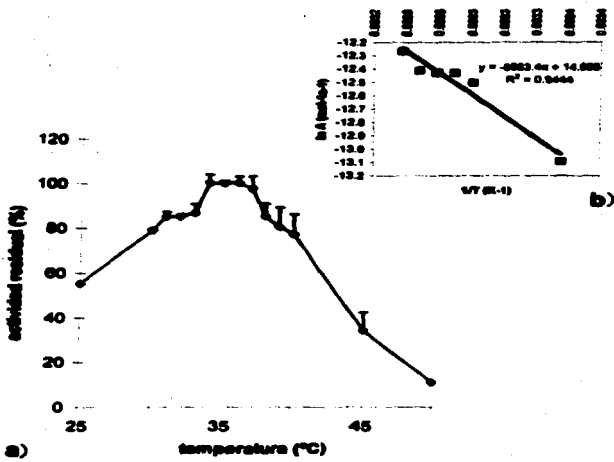


FIGURA 6. a) Temperatura óptima del ensayo de la lipasa de *P. candidum*. Se hizo la determinación en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, incubando en las temperaturas indicadas y usando el método de p-NFL. El 100% de actividad corresponde a 282.61 $\mu\text{mol p-NFL}/\text{min}$. b) Gráfica de la ecuación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de la lipasa de *P. candidum*. Para la gráfica se utilizaron los valores de actividad lipolítica en $\mu\text{moles de p-NFL/s}$, de la figura 6 a.

Tabla 10. Características bioquímicas de lipasas provenientes del género *Penicillium*

Origen de la lipasa	Peso molecular (kDa) y pI*	pH y temp. óptimas	Estabilidad a temperatura	Estabilidad a pH	Efecto de la adición de metales y SDB
<i>Penicillium camemberti</i> (46, 52)	37, 39 kDa	5-5.5 40°C 4.6°C	40°C por 30 min a pH 5.5	4-5.5, a 40°C por 1 h	N.R.
<i>Penicillium caseicola</i> (2)	N.R.	9 36°C	25°C por 24 h conserva el 90% de actividad	N.R.	N.R.
<i>Penicillium citrinum</i> (60)	N.R.	7.2 30°C	60°C por 10 min conserva el 40% de actividad	5-7, a 4°C por 30 min	NaCl, KCl no tienen efecto; MgCl ₂ , MgSO ₄ muestran inhibición; CaCl ₂ , FeCl ₂ , FeSO ₄ , SDB, CuSO ₄ inhibición completa
<i>Penicillium cyclopium</i> (44)	54	6 40°C	a 37°C por 30 min	4.5-6, a 37°C por 30 min	N.R.
<i>Penicillium expansum</i> (78)	26 kDa 5.5*	9 45°C	a temp. mayor de 30°C decaen la actividad después de 1 h.	6-10, a 25°C por 1 h	Ag ⁺ y Mn ²⁺ no tienen efecto; Fe ²⁺ , Fe ³⁺ y EDTA inhiben significativamente; Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ efecto negativo leve
<i>Penicillium simplicissimum</i> (54)	56 kDa	5 37°C	60°C durante 15 minutos	5-7, a 37°C por 1h	Fe ²⁺ , Ba ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ tienen efecto negativo leve; Ag ⁺ , Co ²⁺ efecto negativo del 15%; fuerte efecto negativo de Zn ²⁺ y EDTA. Efecto positivo ligero con Ca ²⁺ .
<i>Penicillium candidum</i> *	29 kDa 5.3, 5.5*	8 35°C	a 35°C por 10 min conserva el 70% de actividad	5-6 por 24 h	Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Na ⁺ no hay efecto; K ⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , SDB y EDTA tienen efecto negativo a 10 mM; Cu ²⁺ y Fe ²⁺ tienen efecto negativo a 1 y 10 mM. Efecto positivo con Ca ²⁺ .

* características determinadas en el presente trabajo.

N.R. no reportadas

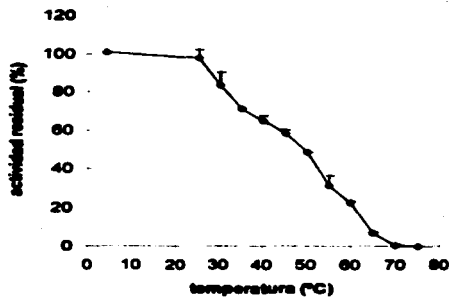


FIGURA 9. Estabilidad frente a la temperatura de la lipasa de *P.candidum*. La enzima se incubó sin sustrato durante 10 minutos en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6 a las temperaturas indicadas y luego se determinó su actividad en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 a 37°C, con el método de p-NFL. El 100 % de actividad corresponde a 384.35 $\mu\text{mol p-NFL}/\text{min}$.

son resistentes a la temperatura (más de 50°C). Se ha visto con otras lipasas fungales que esta inestabilidad puede estar relacionada con la labilidad de la enzima cuando no se encuentra en presencia de una interfase agua-sólido, esto se ha determinado por cristalografía de rayos-X en las lipasas de *Mucicola lanuginosa* y *Rhizopus delemar* (23).

Finalmente, hay que recalcar que los datos de estabilidad de la lipasa de *P.candidum* nos permiten saber que para realizar una purificación de la misma, es necesario manipularla en condiciones de refrigeración para evitar probables pérdidas de actividad.

6.4.2 Efecto del pH

Como en el caso de la temperatura, el pH también es una característica relevante para establecer condiciones óptimas de reacción de la enzima. Asimismo su estabilidad a diferentes valores de pH nos permite saber el pH al cual puede ser manejada la enzima sin tener pérdida de actividad.

Para la determinación del pH óptimo se utilizaron dos métodos: el de p-NFL y el método de emulsión con tributirina. Como puede verse en la figura 10 el pH óptimo de la enzima fue de 8.0. En cuanto a su estabilidad, se hicieron varios ensayos en un rango de pH de 4 a 9 usando amortiguador de acetato de pH 4 a 6 y amortiguador de fosfatos de pH 6 a 9. En la figura 11 se puede observar que la enzima fue estable en un intervalo de pH de 4 a 6 al incubarse durante 30 minutos a 37°C.

La mayoría de las lipasas de origen fungal presentan un pH óptimo entre 6-7 como ocurre con *Neurospora crassa* (54) y sólo algunas tienen un pH óptimo (pH_{opt}) mayor de 7 entre estas se encuentran una de *Geotrichum candidum* con pH_{opt} 8.5 (80), la lipasa de *Penicillium caseicola* con pH_{opt} 9 (2), la de *Penicillium expansum* con pH_{opt} 9 (78), la de *Rhizopus delemar* con pH_{opt} 8-8.5 (39) y la de *Fusarium* sp YM-30

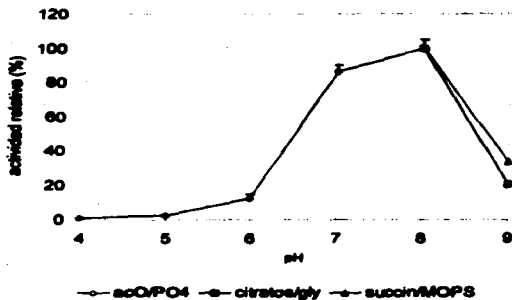


FIGURA 10. pH óptimo de la lipasa de *P. canaliculatus*. La actividad de lipasa se midió en los diferentes amortiguadores usando el método de emulsión para los sistemas citratos/glicina (citratos/gly) y para succinatos/MOPS (succin/MOPS); en el caso de acetatos/fosfatos (acO/PO₄) se usó el método de p-NFL. El 100 % de actividad corresponde a 339.13 $\mu\text{mol p-NFL}/\text{min}$.

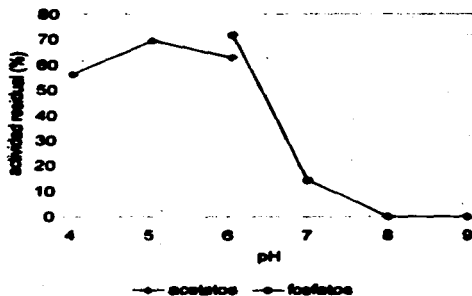


FIGURA 11. Estabilidad a pH de la enzima de *P.candidum*. La enzima se incubó sin sustrato durante 24 h a 37°C en cada uno de los amortiguadores a diferente pH y luego se midió su actividad en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 a 37°C empleando el método de p-NFL. El 100 % de actividad corresponde al control sin tratamiento (437.39 μ mol p-NFL/min).

con pHop 7-8 (64). También se ha reportado que una gran parte de las lipasas de hongos no estables a valores de pH menores a 7 ó entre 5 hasta 8 (tabla 10) sin embargo, los tiempos de incubación reportados son menores al probado en este trabajo (24 h).

En el caso de la cepa de *P.candidum* (FQ), también cultivada en medio líquido, se ha visto que el pH óptimo de su lipasa es de 9, una unidad de pH mayor que la enzima de nuestra cepa (1).

Cuando se hizo la determinación del pH óptimo de la lipasa de *P.candidum* cultivado en medio semisólido (Rivera, tesis en proceso), se realizaron ensayos en un rango de pH 4 a 6 en amortiguador de succinatos y de 6 a 9 en amortiguador de fosfatos y se observó que su pH óptimo era de 5.0 en amortiguador de succinatos y de 7-9 en amortiguador de fosfatos. Lo anterior difiere considerablemente de los resultados obtenidos en el presente trabajo usando medio líquido. Estas diferencias en el valor de pH óptimo posiblemente se encuentran relacionadas con la pureza de las preparaciones enzimáticas utilizadas en cada caso.

6.4.3 Efecto de iones metálicos y SDS sobre la actividad de la lipasa.

Muchas enzimas requieren de algún cofactor para llevar a cabo su acción catalítica. En el caso de las lipasas sólo se han reportado algunos ejemplos donde iones divalentes aumentan la actividad de estas enzimas. Para determinar este efecto se ensayó la actividad de lipasa utilizando sales monovalentes (K^+ y Na^+), las cuales no se ha reportado hasta la fecha que tengan algún efecto sobre la actividad. Se probaron también sales divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+}), las cuales pueden presentar diversos efectos, desde negativo pronunciado hasta efecto positivo dependiendo de la enzima. Además se probaron dos compuestos: EDTA y SDS, el primero con el fin de confirmar si la lipasa necesitaba alguno de los iones metálicos y el

SDS se usó para determinar la concentración a la cual la enzima se desnaturaliza con este detergente aniónico.

Como ya se mencionó anteriormente, para la determinación del efecto de metales se utilizó lipasa dializada (24 h contra amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6) y en los ensayos de actividad se utilizó amortiguador Tris 10 mM, pH 7.2.

Se observó efecto positivo sobre la actividad de la lipasa de *P.candidum* solamente con el ión calcio a concentración de 1 mM (fig.12) aunque como se ha reportado en otras lipasas, al incrementarse la concentración del ión (en este caso a 10 mM), se observó un efecto negativo si se compara con el efecto que éste ión tuvo en 1 mM.

Este tipo de efecto positivo con Ca^{2+} ha sido observado en varias lipasas microbianas excepto en las enzimas provenientes de *Rhizopus japonicus* (81), *Bacillus cinereus* (17) *Staphylococcus aureus* (3) y *Pseudomonas cepacia* (78), en las que este ión no tiene ningún efecto. En el caso de la lipasa de *P. olinum* se vió que por el contrario la adición de calcio ejercía una pronunciada inhibición sobre la enzima (80) y en *Bacillus subtilis* se ha visto un aumento en la actividad enzimática al adicionar EDTA (18). Por otro lado, en *Pseudomonas glumae* se ha identificado el sitio de unión a Ca^{2+} usando cristalografía de rayos-X. Basándose en estos resultados se ha sugerido que en ese caso el ión calcio interviene en el plegamiento de la enzima, pero no es esencial en la catálisis (85).

Al adicionar Fe^{2+} y Cu^{2+} a 1 y 10 mM se presentó un efecto negativo severo sobre la actividad de la enzima de *P. candidum*, ya que la actividad fue nula en el caso del Fe^{2+} y con Cu^{2+} fue de un 5-25%. Con Co^{2+} , Mn^{2+} y K^{+} sólo a concentración de 10 mM se observó efecto negativo, mientras que a 1 mM no se tuvo ningún efecto. Con Na^{+} , Mg^{2+} y Sr^{2+} no se vió ningún efecto significativo (figura12).



FIGURA 12. Efecto de iones metálicos, SDS y EDTA sobre la actividad de la lipasa de *P. canaliculatum*. Se incubó a la enzima con el ión o compuesto indicado durante el ensayo de actividad en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7.2 a 37°C y empleando el método de p-NFL. El 100 % de actividad corresponde a 102.61 $\mu\text{mol p-NFL/min}$.

Añadiendo SDS y EDTA se tuvo un efecto negativo en la actividad lipolítica cuando se encontraban a concentraciones de 10 mM. En el caso del SDS el efecto se debió probablemente a la desnaturalización de la proteína y en el caso del EDTA podría deberse a su unión a la enzima en forma de ligando causando su inactivación.

El efecto negativo de los iones Fe^{2+} y Cu^{2+} sobre la enzima de *P. candidum*, ya se había observado en otras lipasas fungales: *A. oryzae* (84), *H. lanuginosa* (43), *Fusarium* sp. YM-30 (84), *P. citrinum* (80) y *Beauveria bassiana* (40) y en bacterianas: *Pseudomonas cepacia* (79). En el caso de *B. bassiana* se ha demostrado que el ión Fe^{2+} se une a la lipasa inactivándola y que este efecto inhibitorio se revierte usando agentes quelantes como el EDTA.

Así también, en el caso de la cepa de *P. candidum* (FQ) se ha observado una marcada activación de la lipasa (200-250%), al adicionar Ca^{2+} al medio de reacción (5-10 mM respectivamente), lo cual no se observó del mismo modo en nuestro caso, ya que el estímulo fue de sólo un 20%. Estas diferencias pueden deberse al grado de pureza de cada preparación además de las diferencias entre cepas.

Rivera observó que la lipasa de *P. candidum* producida en medio semisólido (83), presentaba una conducta similar a la reportada en el presente trabajo, es decir hay una activación de la enzima con Ca^{2+} y una inhibición con Fe^{2+} . Sin embargo, también hubo un aumento de la actividad con los iones K^+ y Mg^{2+} (1mM), comportamiento que no presentó la lipasa producida en medio sumergido, la cual no se afecta por el Mg^{2+} y en la que el K^+ (10mM) baja su actividad.

6.4.4 Punto isoeléctrico de la lipasa.

El punto isoeléctrico de una enzima nos permite conocer el pH al cual su carga es cero y su solubilidad en agua es mínima. Este dato es importante para establecer

posteriormente una estrategia de purificación como lo es el uso de columnas de intercambio iónico.

En este caso el punto isoeléctrico de la lipasa se determinó mediante el uso del Phast System. Una vez corrido el gel se realizó el ensayo de actividad *in situ* y se encontraron 2 bandas de actividad correspondientes a pI de 5.35 y la otra a 5.5 (figura 13). Como se había observado solamente una banda en el gel de electroforesis se pensó que aparentemente había solo una lipasa; sin embargo, esta prueba nos indicaba la presencia de dos isoenzimas que probablemente tengan un peso molecular muy cercano, de ahí que sólo se haya visto una banda en los gels de electroforesis desnaturalizante.

Los puntos isoeléctricos que se han reportado para lipasas fúngicas son variados, hay ácidos como las de *A. niger* (pI 4.0), *G.candidum* (pI 4.56, 4.46) y *P.expansum* (pI 5.5); así como neutros como el de la lipasa de *Fusarium* sp. YM-30 (pI 7.20).

6.4.5 Glicosilación de la enzima.

En las lipasas fúngicas como en otras enzimas es común observar la presencia de enzimas muy semejantes que en la mayoría de las ocasiones sólo difieren en el grado y tipo de glicosilación dentro de la proteína. Con esta consideración, se determinó si la enzima se encontraba glicosilada usando un método de óxido-reducción que genera un compuesto colorido en caso de que la enzima se encuentre unida a carbohidratos (periyodato-Shift). En la figura 14 se observa que la prueba fue positiva para la banda de 29 kDa correspondiente a la lipasa mostrando que ésta se encuentra glicosilada. Sin embargo, el hecho de que la glicosilación sea la única diferencia entre las dos bandas de proteína con actividad lipolítica que se encontraron en el gel de electroforesis tendría que ser comprobado cortando los enlaces de carbohidrato (ensayo con enzima endo H), con esta prueba se podría conocer si realmente la

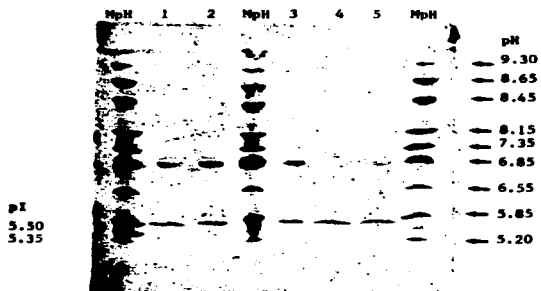


FIGURA 13. Gel de isoelectroenfoque. MpH: marcadores de pH, carriles 1, 2, 3, 4 y 5: muestras de filtrado concentrado. La placa de isoelectroenfoque utilizada tenía un gradiente de pH de 3 a 9, se corrió en el equipo Phast System (Pharmacia) durante 35 minutos y al final se tizó con azul de Coomassie.

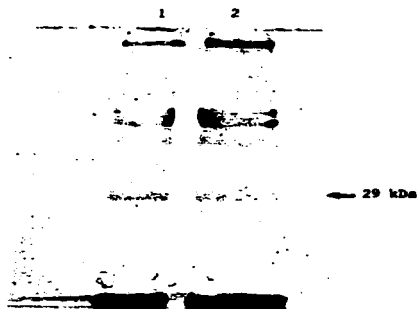


FIGURA 14. Gel de electroforesis de poliacrilamida al 12% corrido bajo condiciones desnaturalizantes. Carriles 1 y 2: muestras del filtrado original concentrado por liofilización. El gel se corrió a 30 mV durante 2 h y al terminar la corrida se reveló con reactivo de Schiff. Las bandas de proteína que se encuentran teñidas son aquellas que están glicosiladas, la intensidad de tinción indica si tiene más o menos grupos de carbohidrato unidos a la proteína.

diferencia entre ambas bandas se debe a glicosilación o a algún otro tipo de diferencia en la secuencia de aminoácidos de la enzima.

De manera general se ha visto que los estados de glicosilación hacen creer que existen dos o más enzimas diferentes cuando en realidad sólo hay una. Este tipo de conducta debida a la glicosilación había sido observado en lipasas provenientes de hongos levaduriformes como *Geotrichum candidum* (10, 74, 75, 89, 90) y *Candida cylindracea* (56, 57, 70). En el caso de *Candida rugosa* se creyó en un inicio que existían cuatro isoenzimas distintas, sin embargo al eliminar los grupos de carbohidrato se observó que en realidad sólo se trataba de una lipasa (14). Por lo general dentro del género *Penicillium* se presenta sólo una lipasa, a excepción de *P. camemberti* (46) y la cepa de *P. candidum* (FQ).

6.4.6 Especificidad por el sustrato

Una de las características de interés en las lipasas es su especificidad por sustrato, ya que el enfoque de su uso industrial depende de ello. De este modo, para determinar la especificidad de la lipasa de *P.candidum* se hicieron diversos ensayos utilizando sustratos con diferente longitud de cadena, ya sea mono, di o triacilgliceroles.

Cuando se probaron triacilgliceroles como sustrato se determinó que la lipasa de *P.candidum* hidrolizaba preferencialmente sustratos de cadena corta, mostrando su máxima actividad con tributirina (figura 15).

Este tipo de especificidad coincide con lo reportado para las lipasas de otros miembros de la especie *Penicillium* (*P.cyclospium* (44), *P.cassicozum* (2), *P.citrinum* (80) y *Penicillium* sp (36)). En este punto hay que mencionar que a diferencia de lo que ocurre con la especificidad de la lipasa, el mejor inductor de su producción en el medio de cultivo es el aceite de oliva, de entre cuyos componentes el ácido oleico parece ser el causante de esta inducción (24). Lo anterior coincide con el comportamiento de la

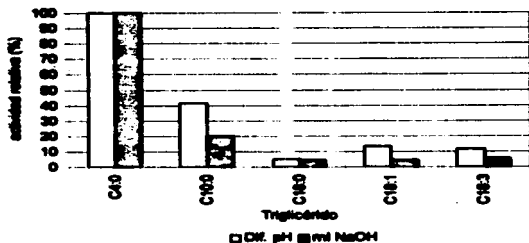


FIGURA 15. Preferencia de la lipasa de *P.candidum* hacia triacilglicérols con diferente longitud de cadena y número de insaturaciones. La enzima se incubó en presencia del sustrato triacilglicérol con aceites de la longitud indicada en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8 a 37°C y la actividad se determinó por el método de emulsión midiendo cambio de pH (Dif. pH) y mediante valoración con NaOH (ml NaOH). La nomenclatura de los triacilglicérols indica el número de carbonos y el número de insaturaciones en los ácidos grasos que lo componen, así, C4:0 significa que los ácidos grasos del triacilglicérol son de cuatro carbonos y sin insaturaciones.

lipasa de *P.citrinum* el cual también tiene como mejor inductor de la producción el aceite de oliva y su lipasa tiene una mayor actividad con la tributina (80).

Por otro lado, en cuanto a su especificidad por mono, di o triacilglicérolas, la lipasa mostró preferencia hacia los triacilglicérolas, con una baja actividad con los mono y diacilglicérolas, los cuales fueron degradados en un 7-12% en comparación con su mejor sustrato: la tributina (figura 16 y 17). Esto es poco común ya que generalmente las lipasas del género *Penicillium* degradan de manera inespecífica mono, di y triacilglicérolas, a excepción de otro caso reportado: la lipasa de *P.camemberti* que hidroliza principalmente mono y diacilglicérolas. Lo anterior nos haría pensar en que las especificidades tanto de *P.candidum* como de *P.camemberti* son de algún modo complementarias, ya que ambos se utilizan en la industria alimentaria para la elaboración de queso Camemberti, un queso suave con alto grado de lipólisis.

En la figura 16 se puede observar que la enzima de *P.candidum* presenta aparentemente mayor afinidad por los ácidos grasos con insaturaciones, este comportamiento sin embargo no se repite del todo cuando se compara con la figura 15 en donde los triacilglicérolas con mayor número de insaturaciones no mostraron una gran diferencia en la actividad lipolítica.

Las lipasas de la cepa de *P.candidum* (FQ) muestran una mayor preferencia por tributina que por trioleína. Sin embargo, en el caso de esa enzima la trioleína se hidroliza un 40% respecto a tributina, mientras que en el caso de nuestra enzima sólo hidroliza 5% de trioleína (también respecto a tributina). Lo anterior nos indica que la cepa de la Facultad de Química produce lipasas con características diferentes a la nuestra, lo que se puede notar en otras observaciones descritas en este trabajo.

6.5 Discusión final.

Aunque por estudios previos en el laboratorio pensábamos que nuestra cepa de *P. candidum* sólo producía una lipasa (20, 24), al hacer un análisis con

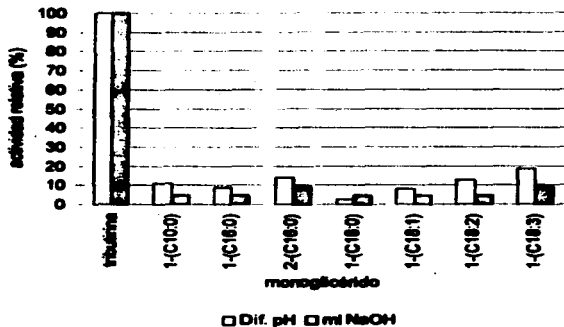


FIGURA 18. Preferencia de la lipasa de *P.candidum* hacia monoacilglicerol con diferente longitud de cadena y número de insaturaciones. La enzima se incubó en presencia del sustrato monoacilglicerol con acidos de la longitud indicada, en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8 a 37°C y la actividad se determinó por el método de emulsión midiendo cambio de pH (Dif. pH) y mediante valoración con NaOH (ml NaOH).

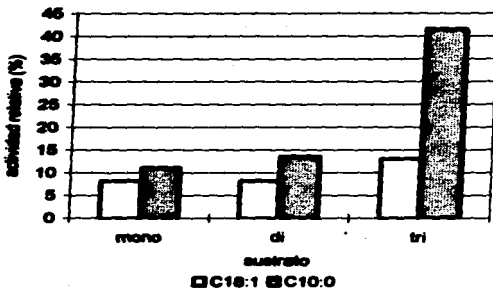


FIGURA 17. Especificidad de la lipasa de *P.candidum* hacia mono, di o triacilglicérolas. La enzima se incubó en presencia del sustrato mono, di o triacilglicérol con ácidos de la longitud indicada, en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8 a 37°C y la actividad se determinó con el método de emulsión mediante valoración con NaOH. El porcentaje de actividad lipolítica está referido a la actividad de la enzima hacia tributirina (100%).

isoelectroenfoco encontramos que en realidad el hongo produce dos enzimas, una de pI 5.50 que bajo nuestras condiciones de cultivo es la mayoría y otra de menor concentración con pI de 5.35.

Por lo tanto, las características bioquímicas que se determinaron en este trabajo pertenecen a las dos enzimas en conjunto, aunque probablemente el comportamiento general en la caracterización se deba predominantemente a la enzima mayoritaria (pI 5.5), aunque esto debe ser evaluado experimentalmente con más detalle.

El hecho de tener dos enzimas durante la caracterización nos permite entender el comportamiento de las gráficas en algunas determinaciones. Un ejemplo de lo anterior es la temperatura óptima del ensayo de lipasa (figura 8) en donde se observa un amplio rango de temperatura óptima, así como un comportamiento anómalo en la gráfica de la ecuación de Arrhenius, conducta característica que se presenta cuando hay dos actividades dentro de una misma reacción. Asimismo pudimos observar un rango bastante amplio en la estabilidad a pH (pH 4 a 6) lo cual nos podría indicar que hay dos enzimas con su estabilidad a pH traslapada (figura 9).

También en la determinación de especificidad por sustrato observamos que en ocasiones las especificidades son contradictorias, como sucede en el caso de los sustratos con diferente número de insaturaciones. En la figura 15 se puede notar que cuando aumenta el número de dobles enlaces de cero a uno hay mayor actividad (C18:0 a C18:1) sin embargo, de C18:1 a C18:3 sucede lo contrario y baja su actividad. Por el contrario, con los monoácilgliceroles si se nota un ligero aumento de actividad al incrementarse el número de dobles enlaces (figura 16). De este modo, considerando que cuando se determinó la especificidad por sustrato estaban presentes ambas enzimas, podemos considerar que probablemente tuvimos un traslape de especificidades.

Por otra parte, se considera importante determinar si estas dos enzimas son solamente isoformas de una misma lipasa o si en realidad se trata de isoenzimas. Lo

que parece apoyar la teoría de que son isoformas es el hecho de que se encontró que la banda de 29 kDa está glicosilada (figura 14), pero como se dijo antes habría que demostrarlo experimentalmente.

Una de las maneras de demostrar si son o no isoenzimas, es la purificación de ambas actividades. Con este trabajo se tienen bases para hacerlo, ya que se determinaron características importantes para la purificación como son el peso molecular (para hacer seguimiento de la proteína durante la purificación), la estabilidad a pH y temperatura (lo cual es necesario para reducir al mínimo las pérdidas en actividad) y el punto isoelectrónico (para establecer el uso de columnas de intercambio iónico).

7. CONCLUSIONES

- Se descartó la idea de que *Penicillium candidum* tuviera sólo una lipasa, ya que se resolvieron dos bandas con actividad lipolítica en los gels de isoelectroenfoque. Probablemente estas enzimas sean isoformas debido a diferentes estados de glicosilación como se ha reportado para otros hongos.
- Las características bioquímicas obtenidas en este trabajo pueden utilizarse para plantear un método de purificación de las lipasas del hongo disminuyendo al mínimo la pérdida de su actividad.
- Las condiciones óptimas de reacción de las lipasas de *P.candidum* nos sugieren que podrían usarse como ingredientes en la formulación de detergentes, productos que requieren de lipasas alcalinas. Su inestabilidad a esos valores de pH podría reducirse utilizando la microencapsulación.
- La especificidad por el sustrato de las lipasas de *P.candidum* es idónea para su uso en la elaboración de lipolizados con sabor a queso, ya que las enzimas prefieren sustratos de cadena corta liberando ácidos grasos que imparten sabores suaves y agradables a los productos lácteos.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, M.L.; Ferrás, A.; Trujo, B. y E. Martínez (1988) Comparación entre lipasas de *Penicillium caseicola* y *Penicillium candidum*. VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Ixtapa Gro. México.
2. Alhr, S., Markakis, P. and Ramesh C. Chandan (1980) Lipase of *Penicillium caseicola*. J. Agric. Food Chem. 38: 598-601.
3. Antonian, E. (1988) Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. Lipids 23(12):1101-8.
4. Arbige, M.V. and W.H. Pitcher (1988) Industrial enzymology: a look towards the future. TIBTECH 7:330-5.
5. Arbige, M.V.; Freund, P.R.; Silver, C.S.; Zelko, S.T. (1988) Novel lipase for Cheddar cheese flavor development. Food. Technol. 23: 91-98.
6. Arnold, R.G., Shahani, K.M. and Deived, D.K. (1974) Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci. 58(8): 1127-43.
7. Asahara, T., Matori, M., Ikemoto, M. and Y. Ota (1993) Production of two types of lipases with opposite positional specificity by *Geotrichum* sp. FO401B. Biocel. Biotech. Biochem. 57(3): 390-4.
8. Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1993) Current protocols in molecular biology. Vol. 1 y 2. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons.
9. Ballargeon, M.W. and P.E. Sonnet (1991) Selective lipid hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase. Biotech. Lett. 13(12): 871-4.
10. Bertolini, M.C., Laramée, L., Thomas, D. Y., Cygler, M. Schrag, J.D. and T. Vernet (1994) Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. Eur. J. Biochem. 219: 119-25.
11. Berger, M.; Laumen, K.; Schneider, M.P. (1992) Enzymatic esterification of glycerol. I. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols. J. Am. Oil Chem. Soc., 69(10): 955-960.
12. Björklind, F.; Sven, E.G.; Kirk, O. (1991) The future impact of industrial lipases. TIBTECH 9: 360-363.
13. Celerin, E.M.; Fergus, C. L. (1971) Effects of nutrients, temperature and relative humidity on germination and longevity of the spores of *Cheemium thermophile* var. *coprophile*. Mycologia, 63: 1030-1045.

14. Cheng, R. C., Chou, S.-J. and J-F Shaw (1994) Multiple forms and functions of *Candida rugosa* lipase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19: 93-7.
15. Chaplin, M.F. and C. Bucke (1990) *Enzyme technology*. Cambridge University Press, Cape, 12 y 7.
16. Charton, E. and A. R. Macrae (1982) Substrate specificities of lipases A and B from *Geotrichum candidum* CMI/CC 336426. *Biochim. Biophys. Acta* 1123: 68-64.
17. Comménil, P., Salingheri, L., Sanchote, M. and B. Dohortier (1995) Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Sorbylia cinerea*. *Lipids* 30(4): 351-8.
18. Dertois, V.; Coppée, J.-Y.; Colson, D.; Baulard, A. (1994) Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(5): 1670-1673.
19. De Caro, J., Ferrato, F., Verger, R. and Alain De Caro (1986) Purification and molecular characterization of lamb pregastric lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1252: 321-9.
20. De la Torre, M.E., Díaz, A., Ruiz, B., Ferrás, A., Arámburo, C. and S. Sánchez (1999) Physiology of lipase formation in *Penicillium candidum*. *J. Ind. Microbiol.* 17: 73-8.
21. Derewenda, U.; Brzozowski, A.M.; Lawson, D.M.; Derewenda, Z.S. (1992) Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochem.*, 31: 1532-1541.
22. Derewenda, V., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joeger, R., Haas, M.J. & Z.S. Derewenda. (1994) Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Prot. Eng.* 7: 561-7.
23. Derewenda, V., Swenson, L., Wei, Y., Green, R., Kobos, P.M., Joeger, R., Haas, M.J. & Z.S. Derewenda. (1994) Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *J. Lipid Res.* 35: 524-34.
24. Diaz, A.A. (1991) Lipase: Estudio sobre su síntesis en *Penicillium candidum* (tesis de maestría) U.N.A.M., CCH.
25. Dordick, J.S. (1996) Enzymatic catalysis in monophasic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 194-211.

26. Dziezak, J. (1988) Enzyme modification of dairy products. *Food Technol.* 44: 114-120.
27. Espinosa, E.; Nurko, E.; Orozco, M.E.; Ferrás, A. (1988) Enzimas lipolíticas de origen microbiano: propiedades y usos. *Boletín de Educación Bioquímica*, 8(1): 3-10.
28. Feller, G.; Thiry, M.; Arpigny, J.L.; Gerday, C. (1991) Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain Moraxella TA144. *Gene*, 102: 111-115.
29. Fischer, S.E.; Kleber, H.P. (1987) Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 09 V. *J. Basic Microbiol.* 27(8): 427-32.
30. Flågerstad, R., Nui, M. and F. O'Garra (1991) Significance of genetic engineering to food enzymology. In *Food Enzymology*. P.F. Fox (Ed.) Vol. II cap. 30: 343-363.
31. Franken, L.G.; Meerten, R.E.; Batenburg, A.M., Bos, J.W.; Visser, C.; Verrips, T. (1992) Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(12): 3787-3791.
32. Gerold-Collis, P.; Sanz, B.; Garcia, M.L.; Ordóñez, J.A. (1998) Heat stability of the extracellular lipase from a *Pseudomonas* strain isolated from refrigerated raw milk. *Microbiologia*, 4(2): 125-8.
33. Gargouri, Y., Moreau, H. and R. Verger (1989) Gastric lipase: biochemical and physiological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1008: 255-271.
34. Gilbert, J.E. (1993) *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 634-645.
35. Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Bouthier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B. and M. Cygler (1993) Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268(17): 12843-12847.
36. Gulomova, K.; Ziomak, E. Schrag, J.D. Davranov, K., Cygler, M. (1996) Purification and characterization of a *Penicillium* sp which discriminates against diglycerides. *Lipids* 31: 379-84.
37. Handelman, T.; Shoham, Y. (1994) Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 40: 435-443.

36. Haas, M.J.; Allen, J.; Serks, R.T. (1991) Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding a lipase from *Rhizopus delemar*. *Gene*, 109: 107-113.
39. Haas, M.J., Cichowicz, D. J. and D.G. Bailey (1992) Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids* 27(8): 571-5.
40. Hegedus, D.D. & Kachatsourians, G.G. (1988) Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Lett.* 10(9): 637-42.
41. Höfelmann, M.; Hartmann, J.; Zink, A.; Schreier, P. (1986) Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. Food Sci.*, 50: 1721-1725.
42. Høge-Jensen, B.; Andreassen, F.; Christensen, M.; Thim, L. and Esper Boel (1989) *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*. *Lipids*, 24(9): 781-5.
43. Ibrahim, C.O., Hayashi, M., Nagai, S. (1987) Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* #3. *Agric. Biol. Chem.* 51(1): 37-45.
44. Isobe, K. Akiba, T. and Shotaro Yamaguchi (1986) Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cycloptum*. *Agric. Biol. Chem.* 52 (1): 41-7.
45. Isobe, K. and K. Nokihara (1993) Primary structure determination of mono- and diacylglycerol lipase from *Penicillium camemberti*. *FEBS Lett.* 320: 101-106.
46. Isobe, K., Nokihara, K., Yamaguchi, S., Mase, T., Schmid, R.D. (1992) Crystallization and characterization of monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *Penicillium camemberti*. *Eur. J. Biochem.* 203: 233-7.
47. Jacobsen, T. and O.M- Poulsen (1991) Separation and characterization of 61- and 57- kDa lipases from *Geotrichum candidum* ATCC 6652. *Can. J. Microbiol.* 38: 75-80.
48. Jacobsen, T. and O.M- Poulsen (1986) Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1257: 96-102.
49. Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvel, V.M.; Missel, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microb. Rev.* 15: 129-163.
50. Johnson, L.A.; Ifor, R.B.; MacRae, I.C.; Free, M.L. (1992) Degradation of triglyceride by a *Pseudomonad* isolated from milk: Molecular analysis of a

- lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(5): 1776-1779.
51. Kawasaki, L.; Ferrás, A. & J. Aguirre (1995) *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Experimental Mycology* 19: 81-85.
52. Kilera, A. (1985) Enzyme-modified lipid food ingredients. *Process Biochem.* 120: 35-45.
53. Kouker, G.; Jaeger, K. -E. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(1): 211-213.
54. Kundu, M. Basu, J., Guchail, M. and P. Chakrabarti (1987) Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microb.* 133: 149-153.
55. Laemmli, V.K. (1970) Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
56. Longhi, S.; Fusetti, F.; Grandori, R.; Lotti, M.; Vanoni, M.; Alberghina, L. (1992) Cloning and nucleotide sequences of two lipase genes from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1131: 227-232.
57. Lotti, M.; Grandori, R.; Fusetti, F.; Longhi, S.; Brocca, S.; Tramontano, A.; Alberghina, L. (1993) Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene*, 124: 45-55.
58. Macrae, A.R. (1983) Extracellular microbial lipases. In *Microbial enzymes and biotechnology*. Ed. by Fogarty, W.M. pp 225-247. Applied Science Publishers.
59. Macrae, A.R. (1989) The versatility of lipases for industrial uses. *Trends Biochem. Sci.* 14(4): 125-126.
60. Mollazewska, Y. and Przemyslaw Mastalerz (1992) Production and some properties from *Penicillium citrinum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 190-3.
61. Margolin, A.L.; Klibanov, A.M. (1987) Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 3802-3804.
62. Marinelle, M.; Holmquist, M. and K. Hult (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1258: 272-276.
63. Martínez, C.; Nicolas, A.; van Tilbeurgh, H. Egloff, M-P. Cudrey, C.; Verger, R.; Cambillau, C. (1994) Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochem.* 33: 83-89.

64. Mase, T., Matsumiya, Y. and T. Akiba (1985) Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium* sp YM-30. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(9): 1771-2.
65. Montero, S.; Blanco, A.; Virto, M.D.; Landeta, L.C.; Agud, I.; Solozabel, R.; Lacaray, J.M.; de Renobales, M.; Llana, M.J.; Serra, J.L. (1993) Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 15(3): 239-247.
66. Pérez, C.; Juárez, K.; García-Castells, E.; Boberón, G.; Servín, L. (1993) Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 68 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11. *Gene*, 123: 109-114.
67. Posorske, L.K. (1984) Industrial scale application of enzymes to the fats and oil industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61(11): 1758-1766.
68. Ransac, S.; Rivière, C.; Soulié, J.M.; Genot, C.; Vergar, R. and G.H. de Haes (1990) Competitive inhibition of lipolytic enzymes. I. A kinetic model applicable to water-insoluble competitive inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 1043: 67-68.
69. Rick, W.; Hockeborn, M. (1984) Catalytic activity of serum lipase during continuous temperature-dependent titrimetry. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22(5): 357-70.
70. Rúa, M.L., Díaz-Mauriño, T., Fernández, V.M., Otero, C. and A. Ballesteros (1993) Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 191-9.
71. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition, vol. 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Usa.
72. Schmidt-Dannert, C., Rúa, M.L., Atomi, H. and R.D. Schmid (1996) Thermoalkaliphilic lipase of *Bacillus Thermocalenulatus*. 1. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1301: 105-14.
73. Schrag, J.D.; Li, Y.; Wu, S.; Cygler, M. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351: 761-764.
74. Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tomiyaga, Y.; Izumi, T.; Tsunawawa, S. (1989) cDNA molecular cloning of *Geotrichum candidum* lipase. *J. Biochem.*, 106: 383-389.

75. Shimada, Y.; Sugihara, A.; Izumi, T.; Tomimaga, Y. (1990) cDNA cloning and characterization of *Geotrichum candidum* lipase II. *J. Biochem.*, 107: 703-707.
76. Sidebottom, C., Charlton, E., Dunn, P.P.J., Mycock, G., Davies, C., Sutton, J.L., Macrae, A.R. and A. R. Sibas. (1991) *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 202: 485-91.
77. Sonnet, P.E. (1988) Lipase selectivities. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65(6): 900-904.
78. Stöcklein, W., Sztajer, H., Menge, U. and R.D. Schmid (1993) Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1168: 181-189.
79. Sugihara, A., Meeahiko, U., Shimada, Y., Tsunasewa, S. and Y. Tomimaga (1992) Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepecia*. *J. Biochem.* 112: 598-603.
80. Sugihara, A., Shimada, Y. and Y. Tomimaga (1990) Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *J. Biochem.* 107: 426-30.
81. Suzuki, M., Yamamoto, H. and M. Mizugaki (1986) Purification and general properties of a metal-insensitive lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400. *J. Biochem.* 100: 1207-13.
82. Svendsen, A., Borch, K., Barfoed, M., Nielsen, T.B., Gormsen, E. and S.A. Petkar (1995) Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim. Biophys. Acta* 1259: 9-17.
83. Svensson, I., Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. (1992) Lipase-catalyzed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(10): 986-991.
84. Sztajer, H., Lünsdorf, H., Erdmann, H., Menge, U. and R. D. Schmid. (1992) Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 253-261.
85. Talpa, M.A., Liebeton, K.; Costa, J.V., Cabral, J.M.S. and K. Jaeger (1995) Lipase from *Chromobacterium viscosum*: biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1256: 396-402.
86. Tan, Y.; Miller, K.J. (1992) Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(4): 1402-1407.

87. Tinoco, J.R. (1989) Producción de lipases microbianas en un sistema de fermentación semisólida. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias.
88. Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Ohnishi, K. and J. Sekiguchi (1986) Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(7): 1199-1203.
89. Veeraragavan, K., Colpitts, T. and B.F. Gibbs (1980) Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1044: 26-33.
90. Vernet, T.; Ziomek, E.; Recktenwald, A.; Schrag, J.D.; Montigny, C. de.; Tessier, D.C.; Thomas, D. Y.; Cygler, M. (1983) Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. *J. Biol. Chem.*, 258(35): 26212-26218.
91. Wasserman, B.P. (1988) Food biotechnology. *Food Technol.*, 38(2): 66-77.
92. Yamaguchi, S.; Mase, T. and Takauchi, K. (1991) Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camemberti* U-150. *Gene*, 103:61-67.
93. Zaks, A.; Empie, M.; Gross, A. (1988) Potentially commercial enzymatic processes for the fine and specialty chemical industries. *Trends Biotechnol.*, 6: 272-275.
94. Zygmunt, S., Derewenda, Z. S. and A.M. Sharp (1983) News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *TIBS* 18: 20-5.

9. Anexo

Determinaciones de concentración de proteínas, mediante el uso del densitómetro CAMAG Scanner

C A S I S Evaluation program
Available to the user for research under demonstration
and limits of 70 characters each.

TLC/PTLC Integration (OMSB NUMBER II 02.14 / PC / CRTS Version - 2.13)

Muestra después de la precipitación con sulfato de amonio

Calibr. table Calibration table, created :
File name : HET7.D 6/25/79 10:04:00
Scan User name while scanning :
File name : HET73 26/09/79 17:28:30
Integration User while integrating :
File name : HET73 26/09/79 17:28:54

Analytical and chromatographic conditions:
Analysis :TLC-Preferaisle de proteinas capelli 2
Plate material :
Solvent :
Application mode :
Development mode :

Scanner settings:
Plate size : 25x25
Start position X : 111.9 mm
Start position Y : 4.4 mm
Y-position for 0 adjustment: 4.4 mm
Application pos. Y : 14.0 mm
Rad of track : 60.0 mm
Distance between tracks : 5.0 mm
Number of tracks : 1
Position of solvent front : 64.0 mm
Scanning speed : 4.0 cm/s
Lamp : Mercury
Wave-length : 660 nm
SWS : 194
STW : 9
OFFSET : 15 mm
Absorbance/fluorescence : abs
Reflection/transmission : reT
0 adjustment for each track: 00

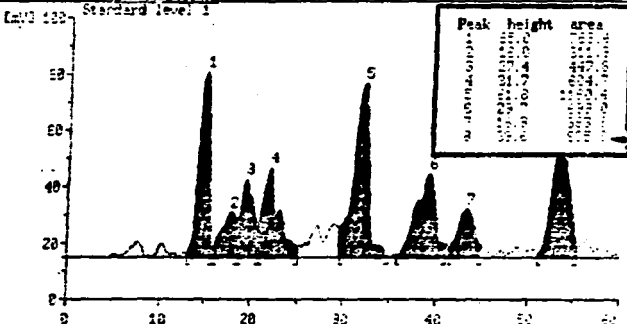
Microprocessor bandwidth : 10 ms
Slit width : 4
Slit length : 4
Cuvette micro/macro : micro
Waler (measured) : 0.672 gV

Integration parameters:
 Wide integration : no
 Baseline correction : yes
 Peak threshold height : 10 µV
 Peak threshold area : 50
 Peak threshold slope : 5
 Filter factor : 3
 Data selection factor : 1
 Track start position : 4.3 mm
 Track end position : 60.0 mm

Track 1, Standard level 1

Peak	start		end		area			
	mm	b	mm	b	µV	µV		
1	13.1	1.4	15.0	00.0	21.56	13.8	2.9	
2	15.0	2.0	17.0	16.0	9.56	10.6	13.0	
3	19.0	19.0	19.5	27.4	9.56	20.9	12.5	
4	20.9	12.5	22.1	31.7	11.00	23.1	9.9	
5	22.7	10.4	23.2	61.0	21.43	34.9	0.9	
6	26.8	0.0	28.3	20.7	10.21	41.1	4.0	
7	41.5	1.0	43.4	15.9	9.68	45.0	4.0	
8	51.1	1.4	53.5	29.6	13.76	53.5	2.7	
Total height =			220.1			total area = 821.0		

Calibration M: BET-3
 Method Scan: Standard level 1
 Calibration Data File: 26/JUN/1997 17:27



Model no: 600 mm
 Track: 1, noise level: 0.025µV, raw data file: BET-3
 Version: 3.13
 DATE: SEP-1997 (c) 1991
 00000000 11:00:04

C A S I G Evaluation program
Available to the user for report header documentation
the lines of 70 characters each.

TELETYPE Integration of CASIG SCANNER II (V3.11 / PC / CASI Version - 3.13)

Filtrado concentrado por ultracentrifugación

Calibr. Date Calibration table created :
File name : HRT1.D 6/03/78 10:44:00
Run Run name while scanning :
File name : HRT1A 26/08/77 17:00:42
Integration Run name while integrating :
File name : HRT1.D 26/08/77 17:00:54

Analytical and chromatographic conditions:

Analysis :
Plate material :
Solvent :
Application mode :
Development mode :

Scanner settings:
Plate size : 25x10
Start position X : 53.0 mm
Start position Y : 4.4 mm
Y-position for 0 adjustment: 4.4 mm
Application pos. Y : 15.6 mm
End of track : 67.0 mm
Distance between tracks : 5.6 mm
Number of tracks : 1
Position of solvent front : 65.0 mm
Scanning speed : 4.0 mm/s
Lamp : Mercury
Wavelength : 800 nm
SWS : 100
SPSS : 7
OFFSET : 10 S
Absorbance/fluorescence : abs
Reflection/transmission : refl
G adjustment for each track: pos

Monochromator bandwidth : 10 nm
Slit width : 4
Slit length : 4
Optical microscope : micro
Size measured : 0.023 mm

Integration parameters:
 Video integration : no
 Baseline correction : yes
 Peak threshold height : 10.00
 Peak threshold area : 50
 Peak threshold slope : 3
 Filter factor : 3
 Data selection factor : 1
 Track start position : 4.4 cm
 Track end position : 62.0 cm

Track 1, Standard level 1

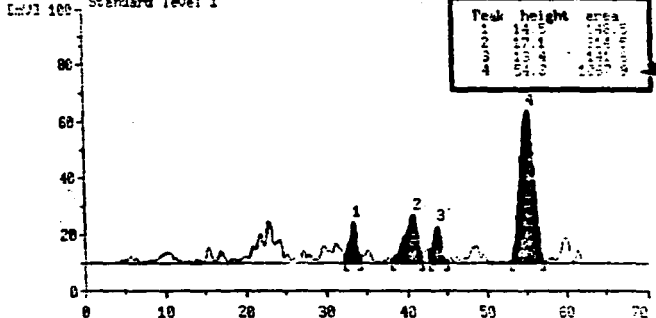
Peak	start	end	area	height	width	area	height
0	0	0	0	0	0	0	0
1	32.6	37.7	22.6	14.5	14.61	24.4	2.4
2	38.1	43.2	49.9	17.1	17.18	42.9	3.4
3	43.9	49.0	13.4	13.13	13.13	45.2	0.7
4	53.1	58.2	146.4	14.28	14.28	147.3	9.4
Total height		= 80.3		total area		= 1875.6	

Calibration IN: EETV4

28/07/1997 10:13

Method Scan Integration Calibration Data ETC

Standard level 1



Wavelength: 600 nm

Track: 1, noise level: 0.08100, raw data file: EETV4

Version - 3.13

CWMS SOFTWARE (c) 1991

SCANNER : II 03.14