



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa**

PURIFICACION PARCIAL DE UNA LIPASA FÚNGICA

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

SARA GONZÁLEZ TERÁN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN

LECTOR: DR. FRANCISCO JOSE FERNÁNDEZ PERRINO

DICIEMBRE 2010

RESUMEN

Las lipasas son biocatalizadores ampliamente usados en diversas ramas industriales así como en el sector salud debido a su gran variedad catalítica entre las que se le atribuyen esterificación, transesterificación, acidólisis, alcoholólisis y aminólisis.

Dada su importancia, es el interés de producirlas y obtener de ellas sus mejores cualidades catalíticas para el fin particular que se persiga, de esta forma también se hace importante la caracterización de estas enzimas.

El objetivo de este trabajo fue producir, purificar y caracterizar parcialmente una lipasa fúngica extracelular. Para la producción fue utilizado el microorganismo *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* por fermentación en medio sólido, al extracto lipolítico obtenido fue sometido a dos métodos de concentración preparativa, precipitación fraccionada con sulfato de amonio y ultrafiltración con dos cortes moleculares 30 kDa y 10 kDa con el fin de determinar cual daba el mayor factor de purificación y rendimiento, posterior a la selección del método de concentración se continuo con la metodología de purificación utilizando dos protocolos de separación de proteína. El protocolo 1 consistió en la concentración del extracto por ultrafiltración con corte molecular de 10 kDa, el retenido resultante fue aplicado a una cromatografía de interacción hidrofóbica, las fracciones recuperadas con actividad lipolítica fueron sometidas a una cromatografía de intercambio aniónico. El protocolo 2 consistió en la concentración por ultrafiltración con membrana de 10 kDa, un paso

de cromatografía de intercambio aniónico y un paso de cromatografía de intercambio catiónico. El protocolo 2 fue el que proporciono mejores resultados por lo que la lipasa parcialmente purificada obtenida fue la que se utilizo para la caracterización parcial, que consistió en determinar la temperatura y pH óptimos de actividad lipolítica.

La técnica de electroforesis fue empleada para observar el grado de avance del método de purificación.

Se analizaron diferentes métodos para la determinación de actividad lipolítica entre los que se encuentran los métodos espectrofotométricos oleato de cobre, cinética de hidrólisis de p-nitrofenil palmitato e hidrólisis de p-nitrofenil octanoato y el método de titulación pHstat, con el fin de seleccionar el más exacto, preciso, sensible y seguro.

Fue analizada la afinidad por sustrato comparando los sustratos p-nitrofenil palmitato y p-nitrofenil octanoato y el efecto del uso de triton-X100.

Como resultados se obtuvo una mejor resolución con el protocolo 2 de purificación del cual se desprenden un factor de purificación de 6.0 veces, con un rendimiento de recuperación de 4.68 %, la lipasa obtenida tiene mayor afinidad por p-nitrofenil octanoato y el uso de triton-X100 0.0012 % p/v favorece en un 28 % la actividad lipolítica.

Con respecto a la caracterización, la enzima parcialmente purificada tiene un pH óptimo de 7.0 y una temperatura óptima de 40 °C.

ÍNDICE

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Producción de lipasas.	3
2.1.1. Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido.....	4
2.1.2. Microorganismos utilizados en la producción de lipasas.....	6
2.1.3. Medios de cultivo utilizados en la producción de lipasas	11
2.2. Métodos de extracción de lipasas	14
2.3. Purificación de lipasas	16
2.4. Determinación de actividad lipasa	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL.....	26
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. METODOLOGÍA	27
7.1. Microorganismo	27
7.1.1. Conservación del inóculo.....	27
7.1.2. Propagación de esporas.....	28
7.1.3. Cosecha de esporas	28
7.1.4. Conteo de esporas	28
7.2. Preparación del soporte	28
7.3. Preparación del medio de fermentación	29

7.4. Fermentación en medio sólido (FMS)	29
7.5. Conservación de materia fermentada	29
7.6. Métodos de concentración preparativa	30
7.6.1. Precipitación fraccionada	30
7.6.2. Ultrafiltración	31
7.7. Purificación parcial	31
7.7.1. Protocolo 1	31
7.7.2. Protocolo 2	32
7.8. Técnicas analíticas	33
7.8.1. Determinación de proteína	33
7.8.2. Determinación de actividad lipasa	33
7.8.2.1. Métodos espectrofotométricos	33
7.8.2.1.1. Oleato de cobre	34
7.8.2.1.2. Cinética de hidrolisis de p-nitrofenil palmitato (p-NPP)	36
7.8.2.1.3. Hidrólisis de p-nitrofenil octanoato (p-NPO)	37
7.8.2.2. Método de titulación: hidrólisis enzimática de tributirina (pHstat)	38
7.8.3. Perfil de temperatura y pH óptimos	39
7.8.4. Electroforesis SDS PAGE	40
8. RESULTADOS Y DISCUSION	40
8.1. Fermentación en medio sólido	40
8.1.1. Conservación de materia fermentada	41
8.1.2. Determinación de actividad de la materia sólida fermentada (msf)	43
8.2. Extracción de lipasa extracelular	45
8.3. Comparación de métodos de concentración preparativa	45
8.4. Purificación parcial	51

8.4.1. Protocolo 1.....	51
8.4.2. Protocolo 2.....	52
8.5. Determinación de actividad lipasa	55
8.5.1. Selección del método de determinación de actividad lipasa	55
8.5.2. Tipo de sustrato lipolítico y uso de Triton X-100	56
8.5.3. Perfil de temperatura y pH óptimos.....	57
8.6. Efecto del tiempo de diálisis en la determinación de actividad lipasa	58
9. CONCLUSIONES	59
10. RECOMENDACIONES	61
11. BIBLIOGRAFÍA	62

ANEXOS

Anexo 1. Producción de lipasa	83
Anexo 2. Curva estándar de albúmina bovina sérica (BSA)	84
Anexo 3. Curva estándar de ácido oleico	85
Anexo 4. Curva estándar de p-nitrofenol (p-NP) utilizada en el método p-NPP.....	87
Anexo 5. Curva estándar de p-nitrofenol (p-NP) utilizada en el método p-NPO.	89
Anexo 6. Fermentación en medio sólido.	91
Anexo 7. Tipo de sustrato lipolítico y uso de triton X-100	92
Anexo 8. Efecto del tiempo de diálisis	93

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas, o enzimas lipolíticas (triacilglicerol ester hidrolasas EC 3.1.1.3), catalizan la hidrólisis de triglicéridos (Fig. 1) en la interfase aceite-agua y son estables en solventes orgánicos (Rohit *et al.* 2001).

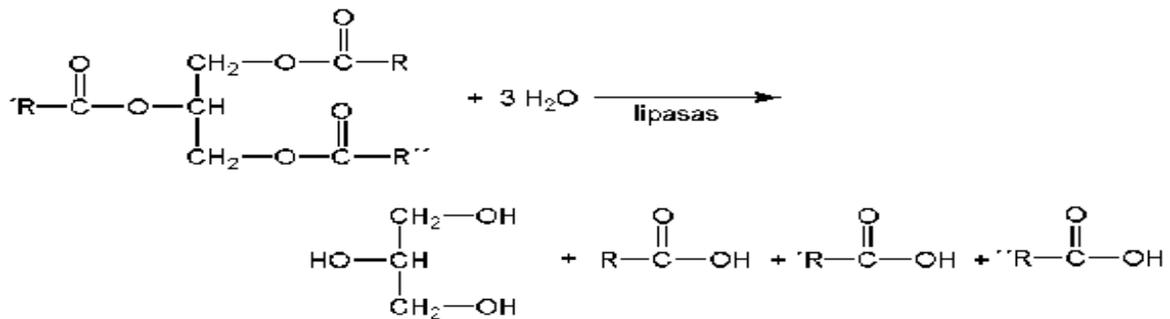


Figura 1. Hidrólisis de triglicéridos.

Las lipasas constituyen uno de los grupos más importantes de biocatalizadores con aplicación biotecnológica, con éxito en la síntesis de biopolímeros, biodiesel, agroquímica, en la elaboración de detergentes, cosméticos y confitería. También se usan en la producción de enantiómeros farmacéuticos para terapia médica de reemplazo, como por ejemplo en la administración de lipasa pancreática de cerdo en casos de insuficiencia pancreática exocrina (Schmid *et al.* 1998).

La mayoría de las lipasas microbianas son extracelulares y, usualmente, las células se descartan después de la fermentación tras centrifugación o filtración. Para concentrar el extracto enzimático se puede ultrafiltrar, precipitar con sulfato de amonio o extraer con solventes orgánicos. Como técnica de purificación,

generalmente se emplea la combinación de varios métodos cromatográficos como filtración en gel, interacción hidrofóbica o intercambio iónico. Nuevas técnicas como la utilización de membranas y los sistemas de dos fases e inmunopurificación se han ido gradualmente utilizando, en la vanguardia de la purificación de lipasas (Saxena *et al.* 2003).

Entre los beneficios particulares que ofrece el uso de las lipasas, se pueden destacar el aumento en la especificidad de reacción, presentar actividad a condiciones de temperatura y pH moderadas, además de la baja generación de residuos.

Las lipasas están presentes ampliamente en la naturaleza, en plantas, animales y microorganismos. En células vegetales, las lipasas se encuentran en organelos celulares de reserva de energía como las mitocondrias (Rohit *et al.* 2001) y en animales son encontradas en el páncreas (Hasan *et al.* 2006). En las células microbianas las lipasas intervienen en procesos metabólicos de lípidos como degradación, absorción, reconstrucción y metabolismo lipoproteínico (Rohit *et al.* 2001).

La producción de lipasas está influenciada por el tipo y concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno, el pH del cultivo, la temperatura de crecimiento y la concentración de oxígeno disuelto (Elibol y Ozer. 2001). El uso de carbono lipídico parece ser generalmente esencial para obtener una alta producción de lipasa, además, muy pocos autores han observado buena producción de lipasas en ausencia de grasas o aceites (Sharma *et al.* 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1. Producción de lipasas

Las enzimas microbianas, son más utilizadas, en comparación con las de procedencia vegetal y animal, debido a su gran variedad catalítica, la posibilidad de obtener altos rendimientos de producción en menor tiempo, la facilidad en la manipulación genética y la producción a partir de medios de cultivo económicos. Asimismo, las enzimas microbianas son más estables que las correspondientes de plantas y animales.

Las lipasas microbianas son producidas por bacterias y hongos (Rohit *et al.* 2001). Actualmente son más usadas para la producción las cepas bacterianas, ya que ofrecen mayor actividad que las producidas por levaduras, además de que, por lo general, tienen mayor reactividad a un pH neutro o alcalino y son frecuentemente termoestables (Hasan *et al.* 2006).

Las lipasas microbianas son generalmente producidas por fermentación en medio líquido (**FML**), aunque también pueden ser producidas por fermentación en medio sólido (**FMS**). En pocos casos se ha utilizado cultivo de células inmovilizadas. La **FML** tiene como característica principal que los nutrientes y microorganismos se encuentran en contacto permanente en fase acuosa. En contraste, la **FMS** consiste en el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos

húmedos en ausencia de agua libre, procurando que toda el agua presente esté adsorbida en la matriz del soporte (Lagunas *et al.* 2006).

2.1.1. Ventajas y desventajas de la fermentación en medio sólido

Doelle *et al.* (1992) consideran como ventajas de la **FMS** los siguientes aspectos:

- Ⓢ Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- Ⓢ La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar la contaminación, especialmente por bacterias y levaduras.
- Ⓢ La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños, en comparación con los utilizados en fermentación líquida.
- Ⓢ La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Ⓢ Pueden emplearse conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y manipulación en la preparación del inóculo.
- Ⓢ Algunos subproductos son utilizados integralmente, por ejemplo en ocasiones la masa fermentada residual puede ser utilizada como alimento animal, como base para productos para el control biológico, como fertilizantes, etc.

- Ⓢ Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.
- Ⓢ El bajo contenido de agua reduce drásticamente la capacidad hidrolítica de las proteasas (Gervais y Molin. 2003).
- Ⓢ La **FMS** puede ser trabajada en un cultivo en lote con una rápida oxigenación por el bajo suministro de azúcar, tiene la ventaja de ser un proceso estático sin gasto de energía mecánica. En contraste, la **FML** trabaja como sistema homogéneo y requiere una gran cantidad de energía para suministrar la alta cantidad de oxígeno demandado (Viniegra *et al.* 2003).

Sin embargo, entre las principales desventajas de la **FMS** se encuentran:

- Ⓢ Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- Ⓢ La extracción de calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se puede controlar la temperatura del proceso.
- Ⓢ La naturaleza sólida dificulta la medición de pH, temperatura, contenido de humedad y concentración del sustrato y productos.
- Ⓢ Muchos aspectos de ingeniería, como el diseño de reactores y el escalamiento, están muy poco caracterizados.

Las lipasas microbianas han sido producidas por ambos tipos de cultivo (**FMS** y **FML**). Diversos estudios se han realizado para definir la composición óptima del medio de cultivo. Varias lipasas obtenidas a partir de *Rhizopus* sp. han sido producidas, purificadas, cristalizadas y caracterizadas bioquímicamente. Se ha reportado que *Rhizopus. delemar* produce una lipasa que hidroliza y sintetiza esteres primarios con regíoselectividad para 1,3-glicéridos (Haas *et al.* 1999). Asimismo, la lipasa obtenida de *Rhizopus. niveus* mostró también una gran regíoselectividad 1,3- (Kohno *et al.* 1996).

2.1.2. Microorganismos utilizados en la producción de lipasas

Una extensa variedad de microorganismos son capaces de producir lipasas, lo que permite tener un amplio rango de propiedades lipolíticas con respecto a una posición específica, especificidad de ácidos grasos, temperatura, pH óptimos y termoestabilidad. Algunos de los microorganismos utilizados se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos productores de lipasas (Sharma *et al.* 2001).

Origen	Genero	Especie	Referencia(s)
Bacterias (Gram-positivas)	<i>Bacillus</i>	<i>B. acidocaldarius</i>	Manco <i>et al.</i> 1998
		<i>B. brevis</i>	Hou. 1994

		<i>B. cereus</i>	El-Shafei y Rezkallah. 1997
		<i>B. coagulans</i>	El-Shafei y Rezkallah. 1997
		<i>B. stearothermophilus</i>	Gowland <i>et al.</i> 1987; Kim <i>et al.</i> 1998
		<i>B. subtilis</i>	Kennedy y Rennarz. 1979
		<i>B. megaterium</i>	Godtfredsen. 1990
		<i>Bacillus</i> sp.	Helisto y Korpela. 1998
		<i>Bacillus</i> sp. IHI-91	Becker <i>et al.</i> 1997
		<i>Bacillus</i> sp. J 33	Nawani y Kaur. 2000
		<i>Bacillus</i> sp. RS-12	Sidhu <i>et al.</i> 1998a,b
		<i>Bacillus</i> WAI 28A5	Janssen <i>et al.</i> 1994
		<i>B. thermocatenulatus</i>	Rua <i>et al.</i> 1998
		<i>B. thermoleovorans</i> ID-1	Lee <i>et al.</i> 1999
	<i>Burkholderia</i>	<i>B. glumae</i>	El Khattabi <i>et al.</i> 2000
		<i>Burkholderia</i> sp.	Yeo <i>et al.</i> 1998
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbruckii</i> sub sp. <i>bulgaricus</i>	El-Sawah <i>et al.</i> 1995
		<i>Lactobacillus</i> sp.	Meyers <i>et al.</i> 1996
	<i>Micrococcus</i>	<i>M. freudenreichii</i>	Hou. 1994
		<i>M. luteus</i>	Hou. 1994
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acne</i>	Sztajer <i>et al.</i> 1988
		<i>P. granulosum</i>	Sztajer <i>et al.</i> 1988
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Lee y Yandolo. 1986
		<i>S. canosus</i>	Tahoun <i>et al.</i> 1985
		<i>S. epidermidis</i>	Farrell <i>et al.</i> 1993; Simons <i>et al.</i> 1998
		<i>S. hyicus</i>	Van Oort <i>et al.</i> 1989; Meens <i>et al.</i> 1997; Van Kampen <i>et al.</i> 1998
		<i>S. warneri</i>	Talon <i>et al.</i> 1995
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i>	Sztajer <i>et al.</i> 1988
Actinomicetos	<i>Streptomyces</i>	<i>S. cinnamomeus</i>	Sommer <i>et al.</i> 1997
		<i>S. coelicolor</i>	Hou. 1994
		<i>S. fradiae</i> NCIB 8233	Sztajer <i>et al.</i> 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. CCM 33	Sztajer <i>et al.</i> 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. PCB27	Sztajer <i>et al.</i> 1988
Bacterias (Gram-negativas) Hongos	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. pseudoalcaligenes</i>	Sztajer <i>et al.</i> 1988
		<i>A. radioresistens</i>	Chen <i>et al.</i> 1999
	<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>	Anguita <i>et al.</i> 1993
		<i>A. sorbia</i> LP004	Lotrakul y Dharmstithi. 1997
	<i>Chromobacterium</i>	<i>C. viscosum</i>	Rees y Robinson. 1995; Helisto y Korpela. 1998; Jaeger y Reetz. 1998; Diogo <i>et al.</i> 1999
Continúa tabla 1			
Origen	Genero	Especie	Referencia(s)
Bacterias (Gram-negativas)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Aoyama <i>et al.</i> 1988; Hou, 1994;

Hongos			Ito <i>et al.</i> 2001	
		<i>P. aeruginosa</i> KKA-5	Sharon <i>et al.</i> 1998	
		<i>P. cepacia</i>	Penereac'h y Baratti. 1996; Lang <i>et al.</i> 1998; Hsu <i>et al.</i> 2000	
		<i>P. fluorescens</i>	Maragoni. 1994; Lacointe <i>et al.</i> 1996	
		<i>P. fluorescens</i> MF0	Guillou <i>et al.</i> 1995	
		<i>P. fragi</i>	Mencher y Alford.1967	
		<i>P. glumae</i>	Frenken <i>et al.</i> 1993; Noble <i>et al.</i> 1994	
		<i>P. mendocina</i>	Jaeger y Reetz. 1998	
		<i>P. putida</i> 3SK	Lee y Rhee. 1993	
		<i>P. pseudoalcaligenes</i> F-111	Lin <i>et al.</i> 1995, 1996	
		<i>Pseudomonas</i> sp.	Sin <i>et al.</i> 1998; Miyazawa <i>et al.</i> 1998; Reetz y Jaeger. 1998; Dong <i>et al.</i> 1999	
		<i>Pseudomonas</i> sp. KWI56	Yang <i>et al.</i> 2000	
		<i>Acremonium</i>	<i>A. strictum</i>	Okeke y Okolo. 1990
		<i>Alternaria</i>	<i>A. brassicicola</i>	Berto <i>et al.</i> 1997
Hongos	<i>Aspergillus</i>	<i>A. carneus</i>	Helisto y Korpela. 1998	
		<i>A. flavus</i>	Long <i>et al.</i> 1996, 1998	
		<i>A. fumigatus</i>	Satyanarayan y Johri. 1981	
		<i>A. japonicus</i>	Satyanarayan y Johri. 1981	
		<i>A. niger</i>	Chen <i>et al.</i> 1995	
		<i>A. nidulans</i>	Mayordomo <i>et al.</i> 2000	
		<i>A. oryzae</i>	Ohnishi <i>et al.</i> 1994a,b	
		<i>A. repens</i>	Kaminishi <i>et al.</i> 1999	
	<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i>	Hegedus y Khachatourians.1988	
	<i>Eurotrium</i>	<i>E. herbanorium</i>	Kaminishi <i>et al.</i> 1999	
<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	Rapp. 1995		
Hongos	<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>	Sugihara <i>et al.</i> 1994; Ghosh <i>et al.</i> 1996	
		<i>Geotrichum</i> sp	Macedo <i>et al.</i> 1997	
	<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i>	Balcão <i>et al.</i> 1998	
		<i>M. hiemalis</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996	
		<i>M. javanicus</i>	Ishihara <i>et al.</i> 1975	
		<i>M. miehei</i>	Rantakyla <i>et al.</i> 1996; Lacointe <i>et al.</i> 1996; Plou <i>et al.</i> 1998	
	<i>M. racemosus</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996		
Continúa tabla 1				
Origen	Genero	Especie	Referencia(s)	
Hongos	<i>Ophiostoma</i>	<i>O. piliferum</i>	Brush <i>et al.</i> 1999	
	<i>Penicillium</i>	<i>P. camambertii</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996	

		<i>P. citrinum</i>	Sztajer y Maliszewska. 1989
		<i>P. cyclopium</i>	Chahinian <i>et al.</i> 2000
		<i>P. fusiculosum</i>	Hou. 1994
		<i>P. roqueforti</i>	Petrovic <i>et al.</i> 1990
		<i>Penicillium</i> sp.	Helisto y Korpela. 1998
		<i>P. wortmanii</i>	Costa y Peralta. 1999
	<i>Rhizomucor</i>	<i>R. miehei</i>	Merek y Bednasski. 1996; Weber <i>et al.</i> 1999; Jaeger y Reetz. 1998; Dellamora <i>et al.</i> 1997
	<i>Rhizopus</i>	<i>R. arrhizus</i>	Elibol y Ozer. 2001
		<i>R. chinensis</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996; Nakashima <i>et al.</i> 1988 Yang <i>et al.</i> 2009
		<i>R. delemar</i>	Klein <i>et al.</i> 1997; Espinosa <i>et al.</i> 1990; Haas <i>et al.</i> 1992; Lacointe <i>et al.</i> 1996
		<i>R. honothallicus</i>	Mateos <i>et al.</i> 2006
		<i>R. microsporous</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996
		<i>R. nigricans</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996
		<i>R. niveus</i>	Kohno <i>et al.</i> 1994, 1999
		<i>R. nodosus</i>	Nakashima <i>et al.</i> 1988
		<i>R. oryzae</i>	Salleh <i>et al.</i> 1993; Coenen <i>et al.</i> 1997; Beer <i>et al.</i> 1998; Essamri <i>et al.</i> 1998; Takahashi <i>et al.</i> 1998; Hiol <i>et al.</i> 2000
Levaduras	<i>Candida</i>	<i>C. antarctica</i>	Weber <i>et al.</i> 1999; Jaeger y Reetz. 1998; Arroyo <i>et al.</i> 1999
		<i>C. curvata</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996
		<i>C. cylindracea</i>	Kamiya y Gotto. 1998; Helisto y Korpela. 1998
		<i>C. deformans</i>	Lacointe <i>et al.</i> 1996
		<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe <i>et al.</i> 1996
		<i>C. rugosa</i>	Wang <i>et al.</i> 1995; Frense <i>et al.</i> 1996; Yee <i>et al.</i> 1995; Brocca <i>et al.</i> 1998; Xie <i>et al.</i> 1998
		<i>C. valida</i>	Ghosh <i>et al.</i> 1996
Continúa tabla 1			
Origen	Genero	Especie	Referencia(s)
Levaduras	<i>Pichia</i>	<i>P. bispora</i>	Hou. 1994
		<i>P. burtonii</i>	Sugihara <i>et al.</i> 1995

		<i>P. maxicana</i>	Hou. 1994
	<i>Rhodotorula</i>	<i>R. glutinis</i>	Papaparaskevas <i>et al.</i> 1992
		<i>R. pilimornae</i>	Tahoun <i>et al.</i> 1985
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. crataegenesis</i>	Hou. 1994
		<i>S. lipolytica</i>	Tahoun <i>et al.</i> 1985
	<i>Torulospira</i>	<i>T. globora</i>	Hou. 1994
	<i>Trichosporon</i>	<i>T. asteroides</i>	Dharmsthiti y Ammaranond. 1997
	<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Merek y Bednasski. 1996; Pignede <i>et al.</i> 2000

Gran parte de la producción industrial de lipasas microbianas es obtenida a partir de hongos y bacterias, en la tabla 2 se muestran algunas de sus características.

Tabla 2. Características de lipasas comerciales (Sharma *et al.* 2001).

Tipo	Origen	Aplicación	Compañía productora
Hongos	<i>C. rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Síntesis orgánica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Aditivo en detergentes	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Procesado de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bacterias	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis orgánica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Aditivo en detergentes	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Aditivo en detergentes	Genencor
	<i>C. viscosum</i>	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts

2.1.3. Medios de cultivo utilizados en la producción de lipasas

La producción de lipasas es fuertemente influenciada por el tipo y la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, el pH del cultivo, la temperatura de crecimiento y la concentración de oxígeno disuelto. A continuación se describen algunos ejemplos de cultivos empleados para la producción de lipasas partir de *Rhizopus sp.*

Yang *et al.* (2009) produjeron dos lipasas de *R. chinensis* (LIP 1 y LIP 2) por **FMS** en un medio de cultivo que contenía: 10 g salvado de trigo y harina de trigo (2:3 p/p), lactosa 1 % p/p, peptona 2 % p/p, K₂HPO₄ 0.2 % p/p, MgSO₄ 0.05 % p/p y aceite de oliva 2 % p/v, con un ajuste de humedad del 70 % y pH 6.5. Se inoculó con 1 mL de suspensión de esporas (10⁷ esporas/mL) y se incubó a 30 °C durante 72 h. En la tabla 3 se muestran las características de las lipasas producidas.

Tabla 3. Características de dos lipasas obtenidas a partir de *R. chinensis*.

Característica	LIP 1	LIP 2
Peso molecular	62 kDa	33 kDa
pH optimó	8.0	8.0 y 8.5
pH de estabilidad (1 h)	6.0–9.0	5.5-7.0
Temperatura optima (°C)	40 °C	40 °C
Temperatura de estabilidad (1 h)	50 °C	35 °C
Inductor enzimático	K ⁺	Mn ²⁺
Especificidad de sustrato	p-Nitrofenil palmitato	p-Nitrofenil laurato

En otro estudio (Hiol *et al.* 2000), *R. oryzae* fue cultivado en un fermentador de 2 L (CMF 100 Basic, B. Braun, France). El medio contenía corn steep liquor 4 % p/v, peptona 1 % p/p, KH_2PO_4 1.4 % p/p, K_2HPO_4 0.24 % p/p y MgSO_4 0.04 % p/p y fue ajustado a pH 5.6. Una reja metálica fue utilizada como soporte de crecimiento en el fermentador, el cual fue autoclavado a 120 °C durante 30 min. Después fue inoculado con 10 mL de una suspensión 10^6 esporas/L. Al cultivo se le administró abundantemente oxígeno durante 2 min, con agitación de 100 rpm. La temperatura de crecimiento se mantuvo a 35 °C durante el primer día de cultivo y fue reducida a 28 °C para el resto del periodo de fermentación, que fue de siete días. Se produjo una lipasa de 32 kDa con actividad específica de 8800 U/mg, pH óptimo de 7.5, temperatura óptima de 35 °C, estabilidad a pHs de 4.5 a 7.5 y estabilidad a temperaturas de 20 a 35 °C.

Rodríguez *et al.* 2006 evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, carbono y energía en la producción de lipasas a partir de *R. homothallicus* por **FMS**. Encontraron que el uso de urea como fuente de nitrógeno da la mayor producción de lipasas, en contraste con las sales de amonio (donde la producción es muy baja o nula). También encontraron que el uso de aceite de oliva y la adición de oligoelementos da los mayores rendimientos de producción de lipasas. A partir de este estudio, la composición del medio que dio el mayor rendimiento de producción de lipasas fue (en g/L): aceite de oliva 40; lactosa 5, urea 4; K_2HPO_4 5, K_2HPO_4 1; el medio fue concentrado 1.5 veces manteniendo un pH 6.5 y se utilizó como soporte

bagazo de caña de azúcar. El medio fue inoculado con 3×10^7 esporas/g y ajustado a 75 % de humedad. Se incubó a 40 °C, con 40 mL/min de aireación durante 20 h.

Para la producción de lipasas de *R. niveus* por **FML** (Kohno *et al.* 1994) se utilizó un medio de cultivo que contenía: peptona 5 % p/v, glucosa 2 % p/v, extracto de levadura 0.02 % p/v, KH_2PO_4 0.1 % p/v y MgSO_4 0.05 % p/v, ajustando el medio a pH 6.5. La fermentación se realizó a 27 °C durante 4 días, con agitación constante. Se obtuvieron dos lipasas, la lipasa I que gradualmente se convirtió en la lipasa II (50 %) después de que fue incubada la solución de lipasa I pura durante varios días a 37 °C. Esta conversión fue debida a la serin proteasa presente en pequeñas cantidades en la preparación de lipasa I. lo que fue comprobado al adicionar un inhibidor específico para serin proteasa (PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). En la tabla 4 se muestran las características de las dos lipasas.

Tabla 4. Características de dos lipasas obtenidas a partir de *R. niveus*.

Característica	Lipasa I	Lipasa II
Peso molecular	34 kDa	30 kDa
Actividad lipolítica	5000 U/mg	6200 U/mg
pH óptimo	6.0 a 6.5	6.0
Temperatura óptima	35 °C	40 °C
Estabilidad a temperatura (30 min)	28 a 38 °C	23 a 43 °C

2.2. Métodos de extracción de lipasas

Se han empleado diferentes métodos para obtener un extracto crudo lipolítico después de la fermentación, ya sea realizada por **FMS** o **FML**. Algunos ejemplos se describen a continuación:

La extracción de lipasas producidas por **FMS** a partir de *R. chinensis* fue llevada a cabo a 4 °C, como se describe a continuación. Los sólidos colectados fueron lavados dos veces con agua para eliminar los residuos de la fermentación, después fueron lavados por barrido usando detergente aséptico para eliminar el sustrato unido al micelio. Posteriormente, 100 g de micelio fue suspendido en 1 L de solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 y se sometió a presión hidráulica de 8000-12000 psi. Después se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min y el precipitado se resuspendió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM y pH 6.5. Se adicionó Triton X-100 1 % p/v manteniendo agitación suave durante 8 h y posteriormente fue centrifugado a 15000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue considerado como el extracto crudo (Yang *et al.* 2009).

La extracción de lipasas producidas a partir de *R. oryzae* incubado en **FML** se llevó a cabo a 4 °C. El micelio fue eliminado tras filtración con papel Whatman No 1; el filtrado fue centrifugado a 10000 ×g durante 25 min. El sobrenadante fue considerado como el extracto crudo y se añadieron benzamida 2 mM y azida de sodio 0.02 %

para prevenir la degradación proteolítica y el crecimiento microbiano (Hiol *et al.* 2000).

Las lipasas obtenidas por **FMS** a partir de *R. homothallicus* fueron extraídas de la materia sólida fermentada por presión mecánica. El extracto fue centrifugado a 5000 ×g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue considerado como el extracto crudo (Rodríguez *et al.* 2006).

El extracto lipolítico producido por **FMS** a partir de *R. homothallicus* fue obtenido a 4 °C adicionando a cada columna de fermentación 125 mL de solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM y pH 8, con Triton X-100 0.5 % p/v y benzamida 2 mM. Después de 40 min con un chorro constante de aire saturado inyectado por la parte superior de la columna el extracto fue recuperado por la parte inferior de ésta. El contenido de la columna fue removido suavemente de forma manual para recuperar el resto del extracto. Ambas fracciones fueron mezcladas, siendo consideradas como el extracto crudo (Mateos *et al.* 2006).

El extracto lipolítico producido por **FML** a partir de *R. niveus* se extrajo por filtración, el extracto fue ajustado a pH 6.0 adicionando solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM y pH 6.0. La solución resultante permaneció por 1 h a 4 °C, y el precipitado se eliminó tras centrifugación. El sobrenadante fue considerado como el extracto crudo (Kohno *et al.* 1994).

2.3. Purificación de lipasas

Yang *et al.* (2009) purificaron la lipasa producida a partir de *R. chinensis* precipitando el extracto crudo lipolítico con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70 % de saturación. Tras centrifugación a 12000 rpm durante 15 min, el precipitado fue resuspendido en solución amortiguadora de sulfato de sodio 20 mM y pH 6.5 hasta alcanzar la cuarta parte del volumen original. La solución fue dializada contra solución amortiguadora de fosfatos de sodio 20 mM / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M, Triton X-100 0.1 % p/v, a pH 6.5. El concentrado fue aplicado a una columna de Butyl-Sepharosa 4 Fast Flow (1.6 x 20 cm) pre-equilibrado con la solución amortiguadora antes mencionada. Las proteínas fueron eluidas por disminución de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ desde 0.5 a 0 M con una velocidad de flujo de 1.2 mL/min (las fracciones con actividad fueron eluidas con una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 M. Las fracciones fueron reunidas, concentradas y cargadas en una columna de exclusión molecular (Superdex 75 (26/60), Amersham Biosciences) la cual fue pre-equilibrada con solución amortiguadora de fosfato 20 mM / Triton X-100 0.1 % p/v, a pH 6.5. La lipasa fue eluida con la misma solución amortiguadora, con un flujo de 2 mL/min. Todos los pasos de purificación fueron realizados a 4 °C.

Hiol *et al.* (2000) precipitaron el extracto lipolítico producido a partir de *R. oryzae* con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30 % de saturación a 0 °C. Después se centrifugo a 12000 $\times g$ durante 15 min y el precipitado fue descartado. El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 75 % de saturación a 0 °C, centrifugándose a 10000 $\times g$ durante 15 min. El

precipitado fue resuspendido en 30 mL de solución amortiguadora Tris-HCl / azida de sodio 0.02 % y benzamida 2 mM, a pH 6.8. La solución enzimática fue dializada toda la noche contra la misma solución amortiguadora y el material insoluble fue descartado por centrifugación. La solución enzimática fue cargada en una columna de Sulfopropil-Sepharosa (2.6 x 10 cm) previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora, la enzima unida a la matriz fue eluída con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M en la misma solución amortiguadora, con un velocidad de flujo de 0.8 mL/min (las fracciones con actividad lipolítica fueron eluídas con concentraciones de aproximadamente 0.15 M). Estas fracciones fueron reunidas y dializadas contra la misma solución amortiguadora. El dializado fue cargado en una columna de Q-Sepharose equilibrada con la misma solución amortiguadora, aunque la lipasa no fue adsorbida. La solución enzimática fue entonces concentrada por ultrafiltración con una celda Amicon, usando una membrana de corte molecular de 10 kDa. El concentrado fue cargado en una columna de Sephadex G75 (2.6 x 10 cm) previamente equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM / NaCl 0.15 M, a pH 6.8. La elución fue hecha con la misma solución amortiguadora, con una velocidad de flujo de 0.4 mL/min. Las fracciones que presentaban actividad lipolítica fueron reunidas y dializadas contra solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM y pH 6.8. La muestra fue aplicada a una columna de Sulfopropilo (2.6 x 10 cm), equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM y pH 6.8 y la lipasa fue eluída con Tris-HCl 20 mM / NaCl 0.15 M, a pH 6.8. Todos los pasos de purificación fueron llevados a 4 °C.

El extracto enzimático obtenido por **FMS** a partir de *R. homothallicus* fue concentrado por ultrafiltración en un aparato Minitan con membrana de corte molecular de 10 kDa. El exceso de Triton X-100 usado en la extracción de la lipasa fue eliminado usando una columna empacada con el absorbente polimérico Amberlita XAD-2 (Supelco). La solución enzimática fue cargada a una columna de butil-sepharosa equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M, a pH 8.0. La lipasa fue eluída con un gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1 a 0 M un flujo de 2 mL/min. Las fracciones con actividad lipasa fueron reunidas, concentradas y cargadas en una columna de Superdex G-200 (26/26, Amersham) equilibrada con una solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM / NaCl 150 mM, a pH 8.0, con un flujo de 1 mL/min. Todos los pasos de purificación fueron llevados a 4 °C (Mateos *et al.* 2006).

El extracto crudo lipolítico obtenido por **FML** a partir de *R. niveus* fue cargado en una columna de DEAE-Toyopearl (5 x 35 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM a pH 6.0. La actividad lipolítica fue encontrada en las fracciones no adsorbidas, las cuales fueron colectadas y puestas en una columna de CM-Toyopearl (5.0 x 35.0 cm) previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora. La proteína fue eluída con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M. Dos fracciones con actividad lipasa (lipasa I y lipasa II) fueron colectadas y precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70 % de saturación.

La lipasa I precipitada fue disuelta en agua desionizada, y la solución fue desalada con una columna de Sephadex G-25 (2.0 x 120 cm). Para el desalado, una solución

amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.0 fue adicionada hasta alcanzar una concentración de 10 mM. Esta solución fue puesta en una columna CM-Toyopearl equilibrada con la misma solución amortiguadora. La elución fue hecha por incremento de pH de la solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pasando de pH 6.0 a 7.0. La fracción con actividad lipasa fue eluída a pH 6.8.

La lipasa II fue desalada con el mismo método usado para la lipasa I. Después fue añadida a una columna CM-Toyopearl equilibrada con solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM, a pH 6.8. La lipasa II fue eluída con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.3 M (Kohno *et al.* 1994).

En la tabla 5 se muestran los pesos moleculares y la actividad específica de las lipasas purificadas con los distintos métodos de purificación descritos.

Tabla 5. Características de lipasas purificadas producidas a partir de varias especies de *Rhizopus*.

Peso molecular (kDa)	Actividad específica (U/mg)	Método de determinación de actividad	Referencia
33	96.8	Espectrofotométrico	Yang <i>et al.</i> 2009
32	8800	Titulación	Hiol <i>et al.</i> 2000
29.5	10700	Titulación	Mateos <i>et al.</i> 2006
34	5000	Titulación	Kohno <i>et al.</i> 1994
30	6200		

2.4. Determinación de actividad lipasa

Hay numerosos métodos para medir la actividad hidrolítica, así como la detección de lipasas. Estos métodos pueden ser clasificados de la siguiente manera (Beisson *et al.* 2000):

- I. Titulación***
- II. Espectroscopia (fotometría, fluorometría, infrarrojo)***
- III. Cromatografía***
- IV. Radiactividad***
- V. Tensiometría interfacial***
- VI. Turbidimetría***
- VII. Conductimetría***
- VIII. Inmunoquímica***
- IX. Microscopía***

La hidrólisis de triglicéridos por lipasas consiste en la liberación por hidrólisis de cada uno de los ácidos grasos que forman un triglicérido hasta dejar sólo el glicerol, como se muestra en la figura 2.

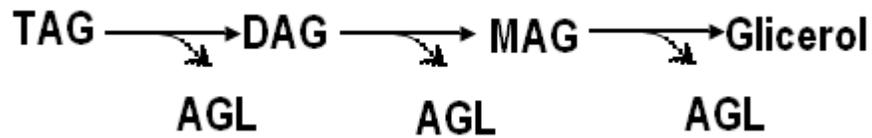


Figura 2. Hidrólisis de triglicéridos.

TAG = Triacilglicerol

DAG = Diacilglicerol

MAG = Monoacilglicerol

AGL = ácidos grasos libres

Usando varios métodos fisicoquímicos, se puede monitorear la desaparición de sustrato o la aparición de producto.

I. Titulación

El método conocido como pHstat es usado para la caracterización de actividad y especificidad lipasa, así como el fenómeno de activación interfacial. Este método involucra la titulación continua de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos que se encuentran en la emulsión de reacción (Jurado *et al.* 2006).

El método consiste en la neutralización con NaOH de los ácidos grasos liberados mediante la acción lipolítica. La actividad es medida bajo agitación constante y se emplean triacilglicerol naturales o sintéticos, con un pH y tiempo de reacción determinados (Beisson *et al.* 2000).

II. Espectroscopia

Ⓢ Fotometría

El método espectrofotométrico de oleato de cobre consiste en la cuantificación de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de triglicéridos de aceite de oliva por acción de las lipasas. Estos ácidos grasos, en presencia de iones de cobre, dan origen a la formación de una sal colorida (verde esmeralda) y cuya intensidad es medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 715 nm (Kwon *et al.* 1986; Rodríguez *et al.* 2006).

También pueden usarse ésteres carboxílicos sintéticos, como α -naphthol, p-nitrofenol o 2,4-dinitrofenol, cuya hidrólisis a alcoholes puede ser monitoreada continua y cuantitativamente usando un espectrofotómetro. La aparición de la coloración amarilla del p-nitrofenol (pKa 7.15) puede ser monitoreada a una longitud de onda de 405 nm. La formación de 2,4-dinitrofenol (pKa 3.96) puede ser monitoreada a 360 nm (Beisson *et al.* 2000).

Ⓢ Fluorometría

En los métodos de fluorescencia se usa como sustrato un triacilglicerol sintético con un grupo pirano unido al grupo acilo. El método permite determinar la cantidad de marcador relacionado con los ácidos grasos libres relacionados, observándose un cambio de la intensidad fluorescente a una longitud de onda determinada. La dansilfosfatidiletanolamina y los NBD-fosfolípidos han sido usados como sustratos para detectar actividad lipasa (Beisson *et al.* 2000).

Infrarrojo

La lipólisis es monitoreada en un espectroscopio infrarrojo (*Fourier transform infrared spectroscopy*). Los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos pueden ser cuantificados utilizando la ley de Beer (Beisson *et al.* 2000).

III. Cromatografía

Varias técnicas cromatográficas son empleadas para detectar ácidos grasos relacionados con la actividad lipolítica, como por ejemplo las columnas de florisilo o ácido silícico, la cromatografía en capa fina y la cromatografía de gas o líquida (Beisson *et al.* 2000).

IV. Radiactividad

Este método está basado en unir el ácido graso libre extraído con solvente orgánico con ^{63}Ni , aunque requiere primero quitar el solvente para adicionar la solución de ^{63}Ni (Beisson *et al.* 2000).

V. Tensiometría interfacial

Una técnica, que involucra la formación de una monocapa de lípido en una interfase aire-agua, consiste en un plato Wilhelmy que tiene un canal de teflón lleno de solución acuosa. Un delgado plato de platino es sumergido en la superficie de la fase acuosa el cual tiene implementado un electromicrobalance para medir la presión superficial (π). Ésta directamente relacionada con la tensión superficial (γ) por la

relación $\pi = \gamma_0 - \gamma$, donde γ_0 es el valor de referencia de la tensión interfacial de la interfase aire-agua. Una capa monomolecular de una solución de lípidos en un solvente poco soluble en agua es extendida en la superficie de la fase acuosa. El área ocupada por la capa lipídica puede ser limitada y ajustada con una barra de teflón que barre la superficie de la fase acuosa, por lo que la presión superficial puede ser mantenida automáticamente constante usando el dispositivo de teflón, que es controlado y regulado dependiendo de la potencia del microbalance. Al inyectar la solución de lipasa debajo de la capa monomolecular de la fase acuosa, se da la disminución de la presión superficial debido a la solubilidad de los ácidos grasos liberados por la acción lipolítica al hidrolizar el lípido. Cuando la barra se mueve para mantener la presión constante, la cinética de la reacción puede ser monitoreada por el movimiento de la barra con respecto del tiempo.

Otro método es el de gotas de aceite. En éste, la tensión interfacial dada por un perfil de gota de aceite es medida automáticamente usando la ecuación de Laplace. La acumulación del producto de la hidrólisis en la superficie de las gotas de aceite es responsable de la disminución de la tensión superficial, con lo que se obtiene un cambio del perfil de gota con respecto del tiempo (Beisson *et al.* 2000).

VI. Turbidimetría

El método turbidimétrico consiste en medir la densidad óptica, que aumenta debido a la hidrólisis del sustrato en presencia de CaCl_2 , el cual precipita al irse hidrolizando el sustrato (Beisson *et al.* 2000).

VII. Conductimetría

En este método se mide el incremento de la conductividad eléctrica relacionada con los ácidos grasos liberados debida a la acción lipolítica (Beisson *et al.* 2000).

VII. Inmunoquímica

La prueba de ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) es un sistema altamente sensible y específico para detectar y cuantificar lipasas. Este método inmunológico puede ser usado para detectar tanto las lipasas activas como las inactivas, aunque se requiere que las lipasas estén puras. Este ensayo consiste primero en la unión de un anticuerpo policlonal (captor) a un soporte sólido. El antígeno (lipasa) interactúa con el primer anticuerpo, antes de adicionar un segundo anticuerpo (detector) el cual reconoce el epítipo del antígeno (Beisson *et al.* 2000).

IX. Microscopia

La cinética de la hidrólisis lipolítica es monitoreada usando un microscopio de fuerza atómica. Una imagen en tiempo real de la hidrólisis es obtenida y analizada por el software, que muestra el aumento del área que deja libre el lípido en la interfase al ser hidrolizado en función del tiempo (Beisson *et al.* 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

La actividad catalítica de una enzima esta influenciada por la temperatura y pH del medio, por lo que la purificación parcial y caracterización de la temperatura y pH óptimos de actividad de la lipasa producida por *Rhizopus microsporus var. chinensis* permitirá proponer aplicaciones para la enzima estudiada.

4. HIPÓTESIS

La caracterización del efecto de temperatura y pH en la actividad de un extracto lipolítico parcialmente puro permitirá mejorar su eficiencia lipolítica.

5. OBJETIVO GENERAL

Producir, purificar y caracterizar parcialmente una lipasa fúngica extracelular.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- ④ Aprender la técnica de producción de enzimas por fermentación en medio sólido.

- ④ Aprender las técnicas de purificación de enzimas.

- ④ Aprender criterios de toma de decisión en el desarrollo experimental de un proyecto de investigación.

- ④ Producir un extracto fúngico lipolítico por fermentación en medio sólido.

- ④ Purificar parcialmente un extracto lipolítico.

- ④ Caracterizar en términos de temperatura y pH óptimos de actividad el extracto parcialmente purificado.

7. METODOLOGÍA

7.1. Microorganismo

7.1.1. Conservación del inóculo

Se utilizó una cepa de *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* de la colección microbiana de la Universidad Autónoma Metropolitana (México). La cepa se sembró por estría en tubos de agar papa dextrosa (**APD**) con 12 mL por tubo y se incubó a 30 °C durante 7 días. Se conservó a 4 °C.

7.1.2. Propagación de esporas.

Las esporas se cosecharon con 10 mL de Tween 80 0.01 % v/v por tubo de conservación (previamente esterilizado), mediante agitación en vórtex. Se adicionaron alícuotas de 0.5 mL a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 60 mL de **APD**, incubándose durante 7 días a 30 °C.

7.1.3. Cosecha de esporas

Posterior a la esporulación, las esporas se cosecharon con 12.5 mL de Tween 80 al 0.01% v/v por matraz, previamente esterilizado.

7.1.4. Conteo de esporas

Se hizo conteo de esporas en una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases (Olympus BX40), para ajustar a una relación de 3×10^7 esporas por gramo de soporte inerte.

7.2. Preparación del soporte

Se utilizó agrolita como soporte inerte, la cual se tamizó en mallas de 16 y 20 (tamaño de partícula), se lavó y secó a 60 °C.

7.3. Preparación del medio de fermentación

El medio de fermentación utilizado fue el reportado por Rodríguez *et al.* (2006) concentrado 1.25 veces (Anexo 1).

7.4. Fermentación en medio sólido (FMS)

Se mezcló la agrolita con el medio de fermentación y se inoculó con una concentración de 3×10^7 esporas/g de soporte y se ajustó a un valor del 55 % de humedad (materia húmeda).

La mezcla se empacó en columnas de vidrio de 20 × 2.5 cm con 20 g de materia húmeda y se incubó a 40 °C con un flujo de aire de 40 mL/min durante 16 h (Angel 2008; Rodríguez *et al.* 2006).

7.5. Conservación de materia fermentada

Concluida la fermentación, la materia fermentada contenida en las columnas se secó con aire a un flujo de de 10 L/min hasta alcanzar un contenido de humedad final menor al 10 %. La materia seca fermentada (**msf**) se almacenó protegida de la luz a temperatura ambiente.

7.6. Métodos de concentración preparativa

El extracto lipolítico se recuperó de la **msf** adicionando solución amortiguadora de fosfatos 25 mM y pH 7.0 en una relación 1:10 p/v. La extracción se realizó con agitación suave durante 10 min a 4 °C (baño de hielo), posteriormente se centrifugó a 15000 $\times g$ a 4 °C durante 15 min; el sobrenadante se filtró al vacío y se considero como el extracto lipolítico (**EL**), al cual se le adicionó cocktail inhibidor de proteasas 2 mM.

Al concentrar se reduce el volumen del **EL**; lo que facilita la manipulación del mismo. Se usaron dos métodos de concentración para determinar cuál ofrecería el mejor rendimiento de actividad enzimática. Los métodos probados fueron: precipitación fraccionada y ultrafiltración, ambos se realizaron a 4 °C.

7.6.1. Precipitación fraccionada.

La precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ depende de la fuerza iónica que ejerce el medio en donde está inmersa la proteína. Al aplicar la precipitación fraccionada al **EL** se busca el corte de saturación que proporcione el mayor rendimiento lipolítico. Se realizaron los siguientes cortes: de 0 a 60, 60 a 65, 0 a 70, 70 a 75 y 75 a 80 % de saturación.

El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue adicionado al **EL** lentamente, hasta obtener la saturación deseada. Se dejó homogeneizar durante 4 h a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 15000 $\times g$ a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se separó por decantación y el precipitado se

resuspendió en solución amortiguadora de fosfato 25 mM y pH 7.0. Se tomaron muestras de sobrenadante y del precipitado resuspendido y se dializaron contra solución amortiguadora de fosfatos 1.5 mM, pH 7.0, para posteriormente analizar proteína, actividad lipolítica y realizar electroforesis (SDS-PAGE) con ambas fracciones.

7.6.2. Ultrafiltración

El **EL** se ultrafiltró con una membrana de 30 kDa durante 2 h a 4 °C, el retenido obtenido se ultrafiltró nuevamente a través de una membrana de 10 kDa durante 3 h a 4 °C. En ambos cortes se tomaron muestras del filtrado y del retenido para determinar proteína, actividad lipolítica y realizar electroforesis (SDS-PAGE).

7.7. Purificación parcial

7.7.1. Protocolo 1.

El extracto lipolítico se recuperó de la **msf** adicionando solución amortiguadora de fosfatos 25 mM / CaCl₂ 10 mM, pH 7.0 en una relación 1:10 (p/v). La extracción se realizó con agitación suave durante 10 min a 4 °C (baño de hielo). Tras filtrar con papel Whatman No 1, se consideró al filtrado como el extracto crudo lipolítico, al cual se le adiciono cocktail inhibidor de proteasas (2 mM).

El extracto lipolítico se ultrafiltró con un corte molecular de 10 kDa a 4 °C, el retenido fue cargado en una columna HiTrap™ Phenyl (Hig sub) de 1 mL, con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M. La elución se hizo con un gradiente de concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1 a 0 M. Las fracciones con actividad se reunieron y se dializaron contra solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, a 4 °C y se cargaron en una columna Econopac High Q cartridge. La solución amortiguadora fue Tris-HCl 20 mM (pH 7.0) y la elución se realizó con un gradiente de 0 a 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

7.7.2. Protocolo 2.

La extracción se realizó como se describió en la sección 7.7.1. El **EL** se ultrafiltró con un corte molecular de 10 kDa a 4 °C y el retenido se cargó a una columna Econo-Pac High Q cartridge con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM a pH 7.0. La elución se realizó con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M, las fracciones con actividad lipolítica se reunieron y se concentraron mediante liofilización. El concentrado se dializó contra solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 7.0, y se inyectó en una columna Econo-Pac High S cartridge pre-equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM a pH 7.0. La elución de proteína se realizó con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M.

7.8. Técnicas analíticas

7.8.1. Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante microensayo Bradford con Bio-rad Dye Reagent (Bradford 1976). Se usó como referencia proteica la albúmina serica bovina (BSA) (Anexo 2).

7.8.2. Determinación de actividad lipasa

Se analizó la actividad lipolítica de las muestras obtenidas en cada procedimiento al que se sometió el extracto lipolítico. Para ello se emplearon métodos espectrofotométricos y el método de titulación, describiéndose a continuación el procedimiento de cada uno de ellos.

7.8.2.1. Métodos espectrofotométricos

Los métodos espectrofotométricos utilizados en la determinación de actividad lipolítica fueron: oleato de cobre, cinética de hidrólisis de p-nitrofenil palmitato (**p-NPP**) e hidrólisis de p-nitrofenil octanoato (**p-NPO**).

7.8.2.1.1. Oleato de cobre

I Reacción enzimática

El método se basó en el reportado por Hernández *et al.* (2009).

Emulsión

Se prepararon 100 mL de una solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M / CaCl₂ 10 mM, alcohol polivinílico 0.25 % p/v y goma arábica 0.3 % p/v, a pH 8.0. La emulsión se realizó adicionando 20 g de aceite de oliva a 10000 rpm durante 10 min y 40 °C, usando un Ultra-Turrax (IKA-WERK®). La homogeneización se realizó en el momento de su uso.

Solución colorida

La solución colorimétrica fue preparada con acetato de cobre a una concentración de 50 g/L, ajustando el pH a un valor de 6.1 con piridina.

Desarrollo

El desarrollo de color se llevó a cabo mezclando 40 mg de **msf** con 3 mL de la emulsión en un tubo (por duplicado), e incubando la mezcla de reacción a 40 °C durante 15 min. La reacción se detuvo con la adición de 0.6 mL de solución HCl 6 M. La extracción de los ácidos grasos se realizó con 3 mL de n-heptano y se agitó durante 30 s en vórtex. La mezcla se centrifugó a 7505 ×g durante 10 min a 4 °C. A 2.5 mL de la fase orgánica recuperada se le adicionaron 0.5 mL de solución de color y se agitó durante 30 s. Se leyó la absorbancia a 715 nm en un espectrofotómetro SHIMADZU® UV-160. El blanco fue preparado con **msf** previamente inactivada con 0.6 mL de HCl 6 M.

II Cálculo de actividad lipolítica

Una unidad de lipasa (**U**) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar el equivalente a 1 μmol de ácido oleico por minuto bajo las condiciones de ensayo (pH 8.0 y 40 °C).

Las **U** fueron calculadas a partir de la siguiente ecuación:

$$U/gms = [(abs - b/m)] * 1.2 * (3/x) * (1/y) * (1/15)$$

Donde:

abs es la absorbancia a 715 nm

b corresponde al blanco

m es el valor de la pendiente de la curva estándar ($\text{mL } \mu\text{mol}^{-1}$) (Anexo 3)

1.2 es el factor de corrección ($3.0/2.5=1.2$); 3 mL es el volumen total de reacción y

2.5 mL es el volumen de extracción de los ácidos grasos relacionados con la reacción lipolítica

x son los gramos de biocatalizador (g_B)

y son los gramos de materia seca por gramo de biocatalizador ($gms g_B^{-1}$)

15 es el tiempo de reacción (min)

7.8.2.1.2. Cinética de hidrolisis de p-nitrofenil palmitato (p-NPP)

El método fue realizado de acuerdo con lo reportado por Pencreac'h y Baratti, (1996), con algunas modificaciones.

I Reacción enzimática

Se preparo una solución de p-nitrofenil palmitato (**p-NPP**) 10 mM la cual se diluyó en solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM / alcohol polivinilico 0.25 % p/v, a pH 8.0 en una relación 1:9 (solución A).

Desarrollo colorimétrico

La reacción se inicio mezclando 50 μ L de muestra con 100 μ L de solución A a 40 °C, con agitación al inicio de la reacción, se dejó reaccionar durante 10 minutos y se hicieron lecturas de absorbancia cada 20 s a una longitud de 405 nm en un ultra microplate reader bio_tek ELx808.

II Cálculo de actividad lipolítica

Una unidad de lipasa (**U**) se define como la cantidad de enzima que libera el equivalente a 1 μ mol de p-NP por minuto bajo las condiciones de ensayo (40 °C, pH 8.0).

La ecuación lineal de la curva estándar fue utilizada para el cálculo de actividad lipolítica (Anexo 4).

7.8.2.1.3. Hidrólisis de p-nitrofenil octanoato (p-NPO)

El método fue realizado de acuerdo con lo reportado por Chakraborty *et al.* (2009) con algunas modificaciones.

I Reacción enzimática

100 μ L de una solución de p-nitrofenil octanoato en 2-propanol 20 mM se adicionaron en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM / CaCl₂ 10 mM, Triton X-100 0.4 % p/v y goma arábica 0.1 % p/v, a pH 7.0. Se sonicó durante 5 min y se atemperó a 40 °C durante 5 min. A continuación se adicionaron 20 μ L de muestra enzimática, y rápidamente se agitó en vórtex; inmediatamente se incubó a 40 °C, con un tiempo de reacción de 3 min. Para detener la reacción se usaron 2.2 mL de solución acetona-etanol 1:1 v/v fría.

Para la muestras testigo una alícuota se incubó a 100 °C durante 5 minutos, realizándose a continuación un choque térmico en baño de hielo (Liu *et al.* 2008).

El volumen final de reacción se centrifugo a 15000 $\times g$ a 4 °C durante 10 minutos y al sobrenadante se le determinó la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro SHIMADZU® UV-160.

II. Cálculo de actividad lipolítica

Una unidad de lipasa (**U**) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 mM de p-NP por minuto bajo las condiciones de estudio (40 °C, pH 7.0).

La lectura de absorbancia de cada muestra se sustituyó en la ecuación lineal obtenida de la curva patrón de p-NP (Anexo 5).

7.8.2.2. Método de titulación: hidrólisis enzimática de tributirina (pHstat)

El método fue realizado de acuerdo con lo reportado por Jurado *et al.* (2006), con algunas modificaciones.

I Reacción enzimática

Emulsión

Se preparó la emulsión con cloruro de sodio (NaCl) 17.90 g/L; fosfato dihidrogeno potásico (KH₂PO₄) 0.410 g/L; glicerina (C₃H₈O₃) 540 mL/L; goma arábica en una relación 0.1 g/mL de tributirina, el pH se ajustó a 6.8. Se emulsificó a 10000 rpm durante 10 min a 30 °C, usando un Ultra-Turrax (IKA-WERK®).

Actividad enzimática

La actividad enzimática se evaluó con el titulador automático Mettler DL21/DL25; el agente titulante fue NaOH 0.1 N. La emulsión se atemperó a 30 °C, y 28 mL fueron adicionados en el vaso de reacción con temperatura controlada a 30 °C. Se realizó

una pretitulación y posteriormente se agregaron 2 mL de la solución de **EL**, dando inició la titulación de la mezcla de reacción durante 2 min con un flujo de 10 mL/min.

II Cálculo de actividad lipolítica

Una unidad de lipasa (**U**) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar el equivalente a 1 μmol de ácido butírico por minuto bajo las condiciones de ensayo (30 °C, pH 6.8).

Las **U** fueron calculadas a partir de la siguiente ecuación (Jurado *et al.* 2006).

$$U = \frac{(v * N_{NaOH} * 10^6)}{e_{exp}}$$

Donde:

U son las unidades de lipasa por gramos de extracto (U/g)

v es la velocidad de adición del NaOH en mL/min

N_{NaOH} es la normalidad del titulante

e_{exp} es la concentración de enzima en $\mu\text{mol/L}$

7.8.3. Perfil de temperatura y pH óptimos

La evaluación del efecto de la temperatura y pH en la actividad lipolítica obtenida en el último paso de purificación parcial (protocolo 2) se ensayó a diferentes

temperaturas (30, 40 y 50 °C) y pH (5, 6, 7 y 8), con el método de hidrólisis de p-nitrofenil octanoato (p-NPO).

7.8.4. Electroforésis SDS PAGE

Se uso SDS PAGE (poliacrilamida al 12 %), como se describe en la metodología de Laemmli (1976).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Fermentación en medio sólido

Se realizaron 6 lotes de fermentación con los cuales se produjeron un total de 995.89 g de materia húmeda fermentada, a partir de los cuales se obtuvieron 447.85 g de materia seca fermentada (Anexo 6).

El crecimiento microbiano se midió indirectamente con un sistema de monitoreo en línea de CO₂ con un cromatógrafo GOWMAC conectado a una computadora personal con un software desarrollado por Saucedo *et al* (1994). En la figura 3 se muestra el perfil de la producción y en la figura 4 se muestra la biomasa, evaluada como miligramos de CO₂ producido.

Los datos obtenidos de la cinética de crecimiento se derivaron y se utilizaron para calcular el coeficiente de crecimiento (μ), la velocidad máxima de crecimiento (dx/dt_{\max}) y el tiempo de máxima producción celular ($t_{dx/dt_{\max}}$), la fase lag (t) se obtuvo mediante la integración de los datos de CO_2 . Estos resultados se muestran en la tabla 6.

8.1.1. Conservación de materia fermentada

La materia fermentada fue conservada con una humedad menor al 10 %, para evitar la contaminación por otros microorganismos, además de evitar la pérdida de actividad por proteólisis. Las muestras fueron almacenadas en recipientes ámbar, para evitar la oxidación de las lipasas.

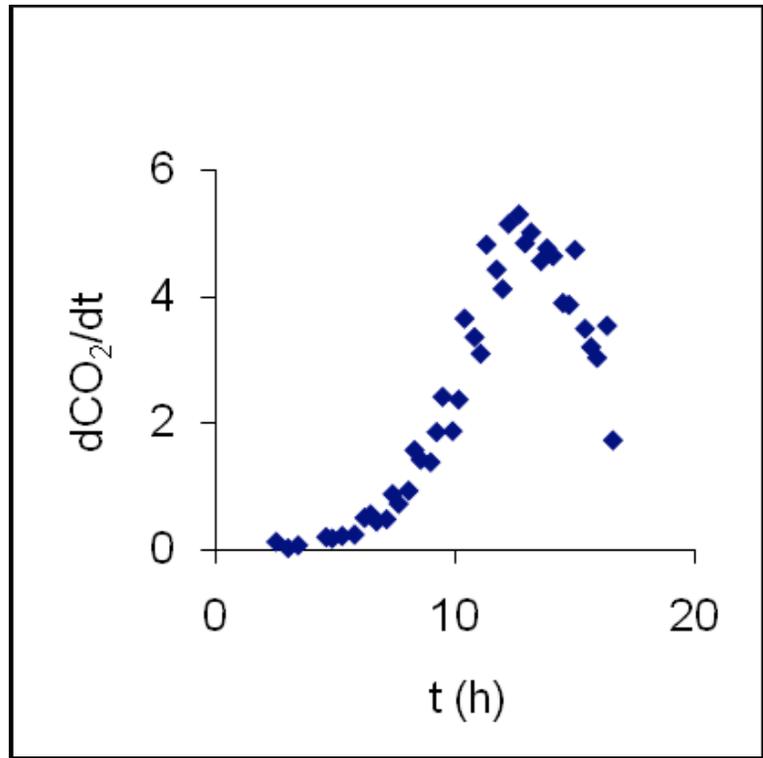


Fig. 3. Velocidad de producción de CO₂

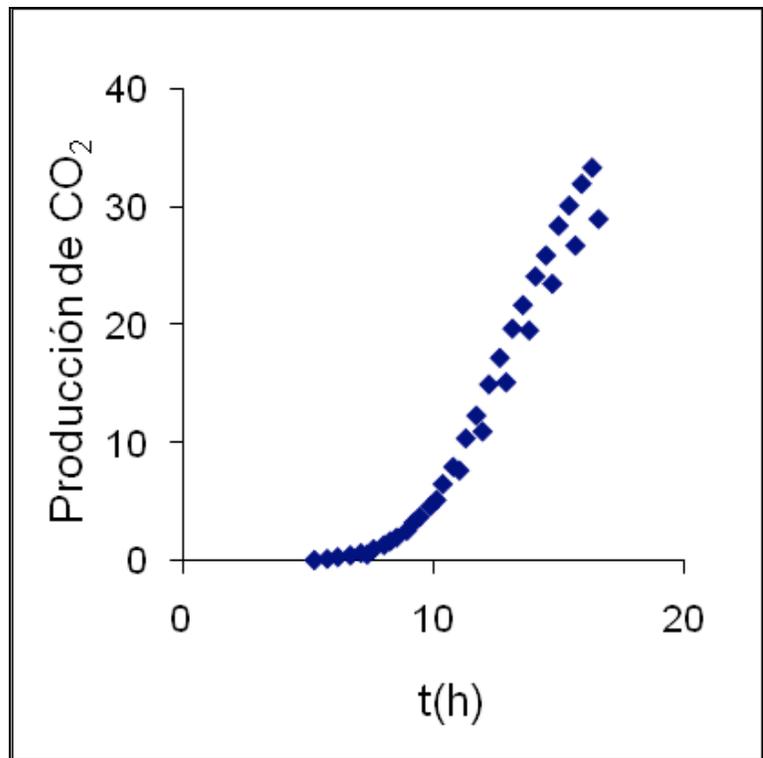


Fig. 4. mg CO₂/gm

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*.

Parámetro	Medición*	%Error
Tiempo de letargo, t_{lag} (h)	6.77 ± 0.24	3.55
Velocidad de producción máxima (dx/dt_{max})	5.41 ± 0.16	2.88
Tiempo máximo de producción ($t_{dx/dt_{max}}$)	12.9 ± 0.42	3.29
Coefficiente de crecimiento, μ (h^{-1})	0.48 ± 0.04	7.47

* La medición se realizó por duplicado

8.1.2. Determinación de actividad de la materia sólida fermentada (msf)

Se puso a punto el método colorimétrico del **oleato de cobre** (Hernández *et al.* 2009). En la tabla 7 se muestran los resultados de actividad lipolítica obtenidos.

Hernández *et al.* (2009) obtuvieron para el microorganismo utilizado en este trabajo resultados muy similares a los que aquí se reportan. La comparación de resultados obtenidos en ambos trabajos se muestra en la tabla 8, y las diferencias en las condiciones de fermentación se muestran en la tabla 9.

Tabla 7. Actividad enzimática obtenida por el método de **acetato de cobre**.

Muestra	Abs	Actividad (U/g _{msf})	Promedio (U/g _{msf})	% Error
1	0.605	77.8	77.4 ± 0.48	0.006
2	0.608	77.5		
3	0.599	76.9		

*Unidad (U) es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido oleico.

Tabla 8. Comparación de parámetros de crecimiento microbiano y actividad lipolítica*.

Parámetro	Hernández <i>et al.</i> 2009	Este trabajo
Coefficiente de crecimiento; μ (h^{-1})	0.40 ± 0.005	0.48 ± 0.004
Tiempo de letargo, t_{lag} (h)	8.0 ± 0.5	6.77 ± 0.24
U g^{-1}_{msf} *	72.4 ± 5.7	81.2 ± 0.51

La actividad fue medida en ambos trabajos por el método de oleato de cobre.

Tabla 9. Diferencias en los métodos de fermentación

Condición	Hernández <i>et al.</i> 2009	Esté trabajo
Concentración del medio	1.5*	1.25*
Temperatura de fermentación	45 °C	40 °C
Tiempo de fermentación	20 h	16 h

El medio de fermentación usado fue el reportado por Rodríguez *et al.* 2006.

En el presente trabajo, la concentración del medio de fermentación reportado por Rodríguez *et al.* (2006) fue concentrado 1.25 veces, debido a que alrededor del 20 % del volumen total es la cantidad de inóculo que se ajustaba a la concentración de esporas necesaria, fijada en 3×10^7 esporas por gramo de soporte (anexo 1). La temperatura de fermentación empleada en este trabajo fue de 40 °C, debido a que Angel (2008) reportó un mejor coeficiente de crecimiento y producción de lipasa a esta temperatura empleando el mismo microorganismo y métodos analíticos (medición de CO_2 y oleato de cobre). Los resultados mostrados en la tabla 8 muestran un pequeño aumento del coeficiente de crecimiento obtenido en este trabajo en comparación con el de Hernández *et al.* (2009). Este dato está relacionado con las condiciones de fermentación, lo que indica que la temperatura y la concentración del medio de fermentación usadas en este trabajo favorecen el crecimiento microbiano en un tiempo de fermentación menor. Además, la producción

de lipasa también se ve favorecida, obteniéndose un 12 % más de actividad lipolítica, con desviaciones estándar menores a las reportadas por Hernández *et al.* (2009).

8.2. Extracción de lipasa extracelular

Se decidió realizar la extracción con una solución amortiguadora de fosfatos 25 mM, pH 7.0, ya que sólo permite extraer la lipasa extracelular. Otra opción era el uso de Triton X-100, sin embargo es ampliamente usado para desorción de lipasas de la matriz y aislamiento de lipasas asociadas con la membrana (Mateos *et al.* 2007), por lo que también se obtendrían lipasas intracelulares. Esto último desviaría el objetivo general de este trabajo, que se centra en las lipasas extracelulares.

8.3. Comparación de métodos de concentración preparativa

En la tabla 10 se muestran los pesos moleculares de las lipasas producidas a partir de varias especies de *Rhizopus*, en general próximas a los 30 kDa. Estos datos permitieron seleccionar el tamaño de corte de la membrana de ultrafiltración.

En las tabla 11 y 12 se muestran los resultados del método de concentración por precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el de ultrafiltración, respectivamente. Se aprecia que el factor de purificación más alto (Fp 3.2) se obtuvo con el método de precipitación fraccionada en un corte de 0 a 70 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en contraste con el

método de ultrafiltración (con el cual se alcanzó un factor de purificación de 1.1 con un corte de 30 kDa).

El método de precipitación fraccionada resultó dar el mejor factor de purificación, en comparación con la ultrafiltración, debido a que la ionización que proporciona al medio el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permite separar con mayor selectividad las lipasas, que presentan alrededor de un 46 % de aminoácidos hidrofóbicos, de acuerdo con lo reportado por Hiol *et al.* 2000. En la tabla 13 se muestra la composición porcentual de los aminoácidos presentes en lipasas producidas por *Rhizopus* sp. Sin embargo, al comparar ambos métodos de concentración preparativa se decidió usar la ultrafiltración (30 kDa) ya que se obtiene la mayor actividad específica (2 U/mg), así como el mayor rendimiento (20 %), además de que el desarrollo del método es más rápido, en comparación con la precipitación.

En los perfiles electroforéticos que se muestran en las figuras 5 y 6 aparece una banda concentrada en el carril 3 y 4 del gel de precipitación y en el carril 4 del gel de ultrafiltración, con un peso molecular aproximado de 30 kDa. Esta banda podría ser la lipasa de interés, dado que como ya se comentó anteriormente otras lipasas purificadas muestran pesos moleculares de alrededor de 30 kDa (Tabla 10).

La obtención de factores de purificación mayores con la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tiene su reflejo en el número de bandas que aparecen en el gel electroforético de los extractos enzimáticos obtenidos con este método de

concentración (Fig. 5). En la figura se puede ver la presencia de bandas más definidas alrededor de 30 kDa en los carriles 3 y 4, que corresponden a los cortes de 0-60 % y 0-70 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente. De igual manera, el factor de purificación relevante del método de ultrafiltración (que corresponde al corte de peso molecular de 30 kDa, Fp 1.1) se refleja en el gel electroforético de las muestras obtenidas mediante ultrafiltración (Fig. 6). En este gel se puede apreciar, en el carril 4 que corresponde al retenido en la membrana de 30 kDa, una banda de alrededor de 30 kDa.

Tabla 10. Pesos moleculares de lipasas reportadas.

Microorganismo	Peso molecular de la lipasa (kDa)
<i>Rhizopus homothallicus</i> (Mateos <i>et al.</i> 2006)	29.5
<i>Rhizopus oryzae</i> (Hiol <i>et al.</i> 2000)	32
<i>Rhizopus chinensis</i> (Yang <i>et al.</i> 2009)	32

Tabla 11. Resultados de precipitación fraccionada.

Muestra	Volumen total (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad* (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación (Fp)
Extracto	114	0,039	4,46	0,017	1,9	0,4	100	1
precipitado 60%	17	0,024	0,41	0,014	0,2	0,6	12,8	1,4
precipitado 65%	5,3	0,005	0,03	0,002	0,01	0,5	0,7	1,1
Extracto	100	0,039	3,91	0,017	1,67	0,43	100,0	1,0
precipitado 70%	3,6	0,022	0,08	0,031	0,11	1,39	6,7	3,2
precipitado 75%	4,3	0,010	0,04	0,004	0,02	0,38	1,0	0,9
precipitado 80%	3,3	0,006	0,02	0,002	0,01	0,44	0,5	1,0

*La actividad fue determinada con el método de **p-NPP**

Tabla 12. Resultados de ultrafiltración con cortes moleculares de 30 y 10 kDa

Muestra	Volumen total (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad* (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación (Fp)
Extracto	228	0,008	1,88	0,016	3,63	1,9	100	1,0
Retenido de 30 kDa	13	0,028	0,36	0,057	0,74	2,0	20	1,1
Retenido de 10 kDa	9,3	0,005	0,04	0,002	0,02	0,2	0,6	0,1

*La actividad fue determinada por el método de **p-NPP**

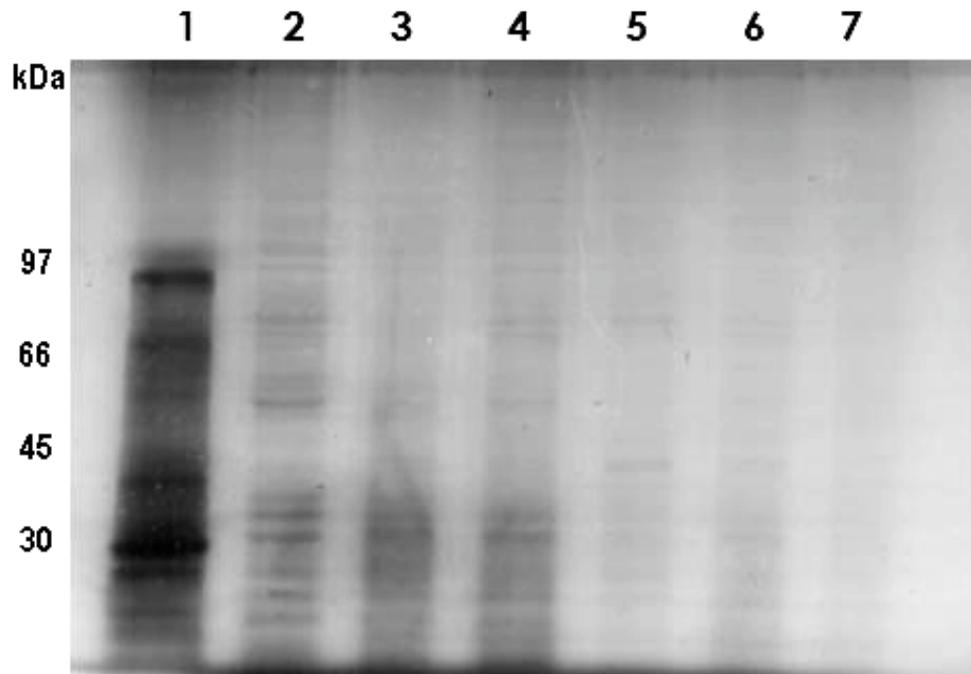


Figura 5. Gel de precipitación

Donde:

1. Marcador de PM
2. Extracto enzimático
3. Precipitado de 0-60%
4. Precipitado de 0-70%
5. Precipitado de 60-65%
6. Precipitado de 70-75%
7. Precipitado de 75-80

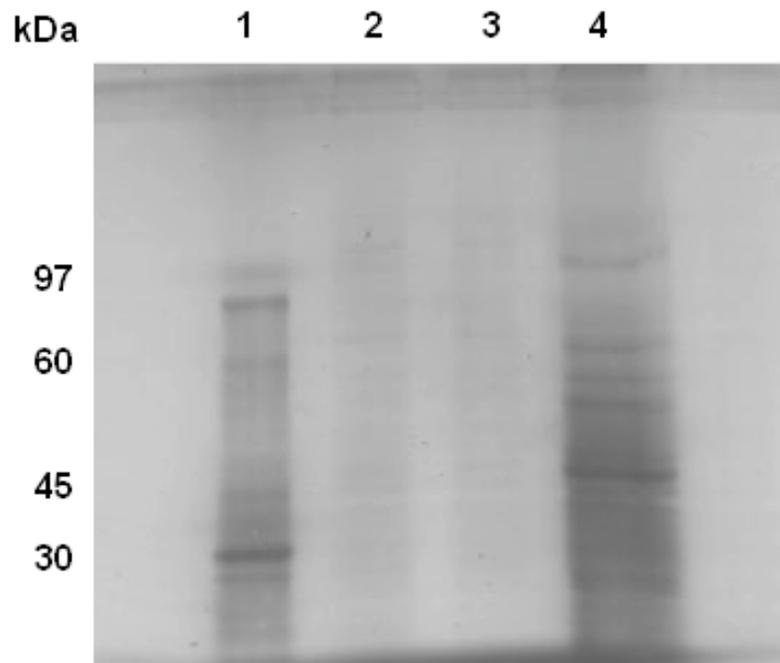


Figura 6. Gel de ultrafiltración

Donde:

1. Marcador de PM
2. Extracto enzimático
3. Retenido en membrana de 10 kDa
4. Retenido en membrana de 30 kDa

Los resultados obtenidos a partir de los métodos de concentración preparativa descritos en la sección 7.6 permitieron establecer como preferente para nuestros intereses el método de concentración del extracto lipolítico basado en la ultrafiltración con membrana de 30 kDa, por ser un método rápido y dar el mayor rendimiento.

8.4. Purificación parcial

8.4.1. Protocolo 1

En la tabla 13 se muestran los resultados de la purificación parcial obtenida con el protocolo 1 de purificación descrito en la sección 7.7.1. Con este método se obtuvo una reducción significativa de proteína del 67 % en el paso de cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH). Se observó que a pesar de que la lipasa no fue retenida en la columna, posiblemente por la concentración de sal usada $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M, se obtuvo un rendimiento del 96 % y un factor de purificación de 10.5. Tomando en cuenta la composición de aminoácidos que conforman la lipasa producida por tres diferentes especies de *Rhizopus* (tabla 15) y la alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos que contienen, una concentración mayor de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguramente favorecería la exposición de los grupos hidrofóbicos de la lipasa. Por otra parte, esto explicaría por qué el corte de 0-70 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el que se usó una concentración de 3.7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fue el que permitió obtener un mayor factor de purificación. Al pasar la muestra con actividad lipolítica recuperada de la CIH por una cromatografía de intercambio aniónico (CIA), se obtuvo una desfavorable disminución, tanto en el rendimiento como en el factor de purificación. La lipasa no se retuvo en la matriz al momento de la carga, y tomando en cuenta el porcentaje de alrededor del 36 % de aminoácidos con carga negativa reportada por Hiol *et al.* (2000), un aumento en la fuerza iónica por encima del punto isoeléctrico (pI) favorecería la interacción de estos grupos aniónicos con la matriz, obteniéndose una mejor separación. Hiol *et al.* (2000) reportaron para *R. oryzae* un pI de 7.6. Por

otra parte está la posibilidad de que a la muestra inyectada en esta última columna (CIA) no se le eliminó por completo la sal presente (se dializó durante 2.5 h, con un recambio), por lo que parte de la lipasa podría encontrarse aglomerada y posiblemente no fue cuantificada.

8.4.2. Protocolo 2

En la tabla 14 se muestran los resultados de la purificación parcial obtenida con el protocolo 2 descrito en la sección 7.7.2. La muestra concentrada por ultrafiltración (UF) no se retuvo en la columna de CIA. Aun así se redujo la cantidad de proteína, dando un rendimiento de 5.5 % y un factor de purificación de 5.8. Las fracciones con actividad lipolítica se pasaron a continuación por una columna de intercambio catiónico (CIC); y en esta ocasión parte de la actividad fue encontrada en el volumen muerto y otra parte se eluyó dentro del gradiente de NaCl 0.1 a 0.3 M. Posiblemente, parte de la lipasa quedó fuertemente unida a la matriz, ya que un 63 % de los aminoácidos que componen las lipasas obtenidas a partir de varias especies de *Rhizopus* tiene carga positiva (tabla 15) y requieren una mayor fuerza iónica para ser despegadas de la matriz. Esto explica el factor de purificación obtenido en este último paso de purificación, que es de 6.0, y el rendimiento obtenido, que es de 4.7. Ambos resultados están muy cercanos a los obtenidos en el paso anterior de cromatografía de intercambio aniónico. En la figura 7 se muestra el gel de electroforesis obtenido con las muestras del concentrado (UF), CIA y CIC recuperadas durante el desarrollo del protocolo 2. Se aprecia una ligera disminución

de bandas, así como la presencia de bandas de alrededor de 30 kDa, que podrían ser la lipasa de interés.

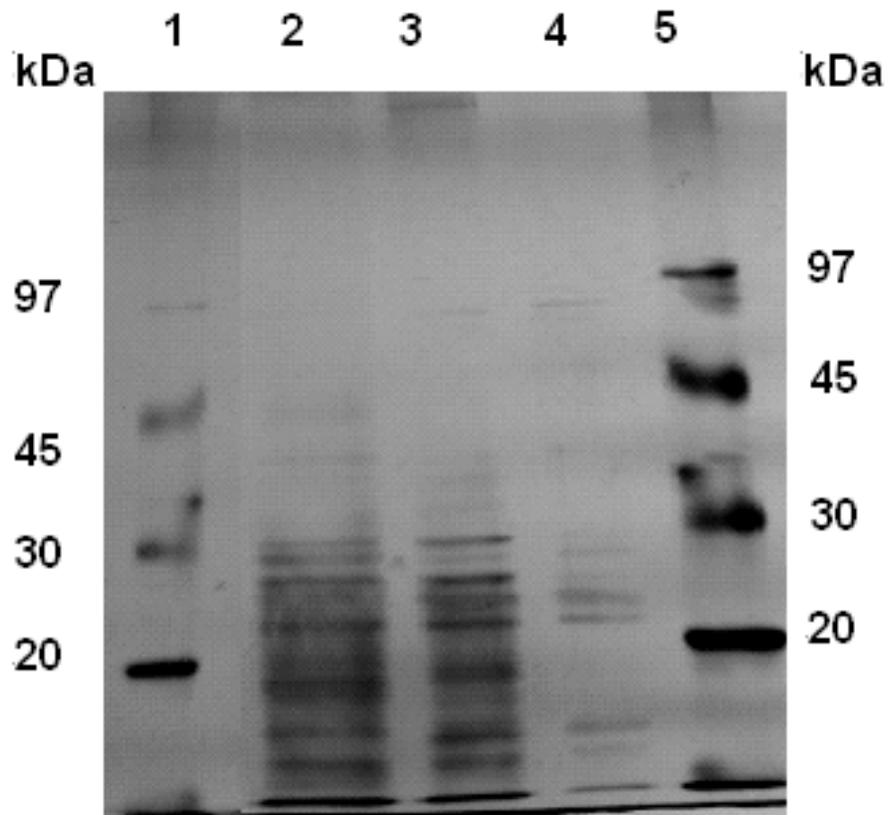


Figura 7. Gel del protocolo 2

Donde:

1 y 5. Marcador de PM

2. Concentrado por UF

3. CIA

4. CIC

Tabla 13. Tabla de purificación parcial con el protocolo 1.

Muestra	Volumen total (mL)	Proteína (µg/mL)	Proteína total (µg)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)*	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto	20	214	4283	4,3	0,112	2,2	0,5	100	1,0
UF	18	160	2880	2,9	0,112	2,0	0,7	90	1,3
CIH	11	36	394	0,4	0,196	2,2	5,5	96	10,5
CIA	2,5	37	92	0,1	0,168	0,4	4,6	19	8,8

*La actividad fue determinada con el método de **p-NPO**

Tabla 14. Tabla de purificación parcial con el protocolo 2.

Muestra	Volumen total (mL)	Proteína (µg/mL)	Proteína total (µg)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)*	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto	892	114	101837	101,8	0,364	324,6	3,2	100	1,0
UF	212	414	87803	87,8	1,526	323,5	3,7	99,6	1,2
CIA	15,8	61,7	974	1,0	1,134	17,9	18,4	5,5	5,8
CIC	35	23	788	0,8	0,434	15,2	19,3	4,7	6,0

*La actividad fue determinada con el método de **p-NP**

Tabla 15. Composición porcentual de amino ácidos de lipasas producidas por varias especies de *Rhizopus**

Amino ácido	<i>R. oryzae</i>	<i>R. delemar</i>	<i>R. niveus</i>
Asn	9	8.9	8.3
Gln	8.3	8.5	9
Ser	9	9.3	8.7
Gly	10.8	8.1	8.3
His	2.1	2.6	2.8
Arg	3.2	3.4	3.5
Thr	10.1	8.5	7.6
Ala	6.9	5.7	5.3
Pro	7.9	5.7	6.5
Tyr	3.5	4.6	4.3
Val	5.3	10.1	11.2
Met	0.3	0.3	0.3
Ileu	5.4	6.7	6.2
Leu	7.6	6.2	6.5
Phe	6.1	5.7	5.7
Lys	4.6	5.7	5.8
Hidrofóbicos	39.5	40.4	40.7
Carga (-)	37.0	36.6	35.3
Carga (+)	63.1	63.4	64.7

* Hiol et al. 2000

8.5. Determinación de actividad lipasa

8.5.1. Selección del método de determinación de actividad lipasa

Se analizaron los resultados obtenidos de actividad lipolítica por gramo de materia seca fermentada (**msf**), para determinar cuál convenía usar. Los parámetros que resultan ser claves en la selección son: la cantidad de muestra requerida (proteína), el tiempo requerido para el ensayo, el tiempo de reacción y la actividad lipolítica obtenida. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Comparación de métodos analíticos de actividad lipolítica

Método	Tiempo de ensayo (min)**	Proteína requerida (mg/mL)	Tiempo de reacción (min)	Actividad lipasa* (U/g _{msf})
Oleato de cobre	80	0.03	0.6	81.2 ± 0.51
p-nitrofenol palmitato (p-NPP)	30	0.004	10	0.2 ± 0.0
p-nitrofenol octanoato (p-NPO)	30	0.002	3	0.007 ± 0.0
pH stat	60	0.17	5	92.5 ± 3.5

* medida por duplicado

** Tiempo que se requiere para completar un ensayo, desde la preparación de la muestra

El método de **p-NPO** resultó ser el más conveniente, ya que además de que utiliza menor concentración de proteína, el tiempo de reacción es más corto y presenta menor desviación estándar. Además es un método no tóxico, en comparación con el del oleato de cobre.

8.5.2. Tipo de sustrato lipolítico y uso de Triton X-100

Se realizaron tres ensayos para evaluar el efecto del tipo de sustrato lipolítico y el uso de Triton X-100 sobre la actividad lipasa, utilizando alícuotas de una misma muestra de un concentrado con 0 a 75 % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En un primer caso se ensayó con el método de **p-NPP**. En un segundo caso se usó el mismo método pero se cambió el sustrato lipolítico por p-nitrofenil octanoato. Y en un tercer caso también se usó p-nitrofenil octanoato, adicionando 0.0012 % p/v Triton X-100 (anexo 7). Los resultados se muestran en la tabla 17:

Tabla 17. Efecto del tipo de sustrato lipolítico y Triton X-100 en la actividad lipasa

Sustrato	Muestra	U/mL*
p-NPP	Concentrado s/Triton X-100	0.009
p-NPO	Concentrado s/Triton X-100	0.050
p-NPO	Concentrado c/Triton X-100	0.064

La actividad fue medida con el método de **p-NPP**, pero cambiando el sustrato como lo indica la tabla

La afinidad por el sustrato p-nitrofenil octanoato es 5.5 veces mayor que por el p-nitrofenil palmitato y se observó un 28 % de aumento en la actividad cuando se utiliza Triton X-100.

8.5.3. Perfil de temperatura y pH óptimos

En la figura 8 se muestra el efecto de la temperatura y pH en la actividad lipasa. Este ensayo fue realizado usando la lipasa parcialmente purificada obtenida por el protocolo 2 (sección 9.2).

Se observa que la actividad se ve favorecida cuando la reacción es llevada a cabo a 40 °C y pH 7.0. Angel *et al.* 2008 determinaron la influencia de la temperatura en la actividad lipolitica de la materia seca fermentada obtenida de *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (la misma cepa que se usó en este trabajo) y encontraron que a 40 °C la actividad es mayor. Con respecto al pH, se observó que la actividad lipasa es inhibida por debajo de pH 5 y por arriba de pH 8.0.

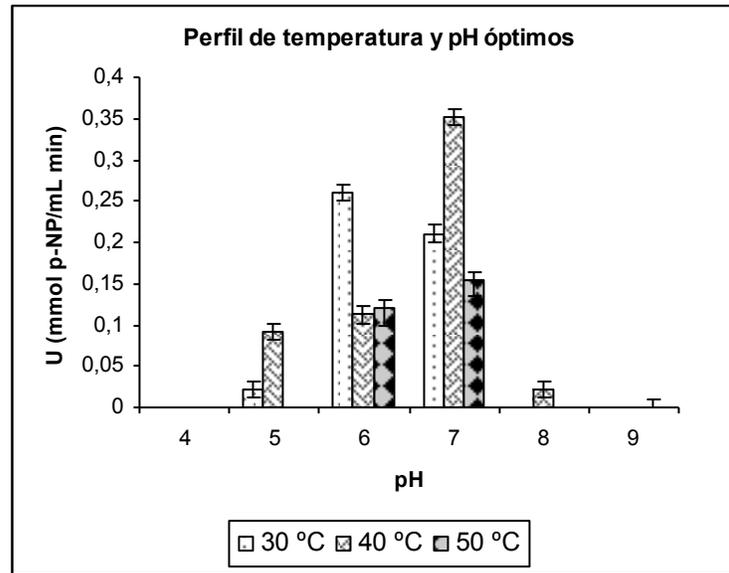


Figura 8. Perfil de temperatura y pH

8.6. Efecto del tiempo de diálisis en la determinación de actividad

lipasa

Para medir actividad lipolítica por el método de **p-NPP** debe previamente eliminarse la concentración de sal presente en la muestra. Utilizando una muestra del concentrado por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 75 % de saturación, se tomaron tres alícuotas y se dializaron durante diferentes tiempos. En la tabla 18 se muestran los resultados.

Tabla 18. Efecto del tiempo de diálisis de la determinación de actividad lipolítica

Muestra	Tiempo (h)	U/mL*
Extracto	Sin dializar	0.0025
Concentrado (NH ₄) ₂ SO ₄ 0-75 % de saturación	8	0.0093
Concentrado (NH ₄) ₂ SO ₄ 0-75 % de saturación	31	0.0022
Concentrado (NH ₄) ₂ SO ₄ 0-75 % de saturación	41	0.0000

La actividad fue medida con el método de **p-NPP**

Estos resultados muestran que conforme el tiempo de diálisis aumenta disminuye la actividad lipolítica. Posiblemente, al permanecer un mayor tiempo en diálisis, la lipasa es desnaturalizada por las fuerzas de atracción ión–dipolo que se ejercen entre la solución amortiguadora de fosfatos y los aminoácidos que conforman la lipasa. En el anexo 8 se muestran los cálculos de U/mL de la tabla 18.

9. CONCLUSIONES

Con las modificaciones hechas en la condiciones de producción de lipasas a partir de *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (utilizando un medio de cultivo 1.25 veces concentrado, 40 °C y 16 h de fermentación) se obtuvo un 12 % más de actividad lipolítica por gramo de materia seca fermentada, en comparación con la concentración usada por Hernández *et al.* (2009).

Con el protocolo 2 de purificación parcial, que implica la concentración por ultrafiltración del extracto crudo lipolítico, un paso de CIA y un paso de CIC se logró la purificación parcial de la lipasa.

La lipasa producida por fermentación en medio sólido a partir de *R. microsporus* var. *chinensis* fue purificada 6.0 veces, con un rendimiento de recuperación del 4.68 % con el protocolo 2. Mientras, con el protocolo 1 se obtuvo un factor de purificación de 8.8 y un rendimiento del 19%.

La lipasa producida tiene mayor afinidad por el sustrato p-nitrofenil octanoato que por p-nitrofenil palmitato y el uso de Triton X-100 0.0012 % p/v favorece en un 28 % la actividad lipolítica.

La lipasa parcialmente purificada por el protocolo 2 presentó un pH óptimo de 7.0 y una temperatura óptima de 40 °C.

El tiempo de diálisis debe ser menor o igual a 8 h, para conservar la mayor actividad lipolítica.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda el aumento de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M para favorecer la exposición de los grupos hidrofóbicos de la lipasa y así lograr la unión de la lipasa a la matriz de la columna hidrofóbica (HiTrap Phenyl (High sub)) dado que esta columna se caracteriza por ser fuertemente hidrofóbica.

El determinar el punto isoeléctrico de la lipasa contribuiría a determinar el pH adecuado de las soluciones amortiguadoras para favorecer las interacciones tanto aniónicas como catiónicas en las cromatografías de intercambio iónico.

11. BIBLIOGRAFÍA

Angel C R. (2008). Estudios de crecimiento y producción de lipasas por hongos termotolerantes. Tesis de Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.

Anguita J, Rodriguez A, Naharro G. (1993). Purification, gene cloning, amino acid sequencing analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:2411-2417.

Aoyama S, Yoshida N, Inouya S. (1988). Cloning, sequencing and expression of lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFD-12049 in *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 242: 36-40.

Arroyo M, Sánchez M, Sinisterra J. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 3-12.

Balcão V, Kennippen A, Malcata F, Kalo P. (1998). Lipase catalyzed acidolysis of butter fat with oleic acid: characterization of process and product. *Enzyme and Microbial Technology*. 33:118–128.

Beisson F, Tiss A, Rivière C, Verger R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 102: 133-153.

Becker P, Abu-Reesh I, Markossian S, Antranikian G, Markl H. (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. [HI-9] on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42: 184-90.

Beer H, McCarthy J, Bornscheuer U, Schmid R. (1998). Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1399: 173-180.

Berto P, Belingheri L, Dehorter B. (1997). Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnology Letters*. 19: 533-536.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brocca S, Schmidt D, Lotti M, Alberghina L, Schmid R. (1998). Design, total synthesis and functional over expression of the *Candida rugosa* lip 1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science*. 7: 1415-1422.

Brush T, Chapman R, Kurzman R, Williams D. (1999). Purification and characterization of extracellular lipase from *Ophiostoma piliferum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 10: 2131-2138.

Chahinian H, Vanot G, Ibrik A, Rugani N, Sarda L, Comeau L. (2000). Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64: 215-222.

Chakraborty K, Paulraj R. (2009). Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 3859-3866.

Chen H, Hsiao K, Wu S, Wang K. (1995). Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*. 17: 305-308.

Chen J, Wen C, Chen T. (1999). Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnology and Bioengineering*. 62: 311-316.

Costa M, Peralta R. (1999). Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *Journal of Basic Microbiology*. 39: 11–15.

Dellamora O, Martins R, Rocha W, Dias A. (1997). Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 26: 31-37.

Dharmsthiti S, Ammaranond P. (1997). Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 26: 111-116.

Diogo M, Silva M, Cabral J, Queiroz J. (1999). Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilized on sepharose. *Journal of Chromatography A*. 849: 413-419.

Doelle H W, Mitchell D A, Rolz C E. (1992). Solid substrate cultivation. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York. pp: 1-16.

Dong H, Gao S, Han S, Cao S. (1999). Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 30: 251-256.

Elibol M, Ozer D. (2001). Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*. 36:325-329.

El Khattabi M, Van Gelder P, Bitter W, Tommassen J. (2000). Role of the lipase specific foldase of *Burkholderia glumae* as a stearic chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 26885-26891.

El-Shafei H, Rezkallah L. (1997). Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. *Research in Microbiology*. 52: 199-208.

El-Sawah M, Sherief A, Bayoumy S. (1995). Enzymatic properties of lipase and characteristic production by *Lactobacillus delbrueckii* sub species *bulgaricus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 67: 356-362.

Espinosa E, Sanchez S, Farres A. (1990). Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBBH313. *Biotechnology Letters*. 12: 209-214.

Essamri M, Valerie D, Louis C. (1998). Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *Journal of Biotechnology*. 60: 97-103.

Farrell A, Foster T, Holland K. (1993). Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of General Microbiology*. 139: 267-277.

Frenken L, Egmond M, Batenburg A, Verrips C. (1993). *Pseudomonas glumae* lipase: increased proteolytic stability by protein engineering. *Protein Engineering*. 6: 637-642.

Gervais P, Molin P. (2003). The role of water in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 85-101.

Ghosh P, Saxena T, Gupta R, Yadav R, Davidson S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science progress*. 79: 119-157.

Godtfredsen S. (1990) Microbial lipases. In: Fogarty WM, Kelly CT. *Microbial enzymes and biotechnology*. 2nd ed. London: Elsevier Applied Science. pp: 255-274.

Gowland P, Kernick M, Sundaram T. (1987) Thermophilic bacterial isolates producing lipase. *Federation of European Microbiological Societies Letters*. 48: 339-343.

Guillou C, Merieau A, Trebert B, Michel J. (1995). Growth temperature is involved in the regulation of extracellular lipase at two different levels in *Pseudomonas fluorescens* strain MFO. *Biotechnology Letters*. 17: 377-382.

Haas M J, Bailey. D G, Baker W. (1999). Biochemical and molecular biological characterization of a lipase produced by the fungus *Rhizopus delemar*. *Fett-Lipid*. 101: 364-370.

Hasan F, Ali S A, Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235-251.

Haas M, Cichowicz D, Bailey D. (1992). Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids*. 27: 571-576.

Hegedus D, Khachatourians G. (1988). Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnology Letters*. 10: 637-642.

Helisto P, Korpela T. (1998). Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkonate esters method. *Enzyme and Microbial Technology*. 23: 113–117.

Hernández R B, Córdova J, Bárzana E, Favela E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10.1016.

Hiol A, Jonzo M, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau L. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 421-430.

Hou C. (1994). pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. *Journal of Industrial Microbiology*. 13: 242-248.

Hsu A, Foglia T, Shen S. (2000). Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix: effectiveness as a biocatalyst. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31: 179-183.

Ishihara H, Okumura H, Ikezawa H, Tejima S. (1975). Studies on lipase from *Mucor javanicus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 388: 413-417.

Ito T, Kikuta H, Nagamori E, Honda H, Ogino H, Ishikawa H, Kobayashi T. (2001). Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91: 245-250.

Jaeger K, Reetz T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16: 396-403.

Janssen P, Monk C, Morgan H. (1994). A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp. and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *Federation of European Microbiological Societies Letters*. 120: 195-200.

Jurado E, Camacho F, Luzón G, Fernández S M, García R M. (2006). Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in o/w emulsions. *Chemical Engineering Science*. 61: 5010-5020.

Kaminishi Y, Tanie H, Kimimoto M. (1999). Purification and characterization of lipases from *Aspergillus repens* and *Eurotrium herbariorum* NU-2 used in “Katsuobushi” molding. *Fisheries Science*. 65: 274-278.

Kamiya N, Gotto M. (1998). Preparation of surfactant coated lipases utilizing the molecular imprinting technique. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85: 237-239.

Kennedy M, Rennarz W. (1979). Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* and its relationship to a membrane bound lipase found in a mutant strain. *The Journal of Biological Chemistry*. 254: 1080-1089.

Kim H, Park S, Lee J, Oh T. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62: 66-71.

Klein R, King G, Moreau R, Haas M. (1997). Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling. *Lipids*. 32: 123-130.

Kohno M, Enatsu M, Yoshiizumi M, Kugimiya W. (1999). High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. *Protein Expression and Purification*. 15: 327-335.

Kohno M, Funatsu J, Mikami B, Kugimiya W, Matsuo T, Morita Y. (1996). The crystal structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2.2 Å resolution. *The Journal of Biochemistry*. 120: 505-510.

Kohno M, Kugimiya W, Hashimoto Y, Morita Y. (1994). Purification, characterization, and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. *Bioscience. Biotechnology. Biochemistry*. 58: 1007-102.

Kwon D, Rhee J. (1986). A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 63: 89-92.

Lacointe C, Dubreucq E, Galzy P. (1996). Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnology Letters*. 18: 869-874.

Lagunas B I, García A B, Castaño T E, Regalado G C, Ávila G. (2006). Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda. *Veterinaria México*. 37: 1-13.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lang D, Mannesse M, De Haas G, Verheij H, Dijkstra B. (1998). Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *European Journal of Biochemistry*. 254: 333-340.

Lee C, Yandolo J. (1986). Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a into the lipase structural gene. *The Journal of Bacteriology*. 166: 385-391.

Lee D, Kok Y, Kim K, Kim B, Choi H, Kim D, Suhartono MT, Pyun Y. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Federation of European Microbiological Societies Letters*. 179: 393-400.

Lee S, Rhee J. (1993). Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*. 15: 617-624.

Lin S, Chiou C, Yeh C, Tsai Y.(1996). Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1093-1095.

Liu Z, Chi. Z, Wang L, Li J. (2008). Production and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal*. 40: 445-451.

Long K, Ghazal H, Ariff A, Man Y, Bucke C. (1998). Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* link. *Biotechnology Letters*. 20: 369-372.

Lotrakul P, Dharmsthiti S. (1997). Lipase production by *Aeromonas sorbia* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 163-166.

Macedo G, Park Y, Pastor G. (1997). Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista de Microbiología*. 28: 90-95.

Manco G, Adinolfi E, Pisani F, Ottolina G, Carrea G, Rossi M. (1998). Overexpression and properties of a new thermophilic and the thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily. *Biochemical Journal*. 15: 203-212.

Maragoni A. (1994). *Candida* and *Pseudomonas* lipase catalyzed hydrolysis of butter oil in the absence of organic solvents. *Journal of Food Science*. 59: 1096-1099.

Mateos J, Rodríguez J, Roussos S, Cordova J, Abousalham A, Carriere F, Baratti J. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 1042-1050.

Mateos J, Cordova J, Baratti J, Carrier F, Abousalham A (2007). Effect of nonionic surfactants of *Rhizopus homothallicus* lipase activity. *Molecular Biotechnology*. 35: 205-214.

Mayordoma I, Randez G, Prieto J. (2000). Isolation, purification and characterization of a cold active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 105-109.

Meens J, Herbort M, Klein M, Freudl R. (1997). Use of the pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A prevents proteolytic degradation of Omp A by cell associated proteases in two different Gram positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2814-2820.

Mencher J, Alford J. (1967). Purification and characterization of the lipase of *Pseudomonas fragi*. *Journal of General Microbiology*. 48: 317-28.

Merek A, Bednasski W. (1996). Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi. *Biotechnology Letters*. 18: 1155-1160

Meyers S, Cuppett S, Hutkins R. (1996). Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology*. 13: 383-389.

Miyazawa T, Yukawa T, Chezi S, Yanagihara R, Yamada T. (1998). Resolution of 2-phenoxy-1-propanols by *Pseudomonas* species lipase catalyzed highly enantioselective transesterification: influence of reaction conditions on the enantioselectivity toward primary alcohol. *Biotechnology Letters*. 20: 235-238.

Nakashima T, Fukuda H, Kyotani S, Morikawa H. (1988). Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *Journal of Fermentation Technology*. 66: 441-448.

Nawani N, Kaur J. (2000). Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 206: 91-96.

Noble M, Cleasby A, Johsen L, Egmond M, Frenken L. (1994). Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. *Protein Engineering*. 7: 559-562.

Ohnishi K, Yoshida. Y, Sekiguchi J. (1994a). Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 77: 490-495.

Okeke C, Okolo B. (1990). The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnology Letters*. 12: 747-750.

Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris B. (1992). Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*. 14: 397-402.

Pencreac'h G, Baratti J. (1996). Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 417-422.

Petrovic S, Skrinjar M, Becarevic I, Banka L. (1990). Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol Lett*. 12: 299-304.

Pignede G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud J. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Bacteriology*. 182: 2802-2810.

Plou F, Ferrer M, Nuero O, Calvo M, Alcalde M, Reyes F, Ballesteros A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol Techniques*. 12: 183-186.

Rantakyla M, Alkio M, Paltonen O. (1996). Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase. *Biotechnology Letters*. 18: 1089-1094.

Rapp P. (1995). Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* sp. *vasinfectum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17: 832-838.

Rees G, Robinson B. (1995). Esterification reactions catalysed by *Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsion system. *Biotechnology and Bioengineering*. 45: 344-345.

Reetz M, Jaeger K. (1998). Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 93: 3-14.

Rodríguez J, Mateos J, Nungaray J, González V, Bhagnagar T, Roussos S, Cordova J, Baratti J. (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 41: 2264-2269.

Rohit S, Yusuf C, Uttam C. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.

Rua M, Schmidt D, Wahl S, Sprauer A, Schimide R. (1998) Thermo alkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*. 56: 89-102.

Satayanarayan T, Johri B. (1981). Lipolytic activity of thermophilic fungi of paddy straw compost. *Current Science*.50: 680–682.

Saucedo C, Trejo H, Lonsane B, Navarro J, Roussos S, Dufour D, Raimbault M. (1994) Online automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid state fermentations. *Process Biochemistry*. 29: 13-24.

Saxena R K, Sheoran A, Giri B, Sheba W. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*. 52: 1-18.

Schmid R D, Verger R. (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International*. 37: 1608-1633.

Sharma R, Chisti Y, Chand U. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.

Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, Ogawa H, Kato Y. (1998). Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 304-307.

Sidhu P, Sharma R, Soni S, Gupta J. (1998a). Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. *Folia Microbiologica*. 43: 51-54.

Sidhu P, Sharma R, Soni S, Gupta J. (1998b) Effect of cultural conditions on extracellular lipase production by *Bacillus* sp. RS-12 and its characterization. *Indian Journal of Microbiology*. 38: 9-12.

Simons J, Van Kampen M, Riel S, Gotz F, Egmond M, Verhey H. (1998). Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis* comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *European Journal of Biochemistry*. 253: 675-683.

Sommer P, Bormann C, Gotz F. (1997). Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3553-3560.

Sugihara A, Schno T, Enoki A, Shimada Y, Nagao T, Tominaga Y. (1995). Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. Applied Microbiology and Biotechnology. 43: 277-281.

Sugihara A, Shimada Y, Nakamura M, Nagao T, Tominaga Y. (1994). Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipase. Protein Engineering. 7: 585-588.

Sztajer H, Maliszewska I. (1989). The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. Biotechnology Letters. 11: 895-898.

Sztajer H, Maliszewska I, Wieczorek J. (1988). Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. Enzyme and Microbial Technology. 10: 492-497.

Tahoun M, E-Kady I, Wahba A. (1985). Production of lipases from microorganisms. Federation of European Microbiological Societies Letters. 28: 133-139.

Takahashi S, Ueda M, Atomi H, Beer H, Borncheuer U, Schmid R, Tanka A. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 86: 164-168.

Talon R, Dublet N, Montel M, Cantonnet M. (1995). Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. Current Microbiology. 30: 11-16.

Van Kampen M, Simons J, Dekker N, Egmond M, Verheij H. (1998). The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 93: 39-45.

Van Oort M, Deveer A, Dijkman R, Tjeenk M, Verheij H, De Haas G, Wenzig E, Gotz F. (1989). Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry*. 28: 9278-9285.

Viniegra G, Favela E, Aguilar C, Rómero S, Díaz G, Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 157-167.

Weber N, Klein E, Mukerjee K. (1999). Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalyzed by microbial lipases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 401-404.

Xie Y, Liu H, Chen J. (1998). *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification of racemic ibuprofen and chemical hydrolysis of S-ester formed. *Biotechnology Letters*. 20: 455-458.

Yang J, Kobayashi K, Iwasaki Y, Nakano H, Yamane T. (2000). In vitro analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI 56 lipase. *The Journal of Bacteriology*. 182: 295-302.

Yang S, Xu Y, Wang D. (2009). Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. *Bioresource Technology*. 100: 2607-2612.

Yee L, Akoh C, Phillips R. (1995). Terpene ester synthesis by lipase catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*. 17: 67-70.

Yeo S, Nihira T, Yamada Y. (1998) Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp. YY62 which hydrolyzes t-butyl esters effectively. *Journal of General Microbiology*. 44: 147-152.

ANEXOS

Anexo 1. Producción de lipasa

Cada 20 g de materia húmeda (**mh**) contienen un 40 % de agrolita y un 60 % p/p dividido entre un 80 % de medio de cultivo y un 20 % de inóculo p/p. Para el ajuste de humedad final de la **mh** (55 %H), se consideró la densidad del inóculo como 1, para todos los lotes de fermentación realizados.

En este trabajo se usó el medio reportado por Rodríguez *et al.* 2006, que se muestra en las tablas 19 y 20.

Tabla 19: Medio de fermentación para producción de lipasas (Rodríguez *et al.* 2006)

Componente del medio	Cantidad (g/L)
Aceite de oliva	40
Urea	4
Lactosa	5
K ₂ HPO ₄	5
MgSO ₄	1
Alcohol polivinílico (PVA)	1.6
Solución de oligoelementos	4

Tabla 20. Solución de oligoelementos (Rodríguez *et al.* 2006)

Oligoelemento	4 mL de solución de oligoelementos contienen:
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.98 g/L
CoSO ₄ ·7H ₂ O	2.81 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29 g/L
EDTA	10 g/L

Anexo 2. Curva estándar de albúmina bovina sérica (BSA)

Las concentraciones de **BSA** que muestran en la tabla 21 fueron determinadas con el microensayo Bradford (Bio-Rad Dye Reagent), de acuerdo con las indicaciones del manual. En esta misma tabla se indica la lectura de absorbancia, que fue determinada a 595 nm.

Tabla 21. Resultados de curva patrón de BSA

$\mu\text{g BSA/mL}$	abs	abs	Promedio (abs)	\square	%Error
0	0	0	0	0,00	0
200	0,095	0,134	0,115	0,03	24.08
400	0,247	0,225	0,236	0,02	6.59
600	0,328	0,345	0,337	0,01	3.57
800	0,417	0,442	0,430	0,02	4.12
1000	0,589	0,588	0,589	0,00	0.12

Con los resultados de la tabla anterior se graficó la siguiente curva (Figura 9)

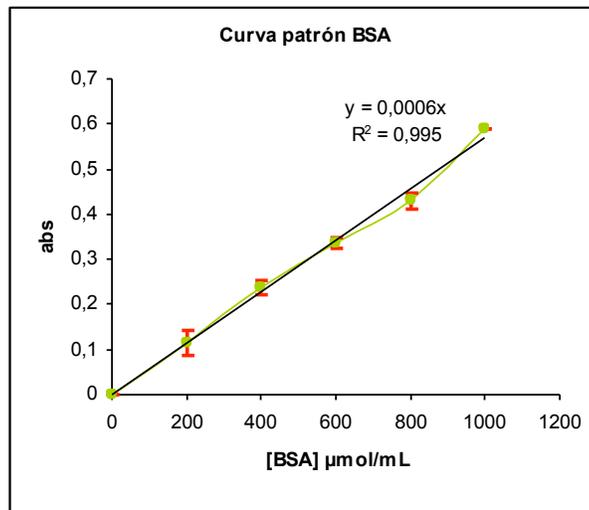


Figura 9. Curva patrón de BSA

Anexo 3. Curva estándar de ácido oleico

Para la curva estándar se prepararon las concentraciones mostradas en la tabla 22:

Tabla 22. Elaboración de curva estándar de ácido oleico

n-heptano (mL)	Solución 20 mM Ác. oléico (mL)	Concentración de ácido oléico (mmol/L)
2.5	0.0	0
2.0	0.5	4
1.5	1.0	8
1.0	1.5	12
0.5	2.0	16
0.0	2.5	20

Se adicionaron a cada concentración 0.5 mL de solución de acetato de cobre-piridina y se agitó en vórtex durante 30 s, determinándose la absorbancia a 715 nm.

Del desarrollo de la curva estándar se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 23:

Tabla 23. Resultados de curva estándar de ácido oleico

Ác. oleico (mmol/mL)	Abs	Abs	Promedio (Abs)	□	% Error
0	0.032	0.029	0.030	0.002	6.80
4	0.369	0.379	0.374	0.007	1.87
8	0.810	0.683	0.747	0.090	12.06
12	0.993	1.027	1.010	0.024	2.37
16	1.179	1.268	1.224	0.063	5.13
20	1.613	1.617	1.615	0.003	0.16

Tras graficar los promedios de las absorbancias para cada concentración de ácido oleico, se obtuvo la siguiente curva (figura 10):

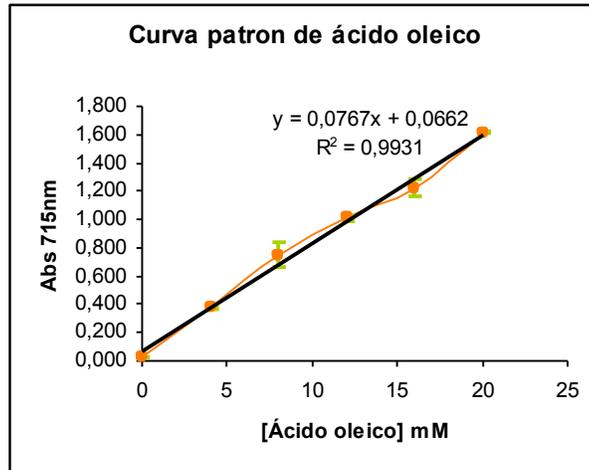


Figura.10. Curva estándar de ácido oleico

Anexo 4. Curva estándar de p-nitrofenol (p-NP) utilizada en el método p-NPP.

Fueron prepararon las siguientes soluciones:

Solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM / alcohol polivinilico (PVA) 0.25 % p/v, pH 8.

Solución de p-nitrofenol (**p-NP**) en 2-propanol 0.08 $\mu\text{mol/mL}$ (solución A).

Se prepararon las diluciones de **p-NP** que se muestran en la tabla 24 y se determino la absorbancia a 405 nm a 40 °C.

Tabla 24. Diluciones para la curva estándar de **p-NP**

Solución A (mL)	100 mM Buffer Tris-HCl con 0.25% PVA (mL)	Concentración de p-NP ($\mu\text{mol/mL}$)
*0	0.5	0
0.5	0.5	4,00E-02
0.25	0.75	2,00E-02
0.125	0.875	1,00E-02
0.062	0.938	5,00E-03
0.031	0.969	2,50E-03
0.016	0.984	1,25E-03
0.008	0.992	6,25E-04

*Es el blanco, se sustituyo la solución A por solución amortiguadora fosfato de sodio 25 mM.

Del desarrollo de la curva estándar se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 25:

Tabla 25. Resultados de la curva estándar de p-NP

$\mu\text{mol/ mL}$	Abs	Abs	Promedio (abs)	\square	%Error
0	0,002	0,002	0,000	0,003	0
6,25E-04	0,011	0,013	0,012	0,001	11.79
1,25E-03	0,015	0,010	0,013	0,004	28.28
2,50E-03	0,025	0,031	0,028	0,004	15.15
5,00E-03	0,042	0,047	0,045	0,004	7.95
1,00E-02	0,081	0,087	0,084	0,004	5.05
2,00E-02	0,162	0,174	0,168	0,008	5.05
4,00E-02	0,345	0,360	0,353	0,011	3.01

Las absorbancias obtenidas en cada dilución se graficaron y se obtuvo la siguiente curva estándar.

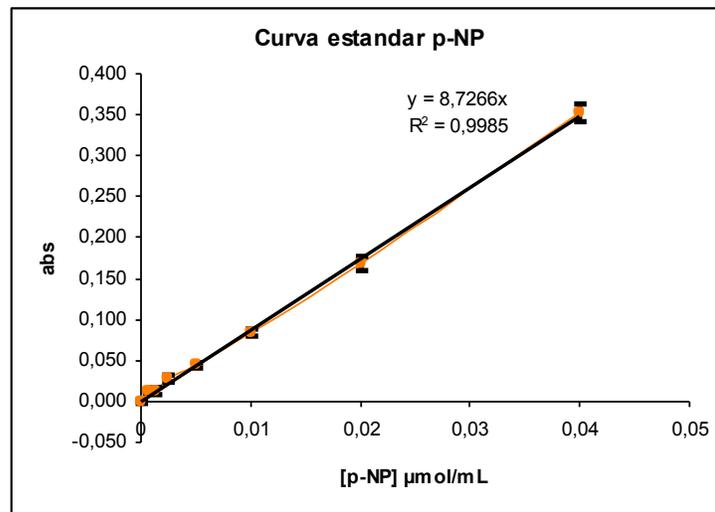


Figura 11. Curva estándar de p-NP

Anexo 5. Curva estándar de p-nitrofenol (p-NP) utilizada en el método p-NPO.

I. Curva estándar

La curva fue hecha a partir de una solución 0.2 mM **p-NP** disuelto en 2- propanol. Se prepararon las diluciones de acuerdo con la tabla 26.

Tabla 26. Diluciones para la curva estándar de **p-NP**

mL de solución de p-NP	mL de agua destilada	mM p-NP
0*	*	
0.362	3.517	0.0187
0.863	3.069	0.0439
1.320	2.568	0.0679
1.732	2.058	0.1683
2.588	1.012	0.1438
2.880	0.506	0.170

*El blanco fue preparado con 1:1 v/v agua: 2-propanol

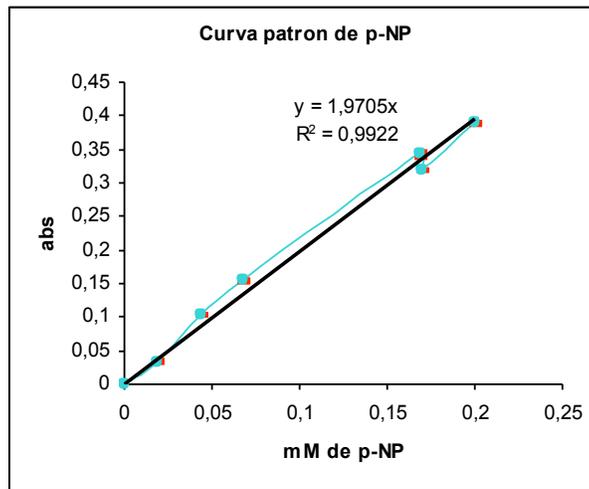
A las diluciones anteriores se les determinó su absorbancia a 410 nm

Las absorbancias obtenidas de diluciones de p-NP se muestran en la tabla 27:

Tabla 27. Resultados de la curva estándar de p-NP

mM p-NP	abs	abs	promedio (abs)	□	%Error
0	0		0		
0,0187	0,032	0,034	0,033	0,001	4.29
0,0439	0,103	0,104	0,1035	0,001	0.68
0,0679	0,153	0,156	0,1545	0,002	1.37
0,1683	0,34	0,345	0,3425	0,004	1.03
0,1700	0,318	0,318	0,318	0,000	0,00
0,2000	0,388	0,39	0,389	0,001	0,36

La figura 12 muestra la curva estándar de **p-NP** graficada con los datos de la tabla anterior.

**Figura. 12. Curva estándar de p-NP**

Anexo 6. Fermentación en medio sólido.

En la tabla 29 se muestra la producción en gramos de materia fermentada obtenida a partir de 6 lotes de fermentación y las características de cada lote de fermentación.

Tabla 29. Fermentación en medio sólido

Lote de fermentación	No. de columnas	Gramos de materia húmeda fermentada	Gramos de materia seca fermentada	Observaciones
1	10	195.07	84.7	Fd*=25 y sin concentrar medio de fermentación
2	10	193.2	83.8	Falto adicionar agua de balance del inóculo
3	10	185.4	90.8	**
4	10	196.7	87.6	**
5	4	99.09	44.78	** El tiempo de esporulación fue de 3 días
6	5	88.58	39.60	** El tiempo de esporulación fue de 3 días
Blanco***	1	18.28	8.07	**
Blanco***	1	19.57	8.50	**
Total	51	995.89	447.85	

*Fd, Factor de dilución del inóculo

** El medio de fermentación se concentro 1.25 veces más

*** Para la fermentación blanco no se inoculo el medio de fermentación

Anexo 7. Tipo de sustrato lipolítico y uso de triton X-100

En la figura 13 se muestra la tasa de aparición de **p-NP**, utilizando el método de **p-NPP**. Se analizó la afinidad por dos sustratos: el p-nitrofenil palmitato (que es el sustrato original en el método descrito en este documento) y el p-nitrofenil octanoato, como sustrato a comparar. También se ensayó el uso de Triton X-100 en una concentración de 0.0012 % p/v, junto con el sustrato que mostró ser mas afín al sitio catalítico.

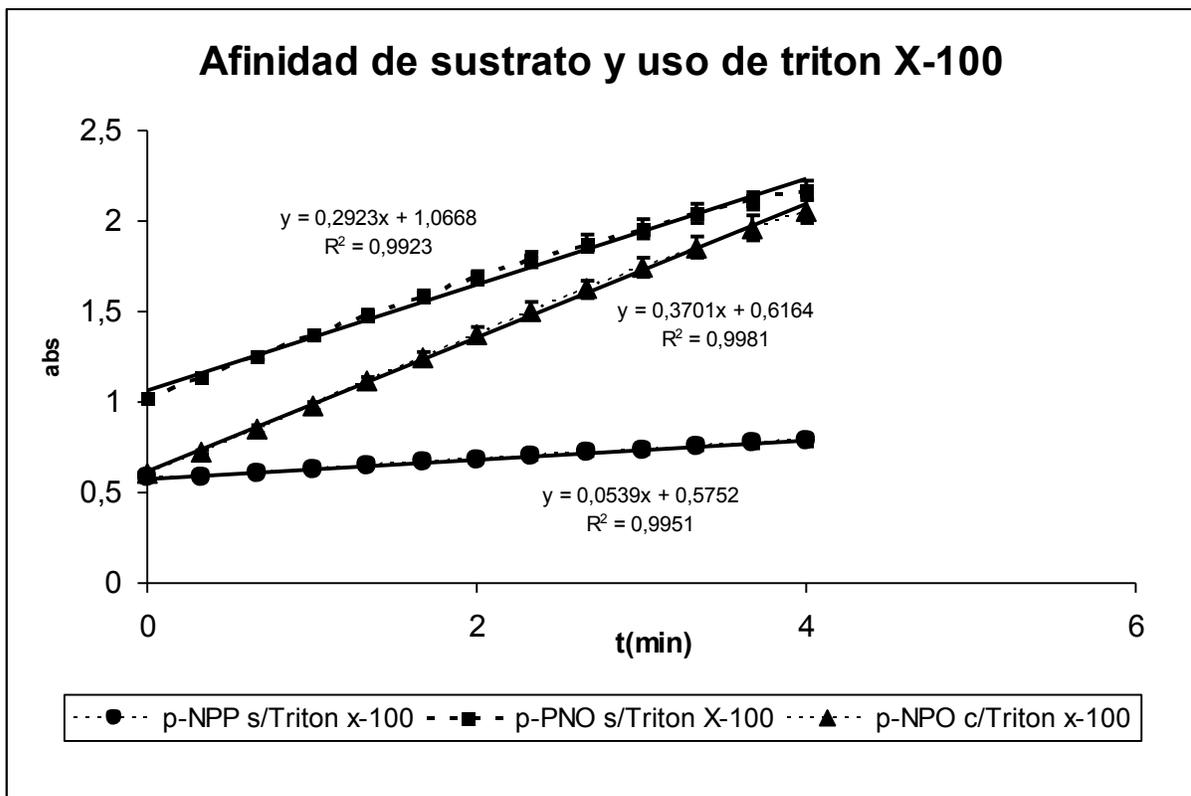


Figura 13. Velocidad de aparición de producto (**p-NP**) utilizando dos sustratos y Triton X-100

Anexo 8. Efecto del tiempo de diálisis

La figura 14 muestra las velocidades de aparición de **p-NP** obtenidas usando el método de **p-NPP**. Se compara el efecto que causó el tiempo de diálisis para eliminar la concentración de sal de una muestra concentrada tras precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, con un corte de saturación de 0 a 70%.

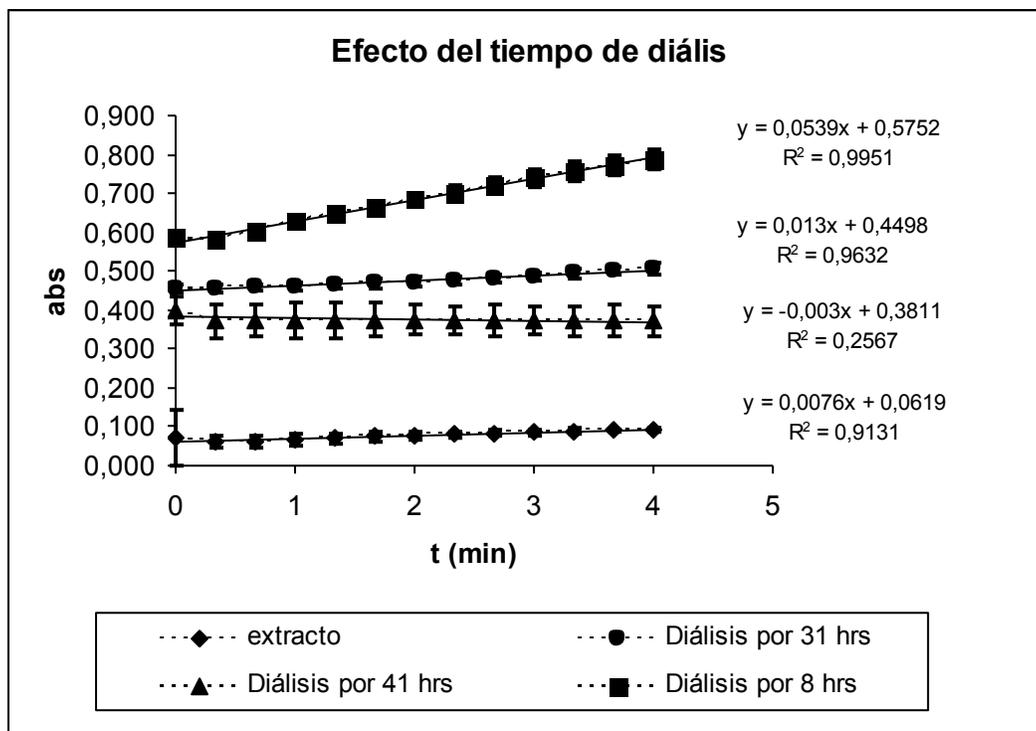


Figura 14. Cinética de hidrólisis de **p-NPP** midiendo el efecto del tiempo de diálisis

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

Sara González Terán

El día 14 de diciembre de 2010

Directora de tesis:



DRA. LILIA ARELY PRADO BARRAGÁN

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Lector:



DR. FRANCISCO JOSE FERNÁNDEZ PERRINO

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa