

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

**“Caracterización bioquímica de lipasas producidas por hongos
termotolerantes en fermentación en medio sólido”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

BLANCA ELIZABETH HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DR. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESORES: DR. JESÚS ANTONIO CÓRDOVA LÓPEZ

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

Diciembre, 2012

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4) perteneciente al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa en México, D.F., bajo la dirección del Dr. Ernesto Favela Torres. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado, así como también por la beca mixta para realizar una estancia de investigación en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España.

México D.F. a 10 de diciembre del 2012

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Caracterización bioquímica de lipasas producidas por hongos termotolerantes en fermentación en medio sólido”

que presentó:

Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

Comité tutorial:

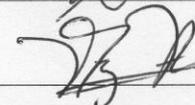
Director de tesis: Dr. Ernesto Favela Torres
Asesor: Dr. Jesús Antonio Córdova López
Asesor: Dr. Eduardo Bárzana García

Jurado:

Presidente:
Dr. Sergio Huerta Ochoa
Secretario:
Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
Vocal:
Dra. María Dolores Reyes Duarte
Vocal:
Dr. Ricardo Hernández Martínez







R.H.M.

A mi guía en el camino “Dios”

A mis padres y hermanas

A Elizabeth por dar a mi vida luz, fuerza, esperanza y amor

“Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil...
Y sin embargo,
es lo más preciado que tenemos”

ALBERT EINSTEIN (1879-1955)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de tesis a las siguientes instituciones:

- CONACyT, becario no. 157476
- Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Planta de fermentación en medio sólido (PP4).
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); Madrid, España.

A Octavio Herrera García por su amor, enseñanzas, fortaleza, comprensión, y por los años que gocé de su hermosa compañía. En su memoria.

A mi director de tesis y asesores por su tiempo, dedicación, conocimientos y apoyo brindado.

A mi incondicional apoyo personal y profesional, gran amiga y formadora, la Dra. Lilia Arely Prado Barragán.

A cada uno de mis compañeros de la PP4, por su cariño y sobre todo por ayudarme a crecer como ser humano.

A Richy, Dany, Isaías, Oswaldo, Gladys, Rodrigo, Rosy, Violeta, Cuapio, Juan Manuel, Edna, Aurore, Josefa, Gaby y Fabiola y Jacque, Tere Flo, Paty Estrada, por su amistad, apoyo y comprensión.

A los Doctores: Sergio Huerta Ochoa, Francisco José Fernández Perrino, Octavio Loera Corral, Gerardo Saucedo Castañeda, Jorge Soriano Santos, Christopher Augur, por su ayuda moral y profesional.

A los Doctores Ricardo Hernández Martínez y Gerardo Gutiérrez Sánchez, por su valiosa contribución para realizar el análisis de proteínas por espectrometría de masas (Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens. USA).

A mis formadores y compañeros del CSIC: José Manuel Guisan, Roberto Fernández Lafuente, Gloria Fernández Lorente, José Miguel Palomo, César Mateo, por su recibimiento y apoyo, que fue fundamental para el desarrollo de mi tesis.

RESUMEN

Los hongos filamentosos son una de las fuentes más importantes de lipasas para aplicaciones industriales, ya que las producen generalmente de forma extracelular, facilitando así su recuperación a partir del medio de fermentación. Sin embargo, la actividad y la estabilidad de los biocatalizadores, son los criterios que determinan su incorporación a los sistemas catalíticos, sobre todo, si el medio de reacción consiste en solventes orgánicos y el proceso se lleva a cabo a temperaturas mayores a 40 °C. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo, fue producir lipasas por hongos filamentosos termotolerantes y evaluar su estabilidad en función de la temperatura y la polaridad de los solventes orgánicos. Posteriormente, se aplicaron dos métodos de inmovilización con el propósito de mejorar la actividad, estabilidad y selectividad de las lipasas en procesos de síntesis de moléculas con actividad biológica, y finalmente se analizaron algunas de las propiedades estructurales de las mismas por espectrometría de masas.

Durante la primera etapa experimental, se realizaron estudios sobre la producción de lipasas en fermentación en medio sólido (FMS) por seis cepas de hongos termotolerantes (*Rhizopus* sp.) y una cepa termófila (*Rhizomucor* sp.). Las actividades enzimáticas de los biocatalizadores producidos por dos cepas de hongos termotolerantes, *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (74.0 ± 7.0 U/gms, cepa 19) y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (72.4 ± 5.7 U/gms, cepa 43a) fueron comparables a la obtenida por la lipasa comercial Lipozyme[®] RM IM de Novozymes (118.12 ± 1.0 U/gms).

En la segunda etapa experimental, se evaluó la estabilidad de las lipasas inmovilizadas de manera natural en los sólidos fermentados deshidratados (biocatalizadores) en función de la polaridad de los solventes orgánicos y de la temperatura. En este estudio, el uso del momento dipolar de los solventes orgánicos junto con su clasificación en base a los grupos funcionales (no-polares, polares próticos, polares apróticos) permitió establecer cuatro diferentes perfiles

de actividad relativa con los siete biocatalizadores evaluados. En comparación a los biocatalizadores no expuestos a solventes orgánicos (100% actividad relativa), todos los biocatalizadores mostraron una elevada actividad relativa (mayor al 90%) en solventes polares apróticos (acetonitrilo, acetona y acetato de etilo), mientras que en solventes polares próticos (etanol e *i*-propanol), la actividad se redujo considerablemente (menor al 40%). Además, después de incubar a 25°C los biocatalizadores de las cepas *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (L-19) y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (L-43a) en alcohol *i*-amílico, se incrementó la actividad lipasa en la síntesis de oleato de etilo 3.36 y 1.46 veces, respectivamente. La actividad de L-19 también se incrementó después de incubar en tolueno (2.0 veces), *i*-propanol (1.5 veces) y acetonitrilo (1.3 veces) a temperaturas de 30 °C a 50 °C. Estos resultados sugieren que los biocatalizadores L-19 y L-43a pueden ser empleados en diversas reacciones catalizadas por lipasas en medios orgánicos.

En la tercera etapa experimental, se evaluó la enantioselectividad (*E*) de las lipasas producidas por las cepas *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a), *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (19) y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43a) inmovilizadas sobre Octil-agarosa (adsorción interfacial) y MANAE-glutaraldehído (unión covalente multipuntual) en las reacciones de hidrólisis de los sustratos quirales ácido (\pm)-2-*O*-butiril-2-fenilacético [(\pm)-OBFA] y (\pm)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo [(\pm)-HFBE], así como en la hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales di-*n*-metil [DMFG] y di-*n*-etil-fenil-glutarato [DEFG]. Los resultados que corresponden a la hidrólisis de (\pm)-OBFA, muestran valores de enantioselectividad (*E*) de 25 y 5 para los derivados de la lipasa 19 MANAE-glutaraldehído y Octil-agarosa, respectivamente. Para las lipasas 13a y 43a, la enantioselectividad se modificó a través del proceso de inmovilización y se observó un notable incremento en dicha propiedad ($E=\infty$) hacia el enantiómero (*S*) en ambos derivados Octil-agarosa. Esto indica que la conformación adquirida por el sitio activo de la enzima cuando ésta es adsorbida a la superficie hidrofóbica del soporte limita la entrada del enantiómero (*R*). En la hidrólisis del sustrato (\pm)-HFBE, no se observó un efecto significativo del tipo de inmovilización sobre la enantioselectividad. Y en lo referente a la hidrólisis asimétrica, se observó un cambio notable

en la enantioselectividad de la lipasa 19 al inmovilizar sobre el soporte MANAE-glutaraldehído obteniendo un valor $E=\infty$ (S). Los derivados de las cepas 13a y 43a presentaron un valor de $E\approx 7$ (R) y una selectividad contraria al derivado de la cepa 19.

En la cuarta etapa experimental, como resultado del análisis de proteínas por espectrometría de masas, se encontró un péptido en la banda correspondientes a la cepa 43a con un alto índice de confiabilidad (Score > 95) en la correspondencia a una proteína producida por *Rhizopus stolonifer*, el cual presentó una alta homología con la proteína de choque térmico Hsp70 proteína 1 de *Rhizopus stolonifer*, cuya estructura primaria y propiedades funcionales corresponden al de una chaperona. Esto coincide con estudios previos sobre mecanismos de secreción de lipasas por el género *Rhizopus*, los cuales evidencian la síntesis de estas enzimas como pro-péptidos que actúan como chaperonas intramoleculares. Además, se identificaron cinco secuencias consenso potenciales de N-glicosilación en la proteína, que posiblemente contribuyan con la termoestabilidad de la enzima.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere que los biocatalizadores producidos en fermentación en medio sólido por las cepas 13a, 19 y 43a presentan ventajas tecnológicas y económicas para su empleo en diversos procesos catalíticos tanto en sistemas acuosos (reacciones de hidrólisis) como no acuosos (reacciones de síntesis). Además, los derivados enzimáticos obtenidos por dos métodos de inmovilización de lipasas (adsorción interfacial -Octil-agarosa- y unión covalente multipuntual -MANAE-glutaraldehído-) pueden emplearse en procesos catalíticos de síntesis de biomoléculas de importancia para la industria farmacéutica, tales como: (S)-Ácido mandélico, (S)- ácido-2-hidroxi-4-fenilbutanoico, (S)-*n*-metil-fenilglutarato y (S)-*n*-etil-fenilglutarato.

ABSTRACT

Filamentous fungi are one of the most important lipases sources for industrial applications since these are extracellular enzymes which make easier their recuperation from the fermentation medium. However, the activity and stability of biocatalysts are the main criteria for their incorporation into the catalytic systems, especially when the reaction medium is an organic solvent and the temperature process is above 40 °C. By the above, the objective of the present work was to study the production of lipases by filamentous thermotolerant fungi and evaluate their stability in function of temperature and organic solvents polarity. Two immobilization methods were subsequently applied in order to improve the activity, stability and selectivity of lipases in processes of synthesis of molecules with biological activity. Finally, some of the structural properties of the lipases were analyzed by mass spectroscopy.

Some studies of lipases production, by six strains of thermotolerant fungi (*Rhizopus* sp.) and one thermophilic strain (*Rhizomucor* sp.) were carried on, in solid state fermentation during the first experimental stage. The enzymatic activity of the biocatalysts produced by two strains of thermotolerant fungi *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (74.0 ± 7.0 U/gms, strain 19) and *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (72.4 ± 5.7 U/gms, strain 43a) were comparable to the activity shown by the commercial lipase Lipozyme[®] RM IM of Novozymes (118.12 ± 1.0 U/gms).

In the second experimental phase the stability of lipases, naturally immobilized in the dehydrated fermented solids (biocatalysts) were evaluated as a function of the organic solvent polarity and temperature. In this study, the use of the organic solvents dipole moment together with their classification based on the functional groups (non-polar, polar protics and polar aprotics) allowed to establish four different relative activity profiles with the seven evaluated biocatalysts. All the evaluated biocatalysts shown an elevated relative activity (greater than 90 %) in polar aprotic solvents (acetonitrile, acetone and ethyl acetate) compared to the

unexposed biocatalysts to organic solvents (100% relative activity). However, in protic polar solvents (ethanol and *i*-propanol) the activity was considerably reduced (less than 40%). Furthermore, after incubation in *i*-amyl alcohol, the lipase activity of the biocatalysts which contain the strains *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (L-19) and *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (L-43a) increased in the synthesis of ethyl oleate 3.36 and 1.46 fold, respectively. The activity of L-19 was also increased after incubation in toluene (2.0 fold), *i*-propanol (1.5 fold) and acetonitrile (1.3 fold) at temperatures of 30 °C and 50 °C. These results suggest that the biocatalyst L19 and L-43 could be used in several reactions catalyzed by lipases in organic mediums.

In the third experimentally step the enantioselectivities (*E*) of lipases in the reactions of hydrolysis were evaluated. The lipases tested were produced by the strains *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a), *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (19) and *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43a) immobilized on Octyl-agarose (interfacial adsorption) and MANAE-glutaraldehyde (multipunctual covalent bond). The chiral substrates used for the hydrolysis reactions were acid (\pm)-2-*O*-butyryl-2-phenylacetic [(\pm)-OBFA] and (\pm)-ethyl-2-hydroxy-4-phenylbutyrate [(\pm)-HFBE]; for the asymmetric hydrolysis the prochiral substrates used were di-*n*-methyl [DMFG] and di-*n*-ethyl-phenyl-glutarate [DEFG]. The results corresponding to hydrolysis of (\pm)-OBFA presented enantioselectivity values (*E*) of 25 and 5 for the lipase derivatives 19 MANAE-glutaraldehyde and octyl-agarose, respectively. For the lipases 13a and 43a, the enantioselectivities were modified through the process of immobilization and it was observed a remarkable increase in the aforementioned property ($E=\infty$) towards the enantiomer (S) in both derivatives Octyl agarose. This indicates that the acquired conformation by the active site of the enzyme, when this is adsorbed on the hydrophobic surface, limits the entrance to the enantiomer (R). In the hydrolysis of the substrate (\pm)-HFBE it was not observed a significant effect of the immobilization type and the enantioselectivity. With respect to the asymmetric hydrolysis it was observed a remarkable change in the enantioselectivity of the lipase 19, when it was immobilized on the MANAE-

glutaraldehyde. A value of $E=\infty$ (S) was obtained. The derivatives from the strains 13a and 43a showed a value of $E\approx 7$ (R) and a contrary selectivity of the strain 19.

Finally, as a result of the protein analysis by mass spectroscopy it was found a peptide in the band corresponding to the strain 43a with a high index of reliability (Score > 95) in correspondence to a protein produced by *Rhizopus stolonifer*. The peptide presented a high homology with the protein of thermal shock Hsp70 protein 1 of *Rhizopus stolonifer* whose primary structure and functional properties correspond with a chaperone. This is in agreement with previous studies about mechanism of lipase secretion by the genus *Rhizopus*, which demonstrate the synthesis of these enzymes as pro-peptides that work as intramolecular chaperones. Besides, five potential consensus sequences for N-glycosylation in the protein and that not contribute to the thermoestability of the enzyme were identified.

The results obtained in this study suggest that the biocatalysts produced in solid state fermentation by the strains 13a, 19 and 43a present technological and economic advantages for use in various catalytic processes in both aqueous systems (hydrolysis reactions) and non-aqueous (synthesis reactions). In addition, enzymatic derivatives prepared by two lipases immobilization methods (Octyl-agarose interfacial adsorption and MANAE-glutaraldehyde multipuntual covalent bond) may be employed in catalytic processes for biosynthesis of important biomolecules to the pharmaceutical industry, such as (S)-mandelic acid, (S)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid, (S)-*n*-methyl-phenylglutarate and (S)-*n*-ethyl-phenylglutarate.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>vii</i>
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Generalidades de las lipasas.....	2
1.2 Aplicación industrial.....	4
1.3 Organismos productores de lipasas.....	4
1.3.1. Lipasas bacterianas.....	5
1.3.2. Lipasas fúngicas.....	6
1.4 Producción de lipasas.....	7
1.4.1 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido.....	8
1.4.1.1 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido por hongos filamentosos termotolerantes y termófilos.....	10
1.5 Características catalíticas de lipasas.....	11
1.5.1 Fenómeno de activación interfacial.....	11
1.5.2 Selectividad catalítica de las lipasas.....	12
1.6 Solventes orgánicos como medio de reacción.....	13
1.7 Lipasas en solventes orgánicos.....	14
1.8 Inmovilización de enzimas.....	15
1.8.1 Inmovilización de lipasas.....	16
1.8.1.1 Inmovilización sobre Octil-agarosa.....	17
1.8.1.2 Inmovilización sobre MANAE-glutaraldehído.....	17
1.8.2 Modificación química de lipasas inmovilizadas: Aminación.....	18
1.8.3 Modificación de las propiedades enantio- y regioselectivas de lipasas por métodos de inmovilización.....	19

2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
Parte I. Producción de lipasas en fermentación en medio sólido	
5.1 Microorganismos.....	27
5.2 Enzima comercial.....	27
5.3 Reactivos.....	28
5.4 Mantenimiento de los cultivos.....	28
5.5 Preparación de inóculos.....	28
5.6 Composición del medio de cultivo.....	28
5.7 Producción de lipasas por fermentación en medio sólido.....	29
5.7.1 Tratamiento del soporte inerte para la fermentación en medio sólido....	29
5.7.2 Fermentación en medio sólido (FMS).....	29
5.7.2.1 Cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento.....	30
5.8 Secado de los sólidos fermentados (Biocatalizadores).....	32
5.9 Producción de lipasas inmovilizadas en los sólidos fermentados (Biocatalizadores).....	32
5.10 Métodos analíticos.....	32
5.10.1 Cuantificación de actividad lipasa en reacciones de hidrólisis.....	32
5.10.1.1 Hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenil palmitato.....	33
5.10.1.2 Hidrólisis de aceite de oliva.....	34
5.10.2 Actividad lipasa en reacciones de síntesis de oleato de etilo.....	35
Parte II. Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos	
5.11 Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos.....	36
5.12 Efecto de solventes orgánicos y temperatura sobre la estabilidad de lipasas.....	36
Parte III. Inmovilización de lipasas: Estudios de estabilidad y propiedades enantioselectivas	
5.13 Materiales.....	37
5.14 Producción y extracción de lipasas de los sólidos secos fermentados.....	37
5.15 Cuantificación de actividad lipasa por hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenil butirato.....	38

5.16	Zimografía.....	38
5.17	Preparación de agarosa pre-activada con glutaraldehído (MANAE-glutaraldehído).....	39
5.18	Inmovilización de lipasas.....	39
5.18.1	Aminación química de lipasas inmovilizadas.....	40
5.19	Hidrólisis enantioselectiva y asimétrica.....	40
5.20	Cálculo del valor E	43
5.21	Cálculo del valor A	43
Parte IV. Digestión trípica de proteínas separadas mediante electroforesis en condiciones nativas para posterior identificación por espectrometría de masas		
5.22	Recuperación y digestión trípica de proteínas.....	44
5.23	Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	44
6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
Parte I. Producción de lipasas en fermentación en medio sólido		
6.1	Efecto del contenido de humedad inicial sobre el crecimiento de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> en fermentación en medio sólido.....	47
6.2	Efecto del tamaño de partícula y tipo de soporte inerte sobre el crecimiento de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> en fermentación en medio sólido y sobre la producción de lipasas.....	51
6.2.1	Tamaño de partícula.....	51
6.2.1.1.	Cinética de producción de lipasas en fermentación en medio sólido.....	53
6.2.2	Tipo de soporte inerte.....	54
6.3	Efecto del tipo de secado de los sólidos fermentados sobre la actividad lipasa.....	55
6.4	Producción de lipasas inmovilizadas en los sólidos fermentados (biocatalizadores).....	57
Parte II. Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos		
6.5	Estabilidad y actividad de los biocatalizadores en solventes orgánicos.....	61
6.6	Actividad de hidrólisis y síntesis de los biocatalizadores L-19 y L-43a.....	65
6.7	Efecto de la temperatura y de los solventes orgánicos sobre la estabilidad de los biocatalizadores.....	68
Parte III. Inmovilización de lipasas: Estudios de estabilidad y propiedades enantioselectivas		

6.8	Producción y extracción de lipasas a partir de los biocatalizadores producidos por fermentación en medio sólido.....	70
6.9	Inmovilización de lipasas producidas por hongos termotolerantes.....	73
6.10	Efecto del tipo de inmovilización sobre la estabilidad de lipasas en función de la temperatura y pH.....	76
6.11	Modificación de las propiedades enantioselectivas de lipasas producidas por hongos termotolerantes a través del tipo de inmovilización.....	79
6.11.1	Hidrólisis enantioselectiva del ácido (\pm)-2- <i>O</i> -butiril-2-fenilacético.....	79
6.11.2	Hidrólisis enantioselectiva de (\pm)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo.....	82
6.11.3	Hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales di <i>n</i> -metil fenil-glutarato (DMFG) y di <i>n</i> -etil fenil-glutarato (DEFG).....	84
Parte IV. Identificación de proteínas por espectrometría de masas		
6.12	Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	87
7.	CONCLUSIONES	91
8.	PERSPECTIVAS	96
9.	BIBLIOGRAFÍA	98
Anexo A	Resultados de la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y el gen 28S del <i>Rarn</i> . Laboratorio de Biotecnología Industrial. Centro de Biotecnología Genómica - IPN.....	122
Anexo B	Tamizado de los soportes sólidos inertes para la fermentación en medio sólido.....	128
Anexo C	Curva estándar de <i>p</i> -Nitrofenol ($\lambda = 410$ nm, pH 8, 45 °C).....	129
Anexo D	Curva estándar de ácido oleico.....	130
Anexo E	Curva estándar de <i>p</i> -Nitrofenol ($\lambda = 348$ nm, pH 7, 25 °C).....	131
Anexo F	Reactivos para la digestión triptica.....	132
Anexo G	Resultados de análisis estadísticos.....	133
Anexo H	Resultados de la identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	149
Anexo I	Publicación derivada del proyecto de investigación.....	150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1.1.	Lipasas microbianas comerciales.....	3
1.2	Organismos productores de lipasas del Reino <i>Fungi</i>	6
1.3	Aplicaciones de lipasas en solventes orgánicos como medio de reacción.....	15
6.1	Parámetros de crecimiento y actividad lipasa durante la fermentación en medio sólido de <i>Rhizopus homothallicus</i> (cepa 13a) con dos diferentes soportes inertes.....	55
6.2	Comparación de dos tipos de secado de los sólidos fermentados.....	56
6.3	Parámetros de crecimiento y actividad lipasa de siete cepas fúngicas durante los cultivos en estado sólido empleando agrolita como soporte inerte.....	59
6.4	Producción de lipasas por diferentes cepas fúngicas en fermentación en medio sólido.....	60
6.5	Actividad lipasa de los biocatalizadores producidos en FMS.....	70
6.6	Rendimiento y actividad relativa de los derivados enzimáticos obtenidos mediante dos protocolos de inmovilización de lipasas producidas por hongos termotolerantes.....	75
6.7	Actividad relativa de los derivados enzimáticos obtenidos mediante la inmovilización de diferentes lipasas sobre Octil-agarosa y MANAE-glutaraldehído.....	76
6.8	Hidrólisis enantioselectiva de [(±)-OBFA] catalizada por los derivados enzimáticos inmovilizados de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a.....	80
6.9	Hidrólisis enantioselectiva de [(±)-OBFA] catalizada por lipasas inmovilizadas.....	81
6.10	Hidrólisis enantioselectiva de [(±)-HFBE] catalizada por derivados enzimáticos de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a.....	83

Tabla	Título	Página
6.11	Hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales DMFG y DEFG catalizada por derivados enzimáticos de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a.....	85
6.12	Hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales DMFG y DEFG catalizada por lipasas inmovilizadas.....	86
AC.1	Diluciones para elaborar la curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol.....	129
AD.1	Diluciones para elaborar la curva estándar de ácido oleico.....	130
AE.1	Diluciones para elaborar la curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol a pH 7.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1.1	Hidrólisis y síntesis de ésteres con lipasas.....	2
1.2	Categorías de los métodos de inmovilización.....	15
1.3	Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos.....	16
1.4	Adsorción interfacial de lipasas sobre soportes hidrofóbicos.....	17
1.5	Inmovilización de lipasas por unión covalente multipuntual.....	18
1.6	Aminación de lipasas inmovilizadas.....	19
5.1	Perfiles de la tasa de generación de CO ₂ (○) y producción total de CO ₂ (●) durante el cultivo de hongos filamentosos en medio sólido. Estimación de la tasa específica de crecimiento a través del perfil del ln CO ₂ (▲).....	31
5.2	Hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenil palmitato.....	33
5.3	Hidrólisis de aceite de oliva.....	34
5.4	Síntesis de Oleato de etilo.....	35
5.5	Hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenil butirato.....	38
5.6	Hidrólisis enantioselectiva del ácido (±)-2- <i>O</i> -butiril-2-fenilacético.....	41
5.7	Hidrólisis enantioselectiva de (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo.....	42
5.8a	Hidrólisis asimétrica del éster pro-quiral di- <i>n</i> -metil-fenil-glutarato.....	42
5.8b	Hidrólisis asimétrica del éster pro-quiral di- <i>n</i> - di- <i>n</i> -etil-fenil-glutarato.....	43
6.1	Efecto del contenido de humedad inicial sobre (a) la tasa específica de crecimiento (μ), (b) fase <i>lag</i> y (c) actividad lipasa, obtenidos en la fermentación en medio sólido de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> . ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre tratamientos.....	49

Figura	Título	Página
6.2	Efecto del contenido de humedad inicial sobre la producción de CO ₂ (círculos), contenido de humedad (cuadros) y valor de a _w (triángulos), durante el cultivo en estado sólido de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> sobre espuma de poliuretano. Símbolos llenos, 55% y símbolos vacíos, 65%.....	50
6.3	Efecto del tamaño de partícula sobre (a) la tasa específica de crecimiento (μ), (b) fase <i>lag</i> , (c) producción de CO ₂ y (d) actividad lipasa durante la fermentación en medio sólido de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> . La actividad lipasa de los extractos de fermentación (sección 5.7.2) se determinó de acuerdo a la sección 5.10.1.2.....	52
6.4	Cinética de producción de lipasas y tasa de producción de CO ₂ durante la fermentación en medio sólido de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> . La actividad lipasa de los extractos enzimáticos (sección 5.7.2) se determinó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.10.1.2. ^{a,b,c,d} Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) de actividad lipasa entre tiempos de fermentación.....	53
6.5	Tasa de producción de CO ₂ durante la fermentación en medio sólido de <i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> empleando como soportes inertes (■) puf y (▲) agrolita.....	55
6.6	Cinética de contenido de humedad del aire a la salida de la columna durante el secado de material sólido fermentado con diferente diferente tiempo de incubación con <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i> (cepa 19).....	57
6.7	Efecto de los solventes orgánicos sobre la estabilidad de lipasas producidas por las cepas (a) 9a, 13a, 13b, 19 y (b) 23a, 43a, 56c y Lipozyme RM IM. Los solventes empleados, con su respectivo valor de Log <i>P</i> fueron: acetonitrilo, - 0.33; etanol, - 0.24; acetona, - 0.23; <i>i</i> -propanol, 0.28; acetato de etilo, 0.68; tolueno, 2.5; <i>n</i> -hexano, 3.5; <i>n</i> -decano, 5.6. La actividad lipasa se determinó como se describe en la sección 5.10.1.2.....	62

Figura	Título	Página
6.8	Perfiles de estabilidad de lipasas después de su exposición (1 h) a diferentes solventes orgánicos. Las lipasas empleadas en este estudio fueron producidas por seis cepas de hongos termotolerantes y una termófila. L-19, L-23a (Perfil I) (a); L-13a, L-43a, Lipozyme [®] RM IM (Perfil II) (b); L-13b, L-56c (Perfil III) (c); L-9a (Perfil IV) (d). Los solventes y su momento dipolar fueron: <i>n</i> -decano, 0.0; <i>n</i> -hexano, 0.0; tolueno, 0.36; <i>i</i> -propanol, 1.66; etanol, 1.69; acetato de etilo, 1.78; acetona, 2.88; acetonitrilo, 3.20. La actividad se midió como se describe en la sección 5.10.1.2.....	63
6.9	Actividad relativa de lipasas después de una hora de exposición a solventes orgánicos, agrupados por su momento dipolar: (a) L-19; (b) L-43a. La actividad lipasa se evaluó de acuerdo a la sección 5.10.1.2 para la (□) hidrólisis de aceite de oliva y sección 5.10.2 para la (■) síntesis de oleato de etilo. Los solventes fueron: <i>n</i> -decano, D; <i>n</i> -hexano, H; tolueno, T; <i>i</i> -propanol, IP; etanol, E; alcohol <i>i</i> -amílico, AI; tetrahidrofurano, THF; acetato de etilo, AE; acetona, A; acetonitrilo, ACN.....	66
6.10	Efecto del solvente orgánico (tolueno, <i>i</i> -propanol y acetonitrilo) y la temperatura (30, 40 y 50 °C) sobre la actividad relativa de los biocatalizadores (□) L-19 y (■) L-43a. La actividad lipasa se evaluó por la síntesis de oleato de etilo como se describe en la sección 5.10.2.....	69
6.11	Efecto de la concentración de Tritón X-100 sobre la extracción de lipasas de los biocatalizadores producidos por las cepas (◇) 13a y (□) 19. La actividad enzimática del sobrenadante se determinó sobre <i>p</i> NPB a pH 7.0 y 25°C como se describe en la sección 5.15.....	71
6.12	(a) Tinción con plata de gel de electroforesis en condiciones nativas. Est, Estándar de pesos moleculares; línea 1, extracto enzimático 13a; línea 2, extracto enzimático 19; línea 3, extracto enzimático 43a. (b) Zimograma de lipasas después de electroforesis en condiciones nativas. Línea 4, lipasa 13a; línea 5, lipasa 19; línea 6, lipasa 43a.....	73
6.13	Derivados enzimáticos obtenidos mediante dos protocolos de inmovilización. (a) Adsorción interfacial sobre Octil-agarosa y (b) Unión covalente multipuntual en MANAE-glutaraldehído.....	73

Figura	Título	Página
6.14	Curso de la inmovilización de lipasas producidas por las cepas (◇) 13a, (□) 19 y (△) 43a, sobre (a) Octil-agarosa y (b) MANAE-glutaraldehído. (a) La reacción se llevó a cabo en un amortiguador 25 mM de fosfato de sodio (pH 7.0) a 25°C. (b) La reacción se realizó en un amortiguador 200 mM de fosfato de sodio (pH 7.0) a 25°C, ambas reacciones bajo agitación moderada y constante. La actividad enzimática se determinó sobre <i>p</i> NPB a pH 7.0 y 25°C de acuerdo a la sección 5.15. La actividad residual representa la relación porcentual entre la actividad del sobrenadante y la actividad total de la suspensión al inicio del proceso de inmovilización.....	74
6.15	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las enzimas inmovilizadas en Octil-agarosa correspondientes a las cepas (◇) 13a, (□) 19 y (△) 43a. Los estudios se realizaron en un amortiguador 25 mM de fosfato de sodio (pH 7.0). La actividad enzimática se determinó de acuerdo a la sección 5.15. La actividad relativa (AR) se reportó empleando como referencia un derivado Octil-agarosa sin tratamiento.....	77
6.16	Efecto del pH sobre la estabilidad de dos derivados enzimáticos de la lipasa producida por la cepa 19. (○) Octil-agarosa 19-pH 5, (●) Octil-agarosa 19-pH 7, (□) MANAE-glutaraldehído 19-pH 5, (■) MANAE-glutaraldehído 19-pH 7. La actividad enzimática se determinó sobre <i>p</i> -NPB a pH 7.0 y 25°C de acuerdo a la sección 5.15. La actividad relativa (AR) se reportó empleando como referencia un derivado sin tratamiento.....	78
6.17	Efecto de la adsorción interfacial de las lipasa 13a y 43a en Octil-agarosa sobre la enantioselectividad del sustrato [(±)-OBFA] (Fernández-Lorente y col., 2008a).....	82
6.18	Secuencia de aminoácidos de la proteína Hsp70 de <i>Rhizopus stolonifer</i> , obtenida mediante un análisis de homología con ayuda del software BLAST de NCBI. El código de color de los aminoácidos es el siguiente: rojo, péptido identificado por espectrometría de masas; azul, secuencia consenso del motivo serina del sitio catalítico.....	88
6.19	Representación esquemática de la lipasa sintetizada por <i>Rhizopus oryzae</i>	88

Figura	Título	Página
6.20	Los sitios potenciales de N-glicosilación con las secuencias Asn-Xaa-Ser/Thr se marcan en color azul. Asparagina con potencial N-glicosilación se marca en color rojo.....	89
AB.1	Secuencia de mallas para tamizado de soportes sólidos inertes.....	128
AC.1	Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol a pH 8.....	129
AD.1	Diluciones para elaborar la curva estándar de ácido oleico.....	130
AE.1	Curva estándar de <i>p</i> -nitrofenol a pH 7.....	131

Capítulo 1

Revisión bibliográfica

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las lipasas

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son serina hidrolasas de considerable importancia fisiológica e industrial que catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga (Figura 1.1) (Beys y col., 2005; Rohit y col., 2001). Entre las ventajas más importantes de estas enzimas podrían mencionarse las siguientes: 1) Son estables en solventes orgánicos; 2) no requieren de cofactores, lo cual hace su empleo más sencillo y económico; 3) poseen una amplia especificidad de sustrato y 4) muestran una elevada enantioselectividad (Elibol y Ozer, 2000; Bornscheuer y col., 2002).

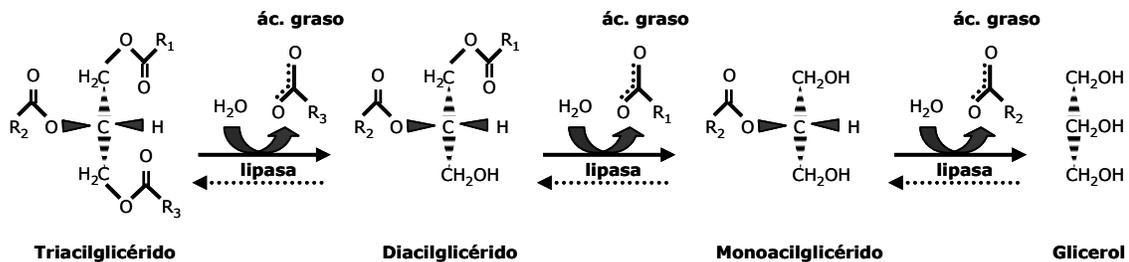


Figura 1.1 Hidrólisis y síntesis de ésteres con lipasas

A principios de la década de los 80's las lipasas eran utilizadas con mayor frecuencia en procesos de lavandería y en la modificación de triglicéridos (Bornscheuer y col., 2002). Sin embargo, es a partir de esta época que se comenzaron a generar trabajos de investigación que probaron su efectividad como catalizadores en diversas reacciones de síntesis, empleando como medio de reacción diversos solventes orgánicos (Ajima y col., 1985; Kikkawa y col., 1989; Therisod y Klivanov, 1987). Esto generó un creciente interés en la investigación sobre el potencial de los procesos biocatalíticos en medios no convencionales (Adamczak y Krishna, 2004; Khmel'nitsky y Rich, 1999; Krieger y col., 2004). Como consecuencia de los trabajos realizados, se elucidó una gran variedad de reacciones químicas en las que las lipasas

participan como biocatalizadores. De estas reacciones destacan: esterificación (Chang, 1999); transesterificación (Bhagwat, 2005; Dossat, 2002); acilación regioselectiva (Ducret y col., 1998); alcoholólisis (Graber, 2003; Gryglewicz, 2003); acidólisis (Pandey, 1999; Rohit y col., 2001) y aminólisis (Sánchez, 1999).

Por lo anterior, a principios de la década de los 90's se tenían poco más de 70 extractos lipolíticos comerciales (Vorderwülbecke y col., 1992). En 2005, el número de lipasas industriales disponibles se incrementó considerablemente en respuesta a una creciente demanda por estos biocatalizadores (Beys y col., 2005), por lo que en esta década se generaron más de 1000 compuestos diferentes, obtenidos a partir de reacciones catalizadas por lipasas (Bornscheuer y col., 2002). En la Tabla 1.1 se enlistan algunos ejemplos de aplicación de preparaciones enzimáticas que se comercializan, así como los microorganismos que los producen.

Tabla 1.1 Lipasas microbianas comerciales (Jaeger y Reetz, 1998; Schmid y Verger, 1998)

Origen	Fuente	Aplicación	Fabricante
Fúngico	<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme. Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Síntesis orgánica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo en detergentes	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Proceso de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bacteriano	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis orgánica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo en detergentes	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo en detergentes	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntesis orgánica	Asahi, Biocatalysts

1.2 Aplicación industrial

Algunos de los procesos más importantes que emplean lipasas como biocatalizadores en la industria química son: (1) Resolución cinética de aminas (>2000 ton/año, BASF) (Bornscheuer y col., 2002), (2) resolución cinética de alcoholes (>100 ton/año, BASF) (Schmid y col., 2002), (3) resolución cinética de trans-3-(p-metoxifenil)-glicidil-metil-éster, el cual actúa como intermediario en la síntesis de Diltiazem (>100 ton/año, DSM) (Schmid y col., 2002), (4) resolución cinética de piperidinas quirales ((±)-(4RS,5RS)-*trans*-5-(butiriloximetil)-4-(4'-fluorofenil)-1-metil-piperidina-2-ona), el cual se emplea como precursor en la síntesis de paroxetina (Paxil[®], SmithKline Beecham) (Huisman, 2002; Fernández-Lorente, 2004).

Straathof y col. (2002) revelaron que las hidrolasas constituyen la categoría de enzimas más empleadas en procesos industriales biotecnológicos (44%) y este comportamiento también incluye a las lipasas, ya que se han implementado en una gran diversidad de procesos biocatalíticos, tales como: la manufactura de grasas y aceites, detergentes, fórmulas desengrasantes, alimentos procesados, productos nutraceuticos, papel, cosméticos, síntesis de productos químicos y farmacéuticos, curtido de pieles, entre otros (Jaeger y Reetz, 1998; Rohit y col., 2001; van den Burg, 2003).

Las lipasas se han convertido en biocatalizadores altamente versátiles y promisorios, especialmente en lo que se refiere a procesos de síntesis de moléculas, empleados en las industrias química y farmacéutica (Straathof y col., 2002). Por tanto, el estudio de los factores que modifican y promueven la actividad catalítica de las mismas, es de especial interés para la industria biotecnológica, con la finalidad de lograr su máximo aprovechamiento para el desarrollo y mejora continua de los procesos industriales.

1.3 Organismos productores de lipasas

Las lipasas son producidas por animales vertebrados e invertebrados, plantas, bacterias y hongos. Sin embargo, la investigación sobre la producción de lipasas de origen microbiano se ha incrementado por su gran potencial comercial, aunado a la introducción de técnicas de ingeniería genética (Schmid y Verger, 1998; Elibol y Ozer, 2000). Los hongos representan una

de las fuentes más importantes de lipasas para aplicaciones industriales, ya que las producen generalmente en forma extracelular, facilitando así su recuperación y purificación a partir del medio de cultivo (Beys y col., 2005; Elibol y Ozer, 2000; Lima y col., 2003).

Los microorganismos productores de lipasas se han encontrado en diversos hábitats, tales como: residuos agroindustriales, plantas de procesamiento de aceites vegetales, industrias de productos lácteos, suelos contaminados con aceite, semillas oleaginosas, compostas y aguas termales (Rohit y col., 2001). A continuación se presenta una revisión de los microorganismos productores de lipasas más utilizados a nivel industrial.

1.3.1 Lipasas bacterianas

Las lipasas producidas por bacterias del género *Pseudomonas*¹ fueron las primeras en ser estudiadas y han tenido un papel preponderante en la industria biotecnológica (Tabla 1.1). Las primeras estructuras tridimensionales conocidas de lipasas corresponden a las producidas por *Burkholderia glumae*, *Chromobacterium viscosum*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* (Arpigny y Jaeger, 1999; Kordel y col., 1991).

Se han identificado lipasas producidas por bacterias de los géneros *Acinetobacter* (Han y col., 2003; Snellman y col., 2002) y *Lactobacillus* (Rohit y col., 2001), las cuales presentan estabilidad a temperaturas que oscilan entre 50-55 °C y en presencia de cosolventes polares; algunas cepas de bacterias psicrófilas como *Moraxella* TA144, *Psychrobacter immobilis* B10 y algunas pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. (Choo y col., 1998), cuya estabilidad se mantiene en un rango de temperatura de 37-45 °C y en presencia de cosolventes miscibles en agua. Con la finalidad de obtener lipasas termoestables, se ha investigado la producción de lipasas por especies termófilas, entre las que se mencionan: *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* (Fakhreddine y col., 1998), *Bacillus* sp. RSJ-1, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenletus*, *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *Pyrobaculum calidifontis*, *Pyrococcus horikoshii* (Haki y Rakshit, 2003) y *Thermus thermophilus* HB27 (Fuciños y col., 2005), siendo ésta última la que presenta mayor estabilidad a 85 °C, pero en ausencia de solventes orgánicos.

¹ El nombre del Género *Pseudomonas* ha sido recientemente modificado por *Burkholderia*

1.3.2 Lipasas fúngicas

Los hongos son una de las fuentes más importantes de lipasas para aplicaciones industriales, entre diversos factores, porque se producen generalmente en forma extracelular, lo que facilita su recuperación y purificación a partir del medio de cultivo (Beys y col., 2005; Elibol y Ozer, 2000; Lima y col., 2003). Los organismos empleados con mayor frecuencia a nivel industrial para la síntesis de lipasas forman parte de los siguientes géneros de hongos filamentosos y levaduras, respectivamente: *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotrichum* y *Candida* (Tabla 1.2) (Ferrer y col., 2000; Pandey y col., 1999). También han sido objeto de estudio algunas especies termotolerantes y termófilas, ya que generalmente a partir de éstas, se han obtenido lipasas termoestables, mismas que poseen un gran interés comercial para la industria biotecnológica en donde las condiciones de temperatura de diversos procesos exceden a 45°C (Haki y Rakshit, 2003).

Tabla 1.2 Organismos productores de lipasas del Reino *Fungi*

Fuente	Referencia
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Awan y col., 2003; ul-Haq y col., 2002
<i>Rhizopus oligosporus</i> T ^{UV} -31	Iftikar y Hussain, 2002
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Elibol y Ozer, 2000
<i>Rhizopus delemar</i>	Christen y col., 1995
<i>Rhizopus microsporus</i> ^a	Córdova, 1998
<i>Rhizopus oryzae</i> ^a	Abel y col., 2000
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Beys y col., 2005
<i>Emericella nidulans</i> ^a	Fan y Matthey, 1999
<i>Talaromyces emersonii</i> ^a	Fan y Matthey, 1999
<i>Penicillium citrinum</i>	Maliszewska y Mastalerz, 1992
<i>Penicillium camembertii</i>	Isobe y col., 1992
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Sztajer y col., 1992
<i>Penicillium expansum</i>	Stöcklein y col., 1993
<i>Penicillium roqueforti</i>	Mase y col., 1995
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ferrer y col., 2000
<i>Penicillium cyclopium</i>	Ibrik y col., 1998

Continúa.....

Continuación.....

Tabla 1.2 Organismos productores de lipasas del Reino *Fungi*

Fuente	Referencia
<i>Penicillium caseicolum</i>	Alhir y col., 1990
<i>Penicillium abeanum</i>	Sugihara y col., 1996
<i>Penicillium restrictum</i>	Gombert y col, 1999; Castilho y col., 2000
<i>Penicillium candidum</i>	Rivera-Muñoz y col., 1991
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima y col., 2003
<i>Aspergillus terreus</i>	Gulati y col., 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Córdova, 1998
<i>Rhizomucor miehei</i> ^a	Huge-Jensen y col., 1987
<i>Rhizomucor pusillus</i> ^a	Córdova, 1998
<i>Ophiostoma piliferum</i>	George y col., 1999
<i>Fusarium oxysporum</i>	Goerge y col., 1999
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Domínguez y col., 2003
<i>Candida rugosa</i>	Benjamín y Pandey, 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Degrassi y col., 1999
<i>Candida antarctica</i>	Kirk y Christensen, 2002; McCabe y col., 2005
<i>Candida rugosa</i>	Pernas y col., 2000

^a Organismos termófilos

1.4 Producción de lipasas

La producción de lipasas se puede llevar a cabo mediante procesos de fermentación, ya sea en medio líquido (FML) o sólido (FMS) y ambos presentan ventajas e inconvenientes, uno con respecto al otro (Córdova, 1998). Además, algunos estudios han reportado que la producción de lipasas en estos sistemas esta influenciada principalmente por factores ambientales y nutricionales como: pH, temperatura, velocidad de agitación, composición del medio, disponibilidad de oxígeno, presencia y tipo de inductor, entre otros (Corzo y Revah, 1999; Elibol y Ozer, 2000; Lima y col., 2003), y su efecto ha sido estudiado en cultivos con bacterias (Fischer y Kleber, 1987; Lin y col., 1995), levaduras (Valero y col., 1991; Benjamin y Pandey, 1996; Destain y col., 1997; Corzo y Revah., 1999; Benjamin y Pandey, 2000;

Domínguez y col., 2003) y hongos filamentosos (Long y col., 1996; Hatzinikolaou y col., 1996; Córdova, 1998).

En la mayor parte de los trabajos realizados sobre la producción de lipasas se han empleado cultivos líquidos como modelo de fermentación. Sin embargo, han comenzado a surgir reportes en donde se han empleado procesos de fermentación en medio sólido como modelo de estudio para la producción de lipasas extracelulares por *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y levaduras como *Yarrowia lipolytica* y *Candida antarctica* (ul-Haq y col., 2002; Domínguez y col., 2003; Treichel y col., 2010).

1.4.1 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido

Entre los atributos más importantes de la fermentación en medio sólido (FMS), se encuentra la posibilidad de obtener una producción elevada de enzimas en tiempos cortos de proceso, mayor estabilidad del producto, bajos costos operativos y de capital de inversión, disminución de volúmenes de operación, equipos y medios de cultivo sencillos, procesos de recuperación más fáciles, bajos efluentes acuosos y la posibilidad de utilizar directamente los sólidos fermentados, todo lo anterior comparado con la fermentación líquida (Castilho y col., 2000; Córdova, 1998; Hölker y col., 2004).

Por otra parte, cabe mencionar dos atributos más que hacen de los procesos de FMS una opción interesante: 1) su operación requiere de tecnologías sencillas y económicas (Hölker y col., 2004) y 2) algunos subproductos agroindustriales sólidos pueden ser utilizados como medio de cultivo para la obtención de productos (enzimas) de alto valor agregado.

En particular, los hongos filamentosos son los microorganismos mejor adaptados a la FMS debido a su capacidad de colonizar sustratos sólidos. Además, este tipo de procesos emplea, en el caso de los hongos, condiciones de cultivo similares a las encontradas en sus medios naturales (Córdova, 1998).

En diversos estudios sobre la producción de lipasas por hongos filamentosos en FMS, se discute principalmente el efecto de factores nutricionales y ambientales. En este sentido, se ha reportado que la adición de peptona al medio de cultivo como fuente de nitrógeno, favorece

la producción de lipasas por *Penicillium restrictum* (Gombert y col., 1999) y *Penicillium citrinum* (Sztajer y Maliszewska, 1989), debido al aporte de cofactores y aminoácidos, los cuales son requeridos por dichos microorganismos para la biosíntesis de estas enzimas. En contraparte, Lima y col. (2003) reportaron que al emplear una fuente inorgánica de nitrógeno ((NH₄)₂SO₄) se obtuvo el mejor rendimiento de lipasas por *Penicillium aurantiogriseum*. Con base en lo anterior, se pueden emplear ambos tipos de nutrientes, sin embargo, es importante considerar que las fuentes inorgánicas de nitrógeno representan una ventaja, si se considera que las fuentes orgánicas son de un costo más elevado y podrían hacer más compleja la purificación de la enzima después de la fermentación.

Otro factor de gran relevancia es la fuente de carbono, ya que una selección adecuada de la misma favorece la síntesis de la enzima deseada, es decir, tiene la posibilidad de fungir como inductor para la producción de lipasas (Gombert y col., 1999). Con este fin, se han empleado diversos sustratos, tales como: Tween 80, aceite de oliva, aceite de coco, aceite de soya, aceite de arroz, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de maíz, siendo el aceite de oliva el sustrato empleado con mayor frecuencia (Córdova, 1998; Beys y col., 2005; Castilho, 2000; Lima y col., 2003).

También ha sido evaluado el efecto de algunos surfactantes, cuya función es modificar la permeabilidad de la membrana y favorecer de esta manera la secreción de lipasas. En este sentido, los compuestos que han mostrado mejores resultados son: SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100 y polietilenglicol (Li y col., 2001; Mahadik y col., 2002; Beys y col., 2005).

Sólo algunos estudios han demostrado el efecto de la tasa de transferencia de oxígeno y la concentración del mismo en el medio de cultivo sobre la tasa de producción y el rendimiento de lipasas por *Rhizopus arrhizus* y *Aspergillus terreus* (Elibol y Ozer, 2000; Gulati y col., 2000). En estos trabajos, se concluye que ambos factores incrementan en forma proporcional el crecimiento del microorganismo y la producción de la enzima, pero es la tasa de transferencia de oxígeno el factor determinante en la productividad global de lipasas.

1.4.1.1 Producción de lipasas en fermentación en medio sólido por hongos filamentosos termotolerantes y termófilos

Debido a las ventajas que representan los hongos filamentosos como productores de lipasas en FMS, son el tipo de microorganismo que nos ocupa. Además, se han seleccionado especies termotolerantes y termófilas, ya que generalmente a partir de éstas, se han obtenido enzimas termoestables, mismas que poseen un gran interés comercial para la industria biotecnológica en donde las condiciones de temperatura de diversos procesos exceden a 45°C y por ello se requiere que presenten una actividad óptima al menos a 50°C (Haki y Rakshit, 2003). Aunado a lo anterior, se debe enfatizar que la aplicación de lipasas a temperaturas elevadas presenta ventajas tales como: mayor velocidad de difusión de sustratos, menor viscosidad del sistema, aumento en la solubilidad de lípidos y otros sustratos hidrófobos, y bajo riesgo de contaminación microbiana (van den Burg, 2003; Vieille y Zeikus, 2001). Finalmente, se subraya que, asociadas a la termoestabilidad de las enzimas, se han encontrado otras propiedades como son la resistencia a la desnaturalización por químicos y solventes orgánicos (van den Burg, 2003; Haki y Rakshit, 2003; Palomo y col., 2004b).

El primer reporte sobre la producción de lipasas por un hongo termófilo (*Thermomyces lanuginosus*) fue publicado por Arima y col. (1972). A partir de entonces, han sido pocos los trabajos dedicados al estudio en la producción de lipasas por este tipo de especies, cuyos requerimientos nutricionales y ambientales son los mismos con respecto a los organismos mesófilos, a excepción de la temperatura de crecimiento del cultivo, la cual oscila entre 30 y 50 °C. Entre estos trabajos se mencionan: *Mucor miehei* (Huge-Jensen y col., 1987); *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Aspergillus fumigatus* (Córdova y col., 1998; Córdova y col., 2003); *Emericella nidulans*, *Talaromyces emersonii* (Fan y Matthey, 1999), *Rhizopus oryzae* (Abel y col., 2000; Hiol y col., 2000), *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* (Szczęsna-Antczak y col., 2006), *Rhizopus homothallicus* (Mateos y col., 2006).

A pesar de la existencia de reportes científicos relacionados con la producción de lipasas producidas por hongos termotolerantes y termófilos, solamente algunas han sido comercializadas y aplicadas en síntesis de biomoléculas. Lo anterior, debido a que han presentado estabilidad a elevadas temperaturas (50-100°C), sin embargo, su vida media aún es corta para aplicarse a procesos industriales (Rathi y col., 2000). Por lo tanto, todavía existe un esfuerzo continuo por encontrar nuevos microorganismos que produzcan lipasas termoestables con tiempos de vida más prolongados en diversas condiciones del medio de reacción como: temperatura, a_w , solventes orgánicos, pH, presión y fuerza iónica (Haki y Rakshit, 2003).

1.5 Características catalíticas de lipasas

Las lipasas (3.1.1.3) al igual que las carboxilesterasas (3.1.1.1), son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster de grupos carboxilo. Sin embargo, existen criterios que distinguen a las lipasas de las carboxilesterasas. El primero en mencionar define a las esterasas como enzimas que catalizan la hidrólisis de acilgliceroles de cadenas cortas (< 10 átomos de carbono), mientras que las lipasas hidrolizan acilgliceroles de cadenas largas (≥ 10 átomos de carbono) (Fuciños y col., 2005). Otro aspecto importante radica en la composición y conformación del sitio catalítico de las lipasas, el cual está constituido por la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu y es el mismo que presenta el grupo de las serina proteasas (Sandana y col., 2008), sin embargo, existe una característica conformacional que hace diferente el sitio activo de las lipasas y radica en la presencia de una "tapa" que cubre el sitio catalítico, la cual, contribuye en la selectividad de la enzima, además de participar en el fenómeno de activación interfacial (Dias Ribeiro y col., 2011).

1.5.1 Fenómeno de activación interfacial

En diversos estudios sobre el mecanismo de reacción de las lipasas, se ha reportado que estas enzimas presentan el fenómeno de activación interfacial, es decir, que la actividad catalítica es mayor sobre agregados de lípidos (insolubles en agua) con respecto a la actividad que presentan sobre monómeros de lípidos en solución acuosa (Ramesh y col., 2000; Sandana

y col., 2008). Se cree que dicho fenómeno involucra un cambio estructural de la enzima, el cual se presenta al entrar en contacto con la interfase aceite/agua (Pandey, 1999; Palomo y col., 2004b). En agua, el sitio activo de la enzima es cubierto por un elemento estructural móvil “tapa”, el cual se desplaza cuando la lipasa entra en contacto con una interfase hidrofóbica (sustrato que excede su concentración micelar crítica). La parte interna de esta tapa es hidrofóbica y la externa es hidrofílica. Por tanto, la forma cerrada predomina en sistemas acuosos, mientras que la formación de la estructura abierta se favorece en presencia de interfases hidrofóbicas y puede ser estabilizada por algunos solventes orgánicos (Rehm y col., 2010). La manera en que las lipasas interactúan en la interfase y el mecanismo de transición de las conformaciones cerrada y abierta, aún no se ha elucidado completamente (Reis y col., 2009). Por lo anterior y aunado a su amplia gama de aplicaciones, los mecanismos de las diversas reacciones catalíticas de estas enzimas han sido objeto de una intensa investigación (Balashev y col., 2001; Palomo y col., 2004b, Rehm y col., 2010).

1.5.2 Selectividad catalítica de las lipasas

Las lipasas son capaces de reconocer diversos sustratos, por lo cual catalizan reacciones de aminólisis, acidólisis, alcoholólisis, transesterificación y acilación, lo que representa entre otras ventajas la posibilidad de producir estereoisómeros puros a escala industrial (Gryglewicz, 2003; Sánchez y col., 1999). Generalmente, este tipo de reacciones se llevan a cabo en medios orgánicos, y se ha encontrado que el tipo de solvente determina en gran parte la selectividad de la reacción (Sánchez y col., 1999; Gryglewicz, 2003; Krieger y col., 2004).

La selectividad de las lipasas se puede dividir en tiposelectividad (capacidad para hidrolizar un tipo particular de éster de ácido graso); regioselectividad (capacidad para hidrolizar grupos éster carboxílicos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 con respecto a la posición *sn*-2), estereoselectividad (capacidad para diferenciar entre dos o más centros quirales en una molécula) y enantioselectividad (capacidad para diferenciar entre dos enantiómeros en una mezcla racémica). La estereoselectividad de una lipasa depende principalmente de la estructura del sustrato, su interacción con el sitio activo y las condiciones de reacción.

Mientras que la enantioselectividad depende de las propiedades químicas del sustrato, el origen de la lipasa y las condiciones experimentales empleadas (Muralidhar y col., 2002).

La producción de enantiómeros puros a partir de mezclas racémicas, es un proceso particularmente importante para los sectores farmacéutico y agroquímico, ya que en muchos de los casos solamente uno de los dos enantiómeros tiene la actividad deseada, mientras que el otro carece de actividad o incluso puede provocar efectos adversos (Gryglewicz, 2003).

1.6 Solventes orgánicos como medio de reacción

En biocatálisis, se emplean “medios no convencionales” con la finalidad de favorecer propiedades específicas del biocatalizador o la reacción catalizada por este (Krieger y col., 2004). El término “medio no convencional” se refiere a sistemas que emplean solventes orgánicos u otro tipo de medio distinto al agua (micelas inversas, fluidos supercríticos y líquidos iónicos). En este sentido, los solventes pueden causar modificaciones en la enzima que alteran su eficiencia o especificidad catalítica. Por ejemplo, a través del uso de medios orgánicos, es posible incrementar la enantioselectividad de la reacción catalizada por lipasas (Krieger y col., 2004; Gryglewicz, 1993).

Los medios acuosos son los sistemas tradicionales para llevar a cabo los procesos de biocatálisis, sin embargo, desde hace algunos años, se han incluido solventes orgánicos como una alternativa para mejorar los procesos catalíticos a nivel industrial (Sellek y Chaudhuri, 1999). Entre las principales ventajas de emplear solventes orgánicos como medios de reacción se encuentran: mayor solubilidad de especies hidrofóbicas, posibilidad de modificar la especificidad del sustrato, así como la enantio-, estereo- y regioselectividad, reducción en la incidencia de reacciones colaterales, los solventes no polares no pueden absorber el agua ligada a la enzima o enzima inmovilizada, mayor eficiencia de los procesos de separación (sustrato/producto), reducción en la posibilidad de contaminaciones microbianas, así como la posibilidad de mejorar la estabilidad térmica de las enzimas en medios no polares (Zaks y Klivanov, 1988).

La biocatálisis en solventes orgánicos también incluye sistemas gaseosos, en los cuales, los sustratos son liberados y los productos recuperados en este mismo estado. En estos procesos se presentan las mismas ventajas que la biocatálisis en fase líquida y algunas otras como: (1) La difusividad en fase gaseosa tiene órdenes de magnitud mucho mayores que en fase líquida, además se incrementa exponencialmente con la temperatura; (2) los sustratos gaseosos (poco solubles en agua) pueden ser concentrados en este tipo de medios al incrementar la presión del sistema; (3) tanto los productos como los sustratos pueden ser fácilmente separados y recuperados por condensación fraccionada; y (4) la recuperación del biocatalizador inmovilizado se simplifica considerablemente debido a que se encuentra en estado sólido (Bárzana y col., 1989).

1.7 Lipasas en solventes orgánicos

El uso de lipasas como biocatalizadores en medios orgánicos es una alternativa de considerable importancia para la producción de un amplio rango de especies químicas pertenecientes a la industria de sabores y fragancias, cosméticos, alimentaria, farmacéutica, agroindustrial, entre otras (Turner y Vulfson, 2000).

Actualmente, continúa el desarrollo de numerosas investigaciones para entender y definir las condiciones que permitan obtener mayores velocidades de reacción, eficiencia y conversión en medios no acuosos. En la Tabla 1.3 se describen algunos de procesos de bioconversión empleando lipasas en solventes orgánicos.

Tabla 1.3 Aplicaciones de lipasas en solventes orgánicos como medio de reacción

Fuente	Aplicación	Reacción	Medio de reacción (Solvente / Temperatura)	Referencia
<i>Candida antarctica</i> Lipasa B (Novozym® 435)	Aromas y Fragancias	Esterificación asimétrica de mezclas racémicas de lavandulol (alcohol primario)	Hexano / 37°C	Cross y col., 2004
	Farmacia	Resolución cinética de mezclas racémicas de (±)-ácido safénico* (* precursor del fármaco Safenamycin)	Tolueno / Hexano	Tjosås y col., 2008
	Alimentos Cosméticos Farmacia	Esterificación de azúcares con derivados de ésteres de ácidos grasos (ej. ésteres de ácido glucurónico)	Butanol / 60°C	Moreau, 2004
	Alimentos	Acilación regioselectiva de flavonoides (narangina) para la producción de antioxidantes.	2-metil-2 butanol / 60°C	Passicos y col. 2004
	Farmacia	Resolución cinética y dinámica de alcoholes secundarios	Tolueno / 60°C	Engström y col., 2011
	Alimentos	Monohidrólisis regioselectiva de β-Glucopiranosidos	Acetonitrilo / 25°C	Mendes y col., 2008
	Cosméticos	Esterificación de ácido láctico (Propil-glucósido lactato) para la síntesis de agentes humectantes y protectores solares.	Acetona / 50°C	Wei y col., 2003
<i>Candida rugosa</i> ChiroCLEC-CR®	Farmacia	Resolución de mezclas racémicas de naproxen etil éster	Polietilenglicol / 50°C	Brady y col., 2004
	Farmacia	Esterificación selectiva de colesterol	Ciclohexano / 40°C	Jonzo y col., 2000
	Farmacia	Resolución de mezclas racémicas de ibuprofeno	Isooctano / 30°C	Yu y col., 2004
	Farmacia	Síntesis de 5-4-(3-tienil)fenil-α-metil-acético* (* precursor de Atliprofen)	Dimetil sulfóxido	Mittal y col., 2005
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MTCC 103 cells Amano Enzyme Inc.	Biodiesel	Transesterificación de aceite de Jatropha	Metanol / 40°C	Devanesan y col., 2007
	Alimentos	Hidrólisis de aceite de sardina	Ciclohexano / 25°C	Fernández-Lorente y col., 2011
	Biodiesel	Alcoholólisis de triglicéridos	Metanol / 35°C	Salis y col., 2008
<i>Rhizomucor miehei</i> Lipozyme®	Alimentos	Transesterificación de aceite de girasol con butanol. Obtención de ácido oleico.	n-Hexano / 40°C	Dossat y col., 2002
	Reciclaje de polímeros	Hidrólisis de poliésteres alifáticos (poli (ε)-caprolactona)	Tolueno / 40-60°C	Pastorino y col., 2004
	Aromas y Sabores	Síntesis de etil-ésteres de cadena corta	Heptano / 30°C	Xu y col., 2002
	Alimentos	Síntesis de triglicéridos estructurados por acidólisis	Hexano / 40°C	Hita y col., 2010

1.8 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas mediante la unión a un soporte, lo que da lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998).

Entre las principales ventajas que representan los procesos de inmovilización se encuentran: 1) Un incremento en la estabilidad conformacional de la enzima y mayor rigidez estructural, lo que promueve la resistencia a la desactivación térmica o química; 2) se evita la agregación intermolecular; 3) la posibilidad de mantener o mejorar la actividad catalítica debido a los cambios difusionales, electrostáticos, estéricos y del microentorno que confiere el soporte; 4) la posibilidad de reutilizar el catalizador, lo cual contribuye a reducción de costos del proceso y, 5) la posibilidad de implementar un reactor enzimático de fácil manejo y control (Hartmeier, 1985; Goldstein, 1976). Sin embargo, también se han observado algunos inconvenientes relacionados con estos procesos tales como la disminución en la actividad catalítica debido a alteraciones conformacionales y el costo del biocatalizador con respecto a la enzima libre (Martinek y Mozhaev, 1987).

En general, los métodos de inmovilización se clasifican en dos categorías: 1) retención física y 2) unión química (Kennedy y Cabral, 1983) (Figura 1.2). Siendo este último grupo el más utilizado debido a la gran diversidad de soportes y tipos de enlace, que permiten obtener preparaciones enzimáticas con diferente conformación, orientación y rigidez (Arroyo, 1998).

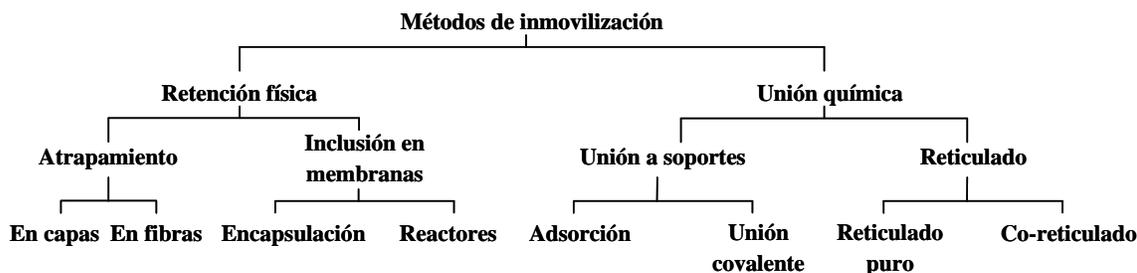


Figura 1.2 Categorías de los métodos de inmovilización

1.8.1 Inmovilización de lipasas

En diversos estudios sobre el mecanismo de reacción de las lipasas, se ha reportado que estas enzimas presentan el fenómeno de activación interfacial, es decir, que la actividad catalítica es mayor sobre agregados de lípidos (insolubles en agua) con respecto a la actividad que presentan sobre monómeros de lípidos en solución acuosa (Ramesh y col., 2000). Existen evidencias que señalan que dicho fenómeno involucra un cambio estructural de la enzima, el cual se presenta al entrar en contacto con la interfase aceite/agua (Pandey, 1999; Palomo y col., 2004a) e implica un equilibrio entre dos conformaciones de la enzima, una abierta y activa, y otra cerrada, considerada inactiva (Figura 1.3). En medios acuosos la concentración de la estructura abierta es menor con respecto a la estructura cerrada de la lipasa (Mingarro y col., 1995; Malcata y col., 1992), con lo que el equilibrio debe estar desplazado hacia esta segunda estructura. Por lo tanto, mediante las metodologías de inmovilización puede ser posible conseguir la estabilización de las distintas conformaciones que existen en las lipasas (Palomo, 2003a).

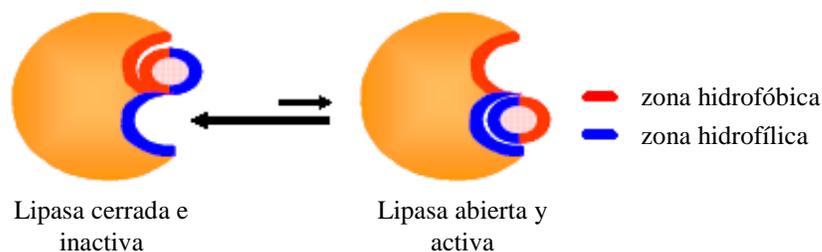


Figura 1.3 Equilibrio entre las distintas conformaciones de lipasas en medios acuosos homogéneos

La inmovilización de enzimas por adsorción interfacial sobre superficies hidrofóbicas da lugar a una fijación de la conformación abierta de la lipasa (Pernas y col., 2001; Palomo y col., 2003b), lo que podría verse reflejado en una mayor actividad y estabilidad. Sin embargo, la inmovilización de la lipasa mediante unión covalente multipuntual podría dar lugar a una mayor estabilización de la enzima con respecto a los monómeros en solución o aquellas moléculas inmovilizadas a través de un único enlace (unipuntual) (Guisán, 1988).

1.8.1.1 Inmovilización sobre Octil-agarosa

La tendencia de las lipasas a adsorberse sobre superficies hidrofóbicas a través del mecanismo de activación interfacial, se ha empleado para desarrollar una metodología de inmovilización específica para estas enzimas, que consiste en la adsorción interfacial de las lipasas sobre soportes como: Octil-agarosa (Bastida y col., 1998), Octadecil-Sepabeads (Cabrera y col., 2009b) e hidrofobinas inmovilizadas sobre Glioxil-agarosa (Palomo y col., 2003c) a baja fuerza iónica. En estas condiciones, las lipasas interactúan con la superficie del soporte de la misma manera que lo hacen al entrar en contacto con la superficie hidrofóbica de las gotas de su sustrato natural (grasas y aceites). De esta manera, se adsorben fuertemente al soporte, a través de la tapa que cubre el sitio activo y de la región hidrofóbica que lo rodea, fijándose así la conformación abierta (Figura 1.4). Por tanto, este tipo de inmovilización permite en un único paso la inmovilización y en algunos casos la purificación e hiperactivación interfacial de las lipasas (Bastida y col., 1998; Fernández-Lorente y col., 2008a).

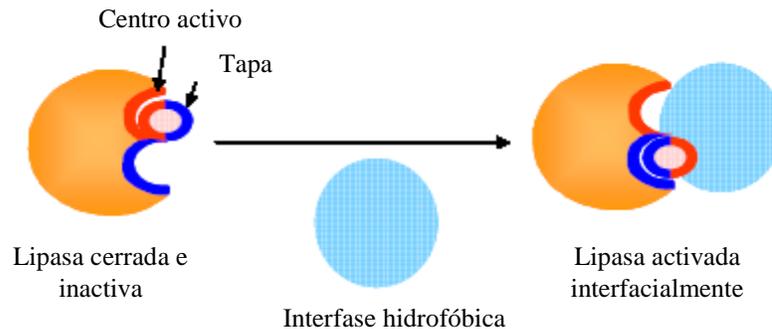


Figura 1.4 Adsorción interfacial de lipasas sobre soportes hidrofóbicos

1.8.1.2 Inmovilización sobre MANAE-glutaraldehído

El empleo de soportes cuya base molecular es agarosa y que son recubiertos en su superficie por grupos amino y posteriormente activados superficialmente con grupos glutaraldehído, permite inmovilizar enzimas a través de la formación de enlaces covalentes entre los grupos aldehído ($-CHO$) del soporte y los grupos amino ($-NH_3^+$) de las lisinas presentes en la superficie de la proteína, en medios a pH 7 y con baja fuerza iónica (Figura 1.5) (Fernández-Lafuente y col., 1993).

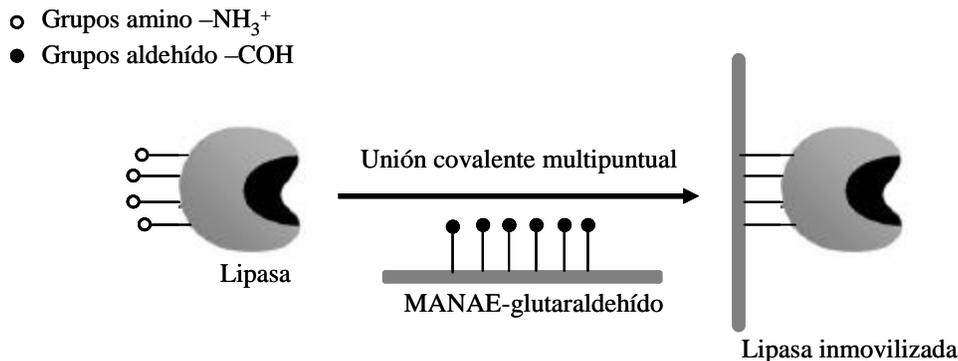


Figura 1.5 Inmovilización de lipasas por unión covalente multipuntual

Este método de inmovilización confiere una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desnaturalización térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados. Otra ventaja tecnológica de la inmovilización covalente multipuntual radica en la posibilidad de modificar químicamente a la enzima al final del proceso, lo que confiere cambios en su actividad, estabilidad y selectividad (Fernández-Lorente y col., 2008b).

1.8.2 Modificación química de lipasas inmovilizadas: Aminación

Las enzimas inmovilizadas a través de unión covalente (uni- o multipuntual) son susceptibles a posteriores modificaciones químicas cuyo fin es modificar la actividad, estabilidad y selectividad del biocatalizador. Lo anterior, debido a la modificación que se produciría sobre las interacciones globales de las conformaciones presentes en el equilibrio (abierta y cerrada), al modificarse la estructura abierta de la enzima (Palomo, 2003).

La aminación es una modificación química empleada para modificar la enantioselectividad de enzimas inmovilizadas (Palomo y col., 2007), la cual se fundamenta en la reactividad de los grupos carboxilo ($-\text{COO}^-$) de los ácidos aspártico y glutámico presentes en la superficie de la proteína con el compuesto 1,2-etilendiamina (EDA), previa activación

con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocioruro (EDC) (Figura 1.6) (Fernández-Lorente y col., 2008b).

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocioruro

EDA: 1,2-etilendiamina

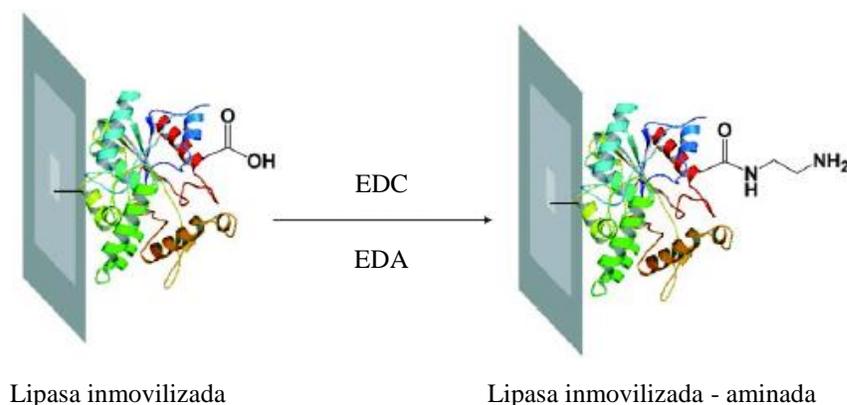


Figura 1.6 Aminación de lipasas inmovilizadas

1.8.3 Modificación de las propiedades enantio- y regioselectivas de lipasas por métodos de inmovilización

Se ha mencionado que las lipasas presentan el fenómeno de activación interfacial como parte de su mecanismo catalítico, lo que ha permitido postular que si el equilibrio en el proceso de apertura y cierre cambia, así como la conformación abierta de la lipasa, podrían modificarse las propiedades catalíticas de la misma. De esta forma, la posibilidad de controlar y alterar este equilibrio se convierte en una herramienta de mejora de las propiedades de las lipasas para aplicaciones de interés industrial, principalmente en aquellas que se enfocan en la producción de compuestos enantioméricamente puros. Por tanto, esta alteración del equilibrio podría llevarse a cabo mediante el empleo de diferentes técnicas de inmovilización en las cuales se involucren distintas áreas de la enzima, en donde sea posible controlar: i) la orientación de la lipasa sobre el soporte, ii) la rigidez de las lipasas inmovilizadas, y iii) los micro-ambientes que rodean las moléculas de lipasas inmovilizadas (Palomo, 2003).

Capítulo 2

Justificación

2. JUSTIFICACIÓN

Por su versatilidad catalítica las lipasas tienen un alto potencial de aplicaciones biotecnológicas en diversos sectores industriales (alimenticio, farmacéutico, químico, agroindustrial, ecológico). Actualmente se encuentran en el mercado diversas preparaciones comerciales de lipasas (*Lipolasa*, Novo Industri A/S; *Lipozyme*, Novo Industri A/S), sin embargo, aún no se ha logrado cubrir la demanda industrial debido principalmente, a que se requieren enzimas que presenten una mayor estabilidad operacional ante diferentes condiciones de proceso. Por ello, existe actualmente un creciente interés en la búsqueda y en el estudio de enzimas que posean alta estabilidad ante diversas condiciones de reacción, que permita su uso en continuo en los procesos industriales durante tiempos prolongados.

Una de las principales propuestas para solucionar el problema de la estabilidad operacional, es aislar y seleccionar nuevas cepas de organismos termotolerantes y termófilos para llevar a cabo la producción de enzimas. Debería subrayarse que, asociadas a la termoestabilidad de las enzimas, se han encontrado otras propiedades como son la resistencia a la desnaturalización por químicos y solventes orgánicos.

Por otra parte, el empleo de tecnologías económicas y sencillas como es el caso de los procesos de fermentación en medio sólido (FMS), así como algunos métodos de inmovilización, haría posible la obtención de lipasas económicas y estables, dos de los requisitos más solicitados por las industrias biotecnológicas.

Capítulo 3

Hipótesis

3. HIPÓTESIS

El uso de hongos termotolerantes y termófilos como organismos productores de lipasas permitirá obtener lipasas con una alta estabilidad térmica, que podría estar asociada con una alta estabilidad en solventes orgánicos; lo que permitiría su aplicación en reacciones de síntesis de moléculas de importancia industrial. Además, la estabilidad inherente de este tipo de enzimas podría ser aumentada a través de sistemas de inmovilización; así como, sus especificidades podrían ser modificadas.

Capítulo 4

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la estabilidad de las lipasas producidas por fermentación en medio sólido empleando siete cepas de hongos termotolerantes y termófilos, en función de la temperatura y de la polaridad de solventes orgánicos, y evaluar la selectividad de los biocatalizadores obtenidos por diversos métodos de inmovilización.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones del sistema de fermentación en medio sólido para la producción de lipasas por siete cepas de hongos termotolerantes y termófilos.
- Evaluar el efecto de la temperatura y de los solventes orgánicos sobre la actividad y estabilidad de las lipasas producidas por fermentación en medio sólido.
- Evaluar el efecto del tipo de inmovilización sobre la actividad y estabilidad de las lipasas producidas en fermentación por medio sólido.
- Evaluar el efecto del tipo de inmovilización sobre la enantioselectividad de las lipasas producidas en fermentación en medio sólido.
- Identificar por espectrometría de masas, la estructura primaria de las lipasas presentes en bandas de geles de poliacrilamida y reveladas por una técnica de zimografía para lipasas.

Capítulo 5

Materiales y Métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE I

Producción de lipasas en fermentación en medio sólido

5.1 Microorganismos

Las cepas fúngicas empleadas en este trabajo fueron *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (9a), *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (13b), *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (19), *Rhizomucor pusillus* (23a), *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43a) y *Rhizopus microsporus* (56c). Las cepas fueron aisladas a partir de pasta de copra de coco (Córdova y col., 2003) y donadas por el Dr. Jesús Córdova López (Departamento de Química, Universidad de Guadalajara) a la colección microbiana de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. La identificación de estas cepas fue realizada por el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, México (Anexo A). La cepa fúngica *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a) perteneciente a la colección microbiana del IRD (Institut de Recherche pour le Développement), Marsella, Francia, fue donada por el Dr. Sevastianos Roussos.

5.2 Enzima comercial

La lipasa de *Rhizomucor miehei* cuyo nombre comercial es Lipozyme® RM IM fue donada por Novozymes® (México). El gen de esta enzima es clonado y expresado en *Aspergillus oryzae* y su producción se lleva a cabo mediante fermentación sumergida. Posteriormente, se purifica e inmoviliza sobre una resina macroporosa de intercambio aniónico. El producto es de aspecto granular de color marrón, con un tamaño de partícula entre 0.2-0.6 mm y un contenido de humedad máximo del 5% (Novozymes A/S; Camacho y col., 2003).

5.3 Reactivos

Durante el desarrollo de este trabajo se emplearon medios de cultivo de la marca Bioxon[®] (México); reactivos analíticos y disolventes orgánicos de las marcas J.T. Baker[®] (México) y Sigma-Aldrich[®] (EUA), aceite de oliva producido por Carbonell de Córdoba, S.A. (España) y los tamices moleculares tipo 4A fueron proveídos por Fluka[®] (Italia).

5.4 Mantenimiento de los cultivos

Las cepas fúngicas se cultivaron sobre agar papa y dextrosa (PDA) en tubos inclinados durante siete días a 45 °C y posteriormente se almacenaron a 4 °C.

5.5 Preparación de inóculos

Las cepas fúngicas se sembraron por estría en tubos de ensayo con PDA, mismos que se incubaron a 45 °C por 7 días. Al fin de este periodo, se vertieron 10 mL de Tween 80 al 0.01 % (v/v) y se agitó en vortex por 30 s. Posteriormente, alícuotas de 0.5 mL de esta suspensión se adicionaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 60 mL del medio de esporulación (PDA) y se incubaron por 7 días a 45 °C. Finalmente, las esporas fueron suspendidas en una solución de Tween-80 al 0.01% (v/v) y contadas mediante una cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases (Olimpus[®] BX40).

5.6 Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo para la producción de lipasas fue la siguiente (Rodríguez y col., 2006) (g/L): urea (6.0); aceite de oliva (60.0); lactosa (7.5); K₂HPO₄ (7.5); MgSO₄•7H₂O (1.5); alcohol polivinílico (2.4) y 6 mL/L de una solución de oligoelementos cuya composición fue la siguiente (g/L): EDTA (10); MnCl₂•4H₂O (1.98); CoSO₄•7H₂O (2.81); CaCl₂•2H₂O (1.47); CuCl₂•2H₂O (0.17); ZnSO₄•7H₂O (0.29). El pH del medio se ajustó a 6.5. Posteriormente, se incorporó el aceite de oliva y se emulsificó el medio de cultivo con un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA-WERK[®]) a 10 000 rpm por 10 min.

5.7 Producción de lipasas por fermentación en medio sólido

La cepa *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a) se empleó para establecer las condiciones de cultivo de la fermentación en medio sólido. En una primera etapa, se probó el efecto del contenido de humedad inicial (55% y 65%) y el tamaño de partícula en el medio de fermentación sobre el crecimiento del microorganismo y la producción de actividad lipasa, empleando espuma de poliuretano de baja densidad (PUF) como soporte inerte. Posteriormente, se evaluaron sobre estas mismas variables el efecto del tipo de soporte sólido inerte: PUF y agrolita expandida.

5.7.1 Tratamiento del soporte inerte para la fermentación en medio sólido

Los soportes sólidos inertes probados para evaluar el crecimiento del microorganismo y la producción de actividad lipasa fueron: espuma de poliuretano de baja densidad (PUF) y agrolita expandida. Ambos materiales se tamizaron para obtener partículas con un tamaño entre 0.84 y 2.0 mm (Anexo B). Además, se realizaron dos lavados con agua destilada a 25 °C y un tercer lavado a 60 °C, se escurrió el exceso de agua del material y fue secado en estufa a 60 °C por 24 h. El contenido de humedad final en ambos soportes fue menor al 1% (p/p).

5.7.2 Fermentación en medio sólido (FMS)

En todos los procesos, los soportes se impregnaron con el medio de cultivo y se inóculo con una suspensión de esporas (3×10^7 esporas por gramo de soporte sólido inerte). En todos los casos, el volumen de inóculo fue menor al 5% con respecto al volumen total del medio de cultivo. Posteriormente, los fermentadores de tipo columna (2 cm x 20 cm) fueron empacados con 8 g de PUF impregnado ó 20 g de agrolita impregnada. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura, 45 °C; tasa de aireación, 40 mL/min; pH inicial, 6.5. Durante el transcurso de la fermentación, se tomaron dos columnas en cada tiempo de muestreo. Cabe mencionar que, tanto el medio de cultivo como los fermentadores en columna y el aire de entrada, no fueron esterilizados para la producción de lipasas. Para la extracción de las lipasas, el material fermentado obtenido fue mezclado con agua destilada (1:10 w/v) y agitado en vórtex por 1 min. Posteriormente, las partículas sólidas fueron filtradas a través de papel Whatman® No. 41 y el filtrado fue empleado para determinar la actividad lipasa. Los

parámetros cinéticos de la fermentación, como la tasa específica de crecimiento (μ) y fase *lag* fueron estimados a través de la actividad respiratoria, midiendo la producción de CO₂ durante el transcurso del cultivo. Para este propósito, se conectó un sistema de monitoreo en línea a la corriente de aire de salida proveniente de los fermentadores en columna. Este sistema, consistió en un cromatógrafo de gases acoplado a una computadora personal y se utilizó el software Chroma versión 3 (Biosystemes[®], Francia) para el análisis de datos (Saucedo-Castañeda y col., 1994).

5.7.2.1 Cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento

Los valores de la tasa específica de crecimiento (μ) y fase *lag* se estimaron de acuerdo a los criterios propuestos por Saucedo-Castañeda y col. (1994). En cuyo trabajo se establece que, a través de la actividad respiratoria del cultivo y específicamente empleando los datos de concentración de CO₂, es posible obtener en función del tiempo los perfiles de la tasa de generación de CO₂, la producción total de CO₂ y a partir de este último, calcular el valor del ln CO₂, de cuya curva se consideran los puntos que se ajustan a un modelo de crecimiento exponencial para estimar el valor de μ (Figura 5.1). En otros términos, considerando la definición de μ (1) y el rendimiento $Y_{CO_2/X}$ constante (2), se obtiene (3).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \left(\frac{Y_{CO_2/X}}{Y_{CO_2/X}} \right) = \frac{1}{C_{CO_2}} \frac{dC_{CO_2}}{dt} \quad (2)$$

$$\mu_{CO_2} = \frac{1}{C_{CO_2}} \frac{dC_{CO_2}}{dt} \quad (3)$$

Al integrar esta ecuación se obtiene:

$$\mu_{CO_2} = \frac{\ln\left(\frac{C_{CO_2f}}{C_{CO_2i}}\right)}{t_f - t_i} \quad (4)$$

Donde,

μ : tasa específica de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial

X : concentración de biomasa al tiempo t del crecimiento exponencial

C_{CO_2} : concentración de dióxido de carbono

C_{CO_2i} : concentración de dióxido de carbono al inicio de la fase de crecimiento exponencial

C_{CO_2f} : concentración de dióxido de carbono al final de la fase de crecimiento exponencial

t_i : tiempo de inicio de la fase de crecimiento exponencial

t_f : tiempo final de la fase de crecimiento exponencial

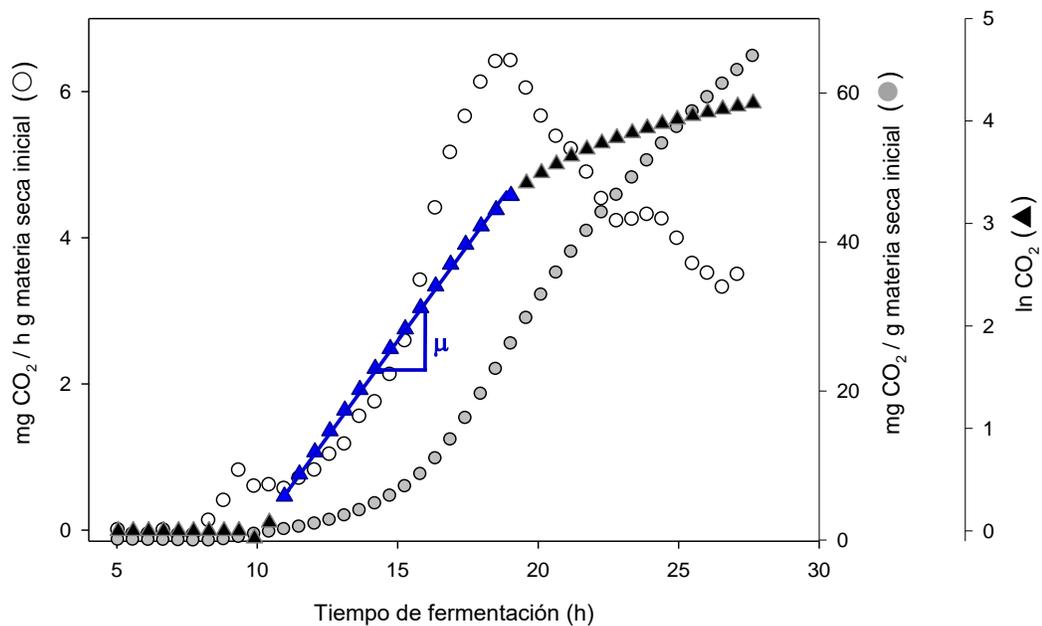


Figura 5.1 Perfiles de la tasa de generación de CO_2 (○) y producción total de CO_2 (●) durante el cultivo de hongos filamentosos en medio sólido. Estimación de la tasa específica de crecimiento a través del perfil del $\ln CO_2$ (▲).

Con base en estas consideraciones, es posible estimar μ como el valor de la pendiente de una gráfica del logaritmo de la concentración de CO₂ contra el tiempo (ecuación 4), en la fase de crecimiento exponencial y la fase *lag* al considerar el valor de la ordenada al origen igual a cero.

5.8 Secado de los sólidos fermentados (Biocatalizadores)

Los sólidos fermentados fueron deshidratados por liofilización y por arrastre de vapor. En el primer caso la materia húmeda fermentada fue congelada por un baño refrigerante de acetona/hielo seco en matraces de bola (2 L) y secada por liofilización en un equipo LYPH LOCK 6 (LABCONCO®) bajo las siguientes condiciones de operación: -50 °C y vacío de 0.01 mm Hg. En el segundo caso (deshidratación por arrastre de vapor), la materia húmeda fermentada, contenida en las columnas de vidrio, fue deshidratada con una corriente de aire a una temperatura de entrada de 33 °C y flujo de 10 L/min. Los sólidos fermentados deshidratados (Biocatalizadores) fueron empleados para evaluar la estabilidad de las lipasas en función de la polaridad de los disolventes orgánicos y la temperatura.

5.9 Producción de lipasas inmovilizadas en los sólidos fermentados (Biocatalizadores)

Una vez establecidas las condiciones de fermentación en medio sólido (FMS) y empleando agrolita como soporte inerte, se llevó a cabo la producción de lipasas por seis cepas de hongos termotolerantes (*Rhizopus* sp.) y una cepa termófila (*Rhizomucor* sp.) a 45 °C por 20 h.

5.10 Métodos analíticos

5.10.1 Cuantificación de la actividad lipasa en reacciones de hidrólisis

Dependiendo de la naturaleza de la muestra enzimática (extracto líquido o sólido fermentado deshidratado), se empleó uno de los dos métodos analíticos siguientes para estimar la actividad lipolítica.

5.10.1.1 Hidrólisis de *p*-nitrofenil palmitato

La actividad lipasa en los extractos enzimáticos líquidos (Sección 5.7.2) se determinó de acuerdo al protocolo de Pencreac'h y Baratti (1996) con algunas modificaciones y en el cual, se monitorea el incremento en la absorbancia debido a la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NF) por acción de las lipasas, al hidrolizar el sustrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*NFP) (Figura 5.2).

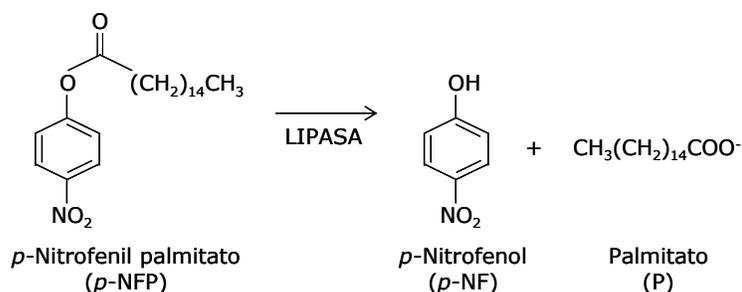


Figura 5.2 Hidrólisis de *p*-nitrofenil palmitato

El sustrato se preparó emulsificando un volumen (0.27 mL) de una solución 13.4 mM de *p*NFP (en *i*-propanol) en 9 volúmenes (2.43 mL) de un amortiguador 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 (a 45 °C), 20 mM CaCl_2 y 0.25% (p/v) alcohol polivinílico (APV). La mezcla de reacción consistió en 2.7 mL de emulsión y 0.3 mL de extracto enzimático diluido en un amortiguador 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 (a 45 °C). Una vez iniciada la reacción, la absorbancia se monitoreó por 3 min en un espectrofotómetro (SHIMADZU® UV-160) a 410 nm con control de temperatura a 45 °C. La velocidad de reacción se calculó a partir de la pendiente de la curva de absorbancia *versus* tiempo. El coeficiente de extinción molar (ϵ) para el *p*NF fue de $15.783 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$. Este valor se determinó a partir de una curva estándar de *p*NF construida en un rango de concentración de 0 a 100 μM y bajo las condiciones de ensayo descritas con anterioridad (Anexo C). Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*NF por min a 45 °C y pH 8. Para cada muestra, se realizaron ensayos de actividad por triplicado y los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar.

5.10.1.2 Hidrólisis de aceite de oliva

La actividad lipasa en los biocatalizadores (sólidos fermentados deshidratados) se midió empleando un método colorimétrico, el cual se basa en la formación de sales de cobre de ácidos grasos libres (Figura 5.3) (Kwon y Rhee, 1986) con algunas modificaciones (Rodríguez y col., 2006). La mezcla de reacción constó de 20 g de aceite de oliva y 100 mL de un amortiguador 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 (a 45 °C), 10 mM CaCl₂, 0.25% (p/v) alcohol polivinílico y 0.3% (p/v) goma arábiga. Este sistema se emulsificó a 10 000 rpm por 10 min (45 °C) con un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA-WERK®). La reacción se inició adicionando 3 mL de emulsión a 40 mg de biocatalizador. Posteriormente, el sistema se incubó a 45 °C por 15 min, y la actividad enzimática se detuvo con 0.6 mL de 6 M HCl.

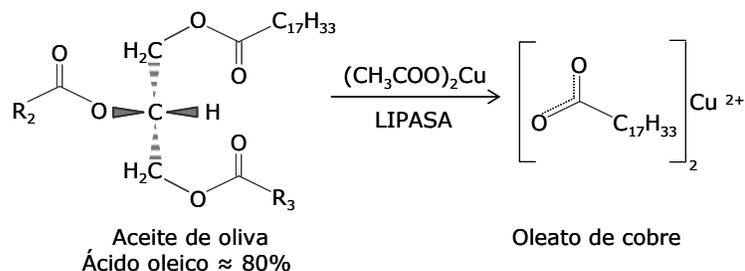


Figura 5.3. Hidrólisis de aceite de oliva

Los ácidos grasos liberados fueron extraídos en 3 mL de *n*-heptano y con agitación en vórtex por 30 s. Los tubos fueron centrifugados (9 800 x *g*, 10 min, 4 °C) y 0.5 mL de una solución de acetato de cobre-piridina (50 g/L, pH 6.1) se adicionó a 2.5 mL de la fase orgánica recuperada, seguido de agitación por 30 s en vórtex. La absorbancia se midió a 715 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU® UV-160). Para cada muestra se corrió un ensayo simultáneo (blanco), inactivando previamente el biocatalizador con 0.6 mL de 6 M HCl. Para cuantificar la actividad lipasa se construyó una curva de calibración de ácido oleico en un rango de concentración de 0 a 20 mM (Anexo D). Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de ácido graso por min a 45 °C y pH 8. Para

cada muestra, se realizaron ensayos de actividad por triplicado y los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar.

En ambos métodos de ensayo, la actividad (U) fue referida a los sólidos fermentados y deshidratados, expresada como materia seca (ms). Para Lipozyme[®] RM IM, la actividad se expresó en unidades por gramo de preparación comercial deshidratada, que incluye el soporte de inmovilización sólido e inerte y la proteína enzimática.

5.10.2 Actividad lipasa en reacciones de síntesis de oleato de etilo

La síntesis de oleato de etilo (Figura 5.4) se determinó a través de la cuantificación de ácido oléico residual, empleando el protocolo de Lowry-Tinsley (1976).

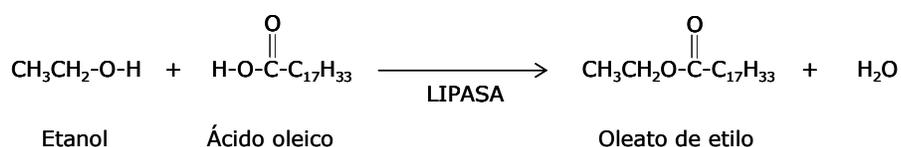


Figura 5.4 Síntesis de Oleato de etilo

La reacción de síntesis se llevó a cabo en viales ámbar de vidrio (3 mL) con tapa de rosca, empleando una proporción de ácido oleico:etanol 1:5. En cada vial se agregó 0.1 g de biocatalizador a 2 mL de una solución 50 mM ácido oleico en *n*-heptano. La reacción se inició con la adición de etanol al 99.9%, incubando a 45 °C por 2 h. Durante este periodo, el contenido de los viales se homogeneizó de manera intermitente con un agitador orbital a 150 rpm durante un minuto cada cinco minutos. La reacción se detuvo agregando 0.5 mL 6 M HCl y se tomó una alícuota (0.3 mL) de la fase orgánica, que fue diluida con 1.2 mL *n*-heptano. Posteriormente, se adicionó 1 mL de una solución de acetato de cobre-piridina (50 g/L, pH 6.1) seguido de agitación en vórtex por 30 s. Para cada muestra se corrió un ensayo simultáneo (blanco), inactivando previamente el biocatalizador con 0.5 mL de 6 M HCl. Para cuantificar la actividad lipasa se construyó una curva de calibración de ácido oleico en un rango de concentración de 0 a 20 mM (Anexo D). Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar.

PARTE II

Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos

5.11 Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos

Se evaluó el efecto de los solventes orgánicos sobre la estabilidad de las lipasas (incluyendo la enzima comercial Lipozyme[®] RM IM). Los siguientes solventes orgánicos fueron seleccionados y clasificados de acuerdo a sus valores de Log P y momento dipolar en unidades Debye (D), respectivamente (Laane y col., 1987; Smallwood, 1996): acetonitrilo (-0.33, 3.2), acetona (-0.23, 2.88), acetato de etilo (0.68, 1.78), etanol (-0.24, 1.69), *i*-propanol (0.28, 1.66), tolueno (2.5, 0.36), *n*-hexano (3.5, 0) y *n*-decano (5.6, 0). Para análisis subsecuentes se incluyeron, alcohol *i*-amílico (1.16, 1.8) y tetrahidrofurano (0.49, 1.75). Todos los solventes fueron deshidratados con tamices moleculares tipo 4A (tamaño de poro de 4 Å, diámetro 1.7-2.4 mm) previamente a su uso. Los biocatalizadores (0.15 g) se incubaron con 1 mL de solvente por 1 h a 25 °C. Al fin de este periodo, el solvente fue removido a través de una corriente de aire con un flujo de 22 L/min durante 2 min. La actividad lipasa residual se midió por hidrólisis de aceite de oliva (sección 5.10.1.2) y se reportó la actividad enzimática relativa (% AER), empleando como referencia biocatalizadores no expuestos a solventes orgánicos. Finalmente, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se llevaron a cabo pruebas de comparación de medias (Duncan) empleando el paquete estadístico NCSS (2000). El nivel de significancia en todos los casos fue $\alpha < 0.05$.

5.12 Efecto de solventes orgánicos y temperatura sobre la estabilidad de lipasas

Para probar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las enzimas, 0.5 g de biocatalizador se incubó a 30, 40 y 50 °C en 1.5 mL de solventes orgánicos con diferente polaridad (no polar = tolueno; polar prótico = *i*-propanol; polar aprótico = acetonitrilo) por 1 h. El solvente fue removido a través de una corriente de aire con un flujo de 22 L/min por 2 min. La actividad lipasa se determinó en función de la concentración de ácido oleico residual posterior a la síntesis de oleato de etilo a 45 °C en *n*-heptano (Sección 5.10.2). La actividad enzimática relativa (% AER) se reportó empleando como referencia un biocatalizador sin tratamiento.

PARTE III

Inmovilización de lipasas: Estudios de estabilidad y propiedades enantioselectivas

5.13 Materiales

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich[®]: Tritón X-100, *p*-nitrofenil butirato (*p*NFB), α -naftil acetato, Fast Blue RR (sal), Benzamidina y Glutaraldehído (25% p/v), 1,2-etilendiamina (EDA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto (EDC). Los reactivos de electroforesis fueron adquiridos en Bio-Rad[®]. El reactivo de Octil-agarosa CL-4B fue provisto por Amersham Biosciences[®] (Uppsala, Suecia), El monoaminoetil-*N*-etil-agarosa (MANAE-agarosa) se preparó empleando agarosa CL-4B (GE[®] Healthcare Bio-Sciences AB) y los soportes glutaraldehído se obtuvieron por la activación de los grupos amino primarios de MANAE-agarosa (López-Gallego y col., 2005). Los demás reactivos y disolventes orgánicos fueron grado analítico o HPLC marca J.T. Baker[®].

5.14 Producción y extracción de lipasas de los sólidos secos fermentados

La producción de los biocatalizadores se llevó a cabo en fermentación en medio sólido por seis cepas de hongos termotolerantes y una cepa termófila, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.7.2.

Para la extracción de lipasas, los sólidos fermentados deshidratados fueron mezclados en una proporción 1:10 p/v, con un amortiguador de fosfatos 25 mM (pH 7), conteniendo Benzamidina 2 mM, para prevenir la proteólisis de las enzimas. Después de 45 min en agitación continua, las partículas sólidas fueron filtradas a través de papel Whatman[®] no. 1 y resuspendidas en un amortiguador de fosfatos 25 mM (pH 7) (1:4 p/v) conteniendo 0.5 % (v/v) de Tritón X-100 y Benzamidina 2 mM (Mateos y col., 2006). La suspensión fue filtrada (fracción 1) y el retenido se lavó con un volumen igual de amortiguador de fosfatos 25 mM (fracción 2) para obtener una concentración final de 0.25% (v/v) de Tritón X-100 al unir ambas fracciones. El filtrado se recuperó y centrifugó a 10700 x *g* por 30 min a 4 °C. Los

sobrenadantes obtenidos se emplearon para realizar ensayos de actividad lipolítica, electroforesis nativa, así como diferentes protocolos de inmovilización.

5.15 Cuantificación de actividad lipasa por hidrólisis de *p*-nitrofenil butirato

La determinación se llevó a cabo midiendo el incremento en absorbancia a 348 nm (punto isobéptico del *p*NF) producido por la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NF) en la hidrólisis de 0.4 mM *p*-nitrofenil butirato (*p*NFB) en un amortiguador 25 mM de fosfatos (pH 7) y 25 °C (Figura 5.5). Para iniciar la reacción, 0.1-0.2 mL del extracto o suspensión enzimática se adicionaron a 2.5 mL de la solución de sustrato. Una unidad de actividad (UI) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*NF por minuto bajo las condiciones descritas con anterioridad (Fernández-Lorente y col., 2008).

El coeficiente de extinción molar (ϵ), estimado a partir de una curva estándar de *p*NF, construida en un rango de concentración de 0 a 100 μ M y bajo las condiciones de ensayo descritas con anterioridad, fue de 6.8289 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ (Anexo E).

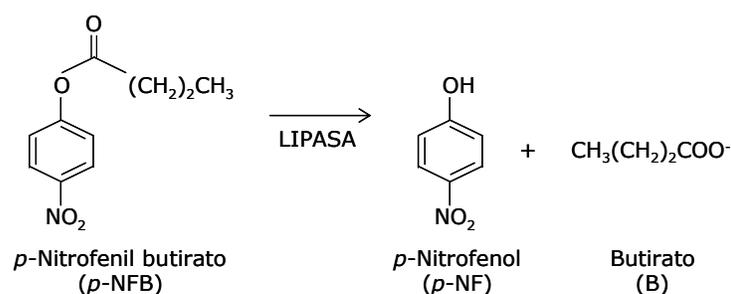


Figura 5.5 Hidrólisis de *p*-nitrofenil butirato

5.16 Zimografía

Para la visualización de bandas con actividad lipolítica en los extractos enzimáticos se empleó una técnica de electroforesis nativa en geles de poliacrilamida, de acuerdo al método de Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Se utilizó una cámara de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad®) con geles de acrilamida-bisacrilamida al 4% en la zona de

concentración y 12% en la zona de separación, ésta última con dimensiones de 85 x 60 x 0.75 mm. Los extractos enzimáticos con 2.5% (v/v) de Tritón X-100 se diluyeron en una proporción 1.5:1 v/v con un amortiguador de 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, que contenía 10% (v/v) de glicerol y 0.005% (w/v) de azul de bromofenol. Después, 20 μ L de cada muestra a una concentración de 0.25-0.30 μ g de proteína/ μ L se inyectaron en cada pocillo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente (20-25 °C) y 200 mV de corriente constante empleando como amortiguador 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina (pH 8.3) y 1% (v/v) de Tritón X-100 para disociar los agregados lipídicos. Un gel fue empleado para revelar las bandas de proteína mediante tinción con plata y en el segundo se revelaron las bandas con actividad lipasa. Para ello, se incubó en un amortiguador 0.1 M de fosfato de sodio (pH 6.2) conteniendo 0.02% (w/v) de α -naftil acetato (disuelto previamente en acetona) y 0.05% (w/v) de Fast Blue RR (sal). La actividad se detectó en 1 h (Palomo y col., 2004).

5.17 Preparación de agarosa pre-activada con glutaraldehído (MANAE-glutaraldehído)

El soporte de agarosa pre-activado con glutaraldehído se preparó suspendiendo 10 mL de MANAE-agarosa (Fernández-Lafuente y col., 1993) en 20 mL de glutaraldehído al 15% (v/v) disuelto en un amortiguador 200 mM fosfatos (pH 7.0). La suspensión se mantuvo en agitación suave por 15 h a 25 °C. Posteriormente, el gel se filtró y lavó, en una primera etapa con un amortiguador 25 mM fosfatos (pH 7.0) y finalmente con agua destilada. El soporte fue utilizado inmediatamente debido a la baja estabilidad de los grupos glutaraldehído.

5.18 Inmovilización de lipasas

La inmovilización de lipasas se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos de Bastida y col. (1998) (Octil-agarosa) y Filho y col. (2008) (MANAE-glutaraldehído) con algunas modificaciones. Una cantidad de 2 g de soporte fue suspendido en 80 mL de un amortiguador 25 mM fosfatos a pH 7.0, conteniendo 2 mM Benzamidina y aproximadamente 10 U de actividad lipasa evaluada sobre *p*NFB. Se adicionó 0.25% (v/v) de Triton X-100 para evitar la inmovilización de dímeros lipasa-lipasa, los cuales podrían exhibir propiedades diferentes a

los monómeros (Palomo y col., 2003). Las suspensiones se mantuvieron en agitación suave a 25 °C y de manera periódica, se tomaron muestras tanto de la suspensión como del sobrenadante para determinar la actividad enzimática sobre *p*NFB (Sección 5.15). Al final del proceso, los derivados inmovilizados se filtraron, lavaron con agua destilada y almacenaron a 4 °C hasta el momento de su uso. En todos los casos, un extracto enzimático (control) se incubó en las mismas condiciones de inmovilización (pH, temperatura y fuerza iónica). La actividad enzimática de estos controles se conservó durante todo el proceso de inmovilización, por lo cual, la disminución observada en la actividad del sobrenadante puede estar directamente relacionada al rendimiento de inmovilización.

5.18.1 Aminación química de lipasas inmovilizadas

Un gramo del derivado MANAE-glutaraldehído de la lipasa producida por la cepa 19 se adicionó a 10 mL de una solución 1M de 1,2-etilendiamina (EDA) a pH 4.75. A esta suspensión se adicionó 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto (EDC) a una concentración 10 mM (para una aminación completa de los grupos carboxilo de la superficie de la enzima). Después de 90 min de agitación suave y constante a 25 °C, la preparación inmovilizada-modificada fue filtrada y lavada con un exceso de agua destilada. Los derivados aminados (MANAE-glutaraldehído-NH₂) fueron almacenados a 4 °C (Palomo y col., 2007).

5.19 Hidrólisis enantioselectiva y asimétrica

Las reacciones de hidrólisis y las técnicas de análisis para evaluar la enantioselectividad de las lipasas inmovilizadas, se realizaron de acuerdo a los protocolos propuestos por Fernández-Lorente (2000). Se determinó la enantioselectividad en la hidrólisis de los compuestos quirales ácido (±)-2-*O*-butiril-2-fenilacético [(±)-OBFA] (Figura 5.6) y (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo [(±)-HFBE] (Figura 5.7), obteniendo como productos principales ácido mandélico (AM) y ácido-2-hidroxi-4-fenilbutanoico (AHFB), respectivamente. Para llevar a cabo las reacciones, se adicionó 0.5 g del derivado enzimático a 2.5 mL y 5 mL de una solución 5 mM (±)-OBFA y 2 mM (±)-HFBE, respectivamente.

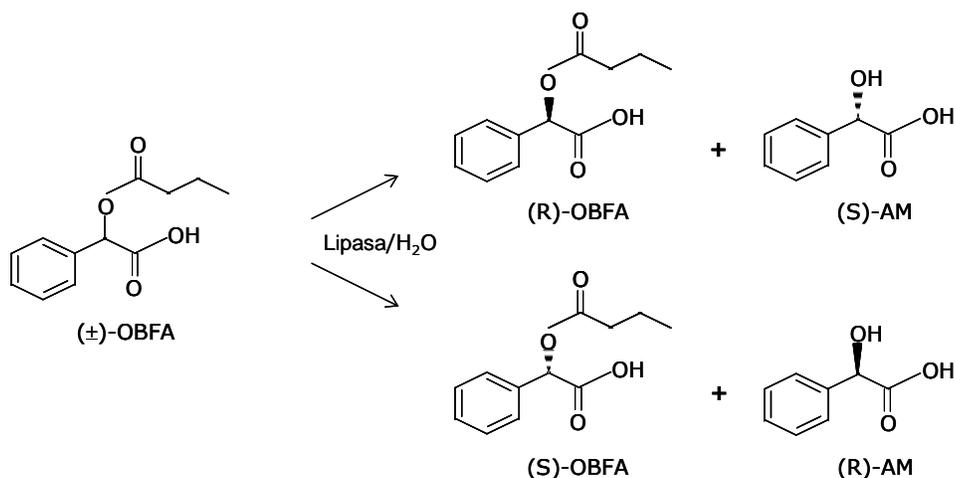


Figura 5.6 Hidrólisis enantioselectiva del ácido (±)-2-*O*-butiril-2-fenilacético

Para llevar a cabo la hidrólisis asimétrica, se agregó 0.5 g del derivado enzimático a 2.5 mL de una solución 1 mM de los sustratos pro-quirales di-*n*-metil [DMFG] (Figura 5.8a) y di-*n*-etil-fenil-glutarato [DEFG] (Figura 5.8b). Los experimentos se llevaron a cabo empleando diferentes condiciones de reacción (pH, temperatura y % co-disolvente) con agitación mecánica constante.

El grado de hidrólisis se determinó por HPLC (Spectra Physic SP 100) en fase reversa, empleando una columna Kromasil C18 (250 x 4.6 mm) marca Análisis Vinicos® (España). Para el sustrato [(±)-OBFA], se utilizó una elusión isocrática con una fase móvil que consiste en 30% (v/v) acetonitrilo-70% (v/v) amortiguador 10 mM fosfato de amonio a pH 2.95 y un flujo de 1.5 mL/min. La absorbancia del eluyente fue medida por un detector UV a 255 nm (Spectra Physic SP 8450). Para el sustrato [(±)-HFBE], la elusión fue isocrática empleando una fase móvil de 40% (v/v) acetonitrilo-60% (v/v) amortiguador 10 mM fosfato de amonio a pH 2.8 y un flujo de 1 mL/min. La elusión se monitoreó a 205 nm. Para los sustratos [DMFG] y [DEFG] la elusión fue isocrática con una fase móvil de 45% (v/v) acetonitrilo-55% (v/v) amortiguador 10 mM fosfato de amonio a pH 3 y un flujo de 1 mL/min. La elusión se monitoreó a 205 nm.

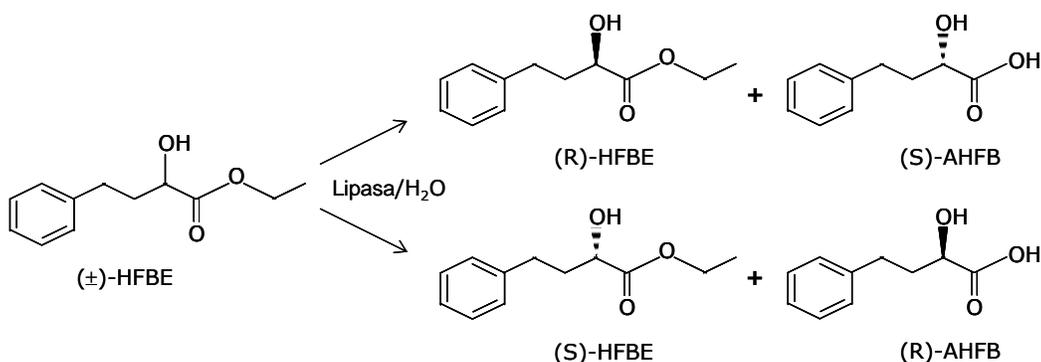


Figura 5.7 Hidrólisis enantioselectiva de (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo

Los isómeros de los ácidos liberados fueron analizados por HPLC en fase reversa. Se empleó una columna Chiralcel[®] OD-R 10 μm (250 x 4.6 mm) empacada con sílica-gel, la cual se encuentra cubierta de Celulosa tris(3,5-dimetilfenil carbamato), el proveedor fue Daicel Chemical Industries[®], Ltd (Japón). Para la hidrólisis de [(±)-OBFA] la fase móvil consistió en una mezcla de 5% (v/v) acetonitrilo-95% (v/v) 0.5 M NaClO₄/HClO₄, a pH 2.3, se utilizó un flujo isocrático a 0.45 mL/min y se midió la absorbancia del eluyente a 225 nm. Para el análisis de los isómeros producidos por la hidrólisis del sustrato [(±)-OBFA] la fase móvil fue una mezcla isocrática de 20% (v/v) acetonitrilo-80% (v/v) 0.5 M NaClO₄/HClO₄, a pH 2.3, con un flujo de 0.5 mL/min, analizando la absorbancia de la elusión a 205 nm. En la hidrólisis de los sustratos pro-quirales [DMFG] y [DEFG], la asimetría del monoéster liberado, (±)-*n*-metilfenilglutarato (MFG) ó (±)-*n*-etil-fenilglutarato (EFG), fue analizado empleando una mezcla isocrática de 35% (v/v) acetonitrilo-65% (v/v) amortiguador 10 mM fosfato de amonio a pH 3 y un flujo de 0.7 mL/min. La absorbancia del eluyente se monitoreó a una longitud de onda de 205 nm.

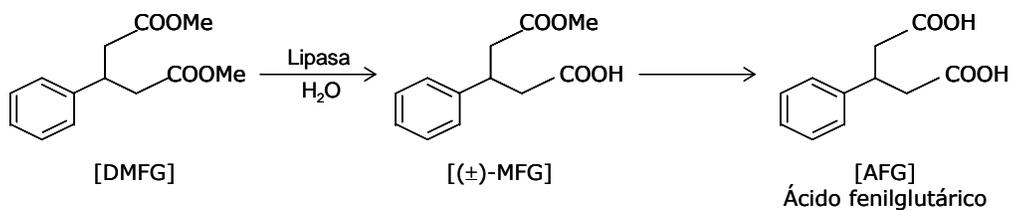


Figura 5.8a Hidrólisis asimétrica del éster pro-quiral di-*n*-metil-fenil-glutarato

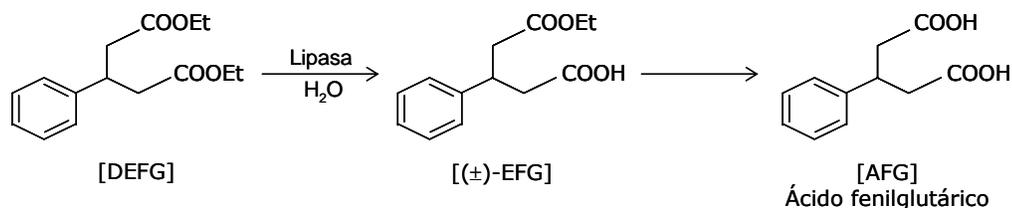


Figura 5.8b Hidrólisis asimétrica del éster pro-quiral di-*n*-etil-fenil-glutarato

5.20 Cálculo del valor *E*

La proporción enantiomérica (*E*) se calculó como la proporción entre el porcentaje del isómero hidrolizado *R* y el isómero *S*, a partir de la mezcla racémica a diferentes grados de hidrólisis (Palomo y col., 2007).

5.21 Cálculo del valor *A*

El factor de asimetría (*A*) se reportó como la proporción entre los isómeros del monoéster, *n*-metil fenil-glutarato [MFG] y *n*-etil fenil-glutarato [EFG] (Fernández-Lorente y col., 2008a).

PARTE IV

Digestión trípica de proteínas separadas mediante electroforesis en condiciones nativas para posterior identificación por espectrometría de masas

Los estudios de espectrometría de masas fueron realizados de acuerdo al protocolo propuesto por Shevchenko y col. (1996) en el “Centro de Investigación de Carbohidratos Complejos” de la Universidad de Georgia, Athens (Estados Unidos), con la colaboración del Dr. Gerardo Gutiérrez Sánchez y el Dr. Ricardo Hernández Martínez.

La digestión trípica y la identificación de proteínas por espectrometría de masas se llevó a cabo en tres etapas experimentales. Los reactivos empleados y su preparación se desglosan en el anexo F.

5.22 Recuperación y digestión trípica de proteínas

La banda con actividad lipasa fue recuperada del gel de poliacrilamida por escisión y dividida en trozos más pequeños. Posteriormente, se adicionó la solución desteñidora (500 μL) y se dejó reposar por 12 h.

La solución desteñidora fue removida y los trozos de gel se deshidrataron en 200 μL de acetonitrilo por 10 min. Este procedimiento se repitió hasta que los trozos del gel se tornaron de color blanco y aspecto opaco. Posteriormente, el acetonitrilo fue retirado secando al vacío en una centrífuga SpeedVac. Tras la deshidratación de los trozos de gel, las proteínas se redujeron con 10 mM DTT en 100 mM NH_4HCO_3 durante 1 h a 56 °C. Una vez reducidas, las proteínas se alquilaron con Iodoacetamida 55 mM en 100 mM NH_4HCO_3 por 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de un lavado con 100 mM NH_4HCO_3 por 10 min, continuaron dos etapas de deshidratación con acetonitrilo (200 μL), una etapa de rehidratación en 100 mL de 100 mM NH_4HCO_3 por 10 min y nuevamente dos etapas de deshidratación con acetonitrilo (200 μL), evaporando los residuos al fin de este procedimiento en SpeedVac por 10 a 20 min. Posteriormente, se adicionó de 30 a 50 μL de Tripsina (20 ng/ μL), hasta cubrir el gel y se incubó en baño de hielo por 5 a 10 min, pasados los cuales se eliminaron los restos de tripsina no absorbida y los trozos de gel se recubrieron con 5-20 μL de 50 mM NH_4HCO_3 para llevar a cabo la digestión trípica a 37°C por un periodo aproximado de 16 h.

5.23 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Para la extracción de los péptidos resultantes, se realizaron tres lavados, en cada uno se adicionó 30 μL de 100 mM NH_4HCO_3 , incubó por 10 min, centrifugó y todos los sobrenadantes se colectaron en un vial de 0.5 mL. Esta muestra se evaporó en SpeedVac, para después resuspenderla en 100 μL de 0.1% (v/v) ácido fórmico en agua y el volumen resultante se filtró en tubos Centricon[®] con un corte molecular de 30 KDa. El volumen filtrado (péptidos menores a 30 KDa) fue leído con un espectrómetro de masas (Q-TOF-2, Micromass, Milford, MA, EUA) y los datos se analizaron con ayuda del programa Mascot (Perkins y col. 2009).

Capítulo 6

Resultados y Discusiones

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El presente trabajo de investigación se desarrolló en cuatro etapas experimentales. En la primera parte, se establecieron las condiciones de cultivo en medio sólido para la producción de lipasas, tomando como cepa de referencia el hongo termotolerante *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a). A continuación, se determinó el método de secado de la materia fermentada con la finalidad de obtener sólidos con actividad lipasa (biocatalizador), que fueran biológicamente estables por tiempos prolongados de almacenamiento. Posteriormente, se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento y la producción de lipasas por seis cepas de hongos termotolerantes y una cepa termófila durante la producción de los siete biocatalizadores que fueron empleados para subsecuentes análisis de estabilidad que conforman la siguiente etapa experimental.

En la segunda parte, se consideraron propiedades de los solventes orgánicos, tales como polaridad y grupos funcionales, para probar su efecto sobre la estabilidad de los biocatalizadores producidos y de la lipasa comercial Lipozyme® RM IM. Como resultado de esta fase, fueron seleccionados por su estabilidad, los biocatalizadores correspondientes a las cepas 19 y 43a, en los cuales se probó el efecto de la polaridad del solvente orgánico y la temperatura de incubación sobre la estabilidad enzimática en reacciones de hidrólisis y síntesis del enlace éster. Posteriormente, además de evaluar la actividad y estabilidad de las lipasas inmovilizadas de manera natural en los sólidos fermentados (biocatalizadores).

En la tercera parte, se planteó el objetivo de exponer las enzimas a diferentes protocolos de inmovilización, con el propósito de mejorar la actividad y estabilidad de los catalizadores obtenidos y modificar la enantioselectividad de las lipasas en la resolución de las mezclas racémicas de biomoléculas de importancia para la industria farmacéutica.

Finalmente, en la cuarta parte experimental, se realizaron análisis de espectrometría de masas con la finalidad de identificar las proteínas a través de la interpretación de los espectros

de fragmentación de péptidos generados a partir de la proteólisis de lipasas presentes en bandas de geles de poliacrilamida y reveladas por una técnica de zimografía. Estos datos permitieron obtener información estructural de la lipasa producida por *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (Cepa 43a) con un nivel de confiabilidad > 95. Sin embargo, los resultados de las bandas de zimogramas correspondientes a las lipasas de las cepas 13a y 19, no dieron niveles de confiabilidad aceptables (Score < 45), por lo cual no fue posible su identificación.

PARTE I

Producción de lipasas en fermentación en medio sólido

Durante la primera etapa experimental se establecieron las condiciones de producción de lipasas empleando como referencia, la cepa fúngica termotolerante *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a), de la cual se tienen datos reportados sobre su crecimiento en cultivo sólido para la producción de lipasas empleando como soporte bagazo de caña (Rodríguez y col., 2006). En este trabajo se optó por utilizar un soporte inerte para llevar a cabo los estudios de fermentación en medio sólido, así como para la producción de sólidos fermentados deshidratados que permitieran su incorporación directa en procesos biocatalíticos.

En principio, se empleó espuma de poliuretano de baja densidad como soporte inerte para evaluar el efecto del contenido de humedad inicial del medio de cultivo y del tamaño de partícula sobre la producción de lipasas. También se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento para establecer el tiempo de producción de las enzimas. Sin embargo, a causa del complicado manejo de la espuma de poliuretano como biocatalizador sólido debido a la estática del material, se consideró más adelante evaluar la agrolita expandida como otra opción de soporte inerte.

6.1 Efecto del contenido de humedad inicial sobre el crecimiento de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* en fermentación en medio sólido

De manera general, se ha establecido que el contenido de humedad del material de fermentación oscila entre 20-70% para el cultivo de hongos en medio sólido (Pandey y col.,

2001). El valor apropiado para cada sistema, depende desde el punto de vista biológico de la respuesta fisiológica o conjunto de mecanismos homeostáticos de cada microorganismo, a las modificaciones en la disponibilidad de agua del medio de cultivo para su crecimiento (Blomberg y Adler, 1992). Además, desde el punto de vista fisicoquímico, esta variable también determina algunos fenómenos del proceso como la difusión de sustratos, aglomeración inter-partícula de la matriz sólida y transferencia de gas (Krishna, 2005). Por lo tanto, es importante considerar el contenido de humedad apropiado para el desarrollo del microorganismo y con ello favorecer la producción de la enzima o metabolito de interés durante el cultivo.

Para probar el efecto del contenido de humedad inicial en el medio de cultivo sobre el crecimiento del microorganismo y producción de lipasas se evaluaron dos niveles, 55 y 65%. Los parámetros cinéticos de crecimiento (μ y fase *lag*) se estimaron de acuerdo a los criterios propuestos por Saucedo-Castañeda y col. (1994), a través del monitoreo de gases en cultivos aerobios, como se detalla en la sección 5.7.2.1. Mientras que, la producción de lipasas fue medida a través de la hidrólisis de aceite de oliva como se describe en la sección 5.10.1.2.

La Figura 6.1 presenta los valores estimados de la tasa específica de crecimiento (μ) y fase *lag* durante el crecimiento de *Rhizopus homothallicus* en espuma de poliuretano (*puf*), así como la actividad lipasa obtenida a las 28 h de fermentación. Con respecto a los parámetros cinéticos de crecimiento, no se observó efecto del contenido de humedad inicial (55 y 65%) sobre el valor de μ ($\alpha < 0.05$); por el contrario, si existe diferencia significativa entre los valores de la fase *lag* ($\alpha < 0.05$), observándose que este periodo disminuye al incrementar el contenido de humedad en el cultivo sólido. En el caso de la actividad lipasa, no se obtuvo una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre ambos sistemas (Anexo G). Con base en lo anterior, este experimento permitió observar que al incrementar el porcentaje de humedad inicial de 55 a 65%, no aumenta la producción de lipasas ni la tasa específica de crecimiento (μ), sin embargo, el periodo de la fase *lag* disminuyó 2.2 veces.

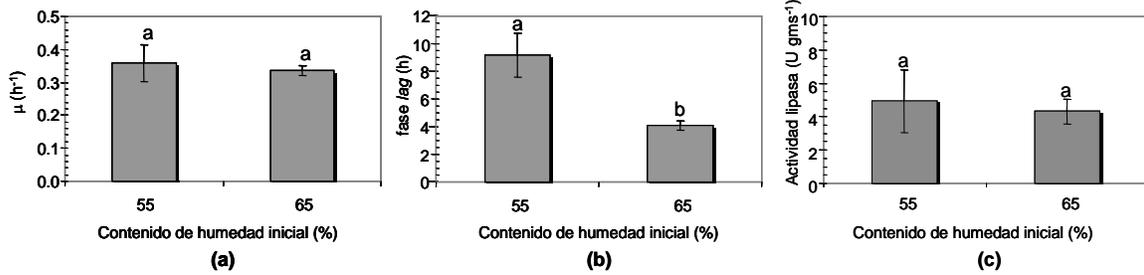


Figura 6.1 Efecto del contenido de humedad inicial sobre (a) la tasa específica de crecimiento (μ), (b) fase lag y (c) actividad lipasa, obtenidos en la fermentación en medio sólido de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis*. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre tratamientos.

En la Figura 6.2 se presentan los comportamientos de: contenido de humedad, actividad de agua (a_w) y evolución en la producción de CO_2 , durante los procesos de fermentación con porcentajes de humedad inicial de 55 y 65%, respectivamente. Aquí, se observa que tanto los contenidos de humedad como los valores de actividad de agua (a_w) se mantuvieron constantes durante todo el periodo de las fermentaciones. En contraste, no se observa una similitud entre los perfiles de producción de CO_2 . Sin embargo, no se obtuvo una diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) al comparar las tasas específicas de crecimiento (μ) (Figura 6.1) de los cultivos una vez que fueron estimadas a través de los perfiles de $\ln CO_2$.

El trabajo reportado por Block en 1953 indica que, es posible que la tasa específica de crecimiento sea independiente del contenido de humedad del cultivo, siempre y cuando exista un equilibrio entre la humedad relativa del aire y la humedad de los sólidos de fermentación, lo que evitará fluctuaciones importantes en la disponibilidad de agua libre (a_w) del proceso metabólico, lo cual fue observado en estos procesos de fermentación.

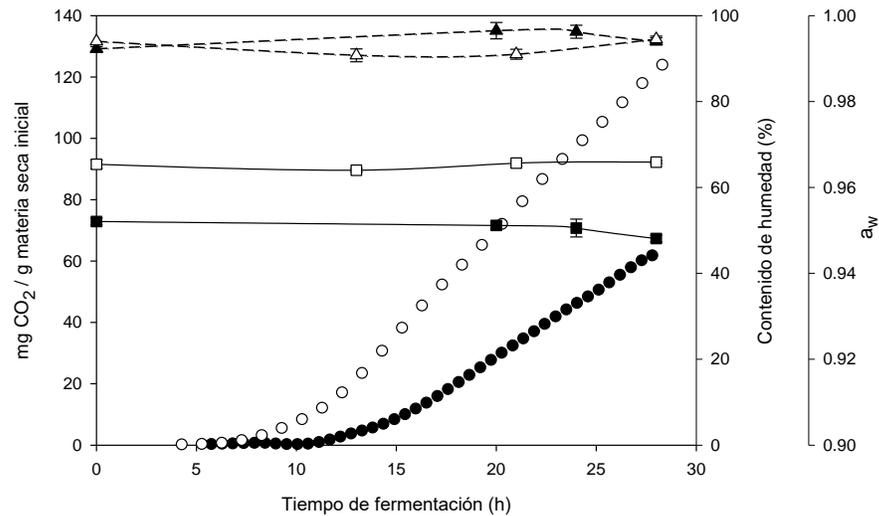


Figura 6.2 Efecto del contenido de humedad inicial sobre la producción de CO₂ (círculos), contenido de humedad (cuadros) y valor de a_w (triángulos), durante el cultivo en estado sólido de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* sobre espuma de poliuretano. Símbolos llenos, 55% y símbolos vacíos, 65% de humedad.

Por otra parte, durante la fase *lag* ocurre una serie de procesos fisiológicos en la espora –síntesis de ARN, síntesis de proteína, síntesis de ADN, consumo de O₂ e incremento en el volumen – que conducen a su germinación (Van Etten y col., 1974). Debido a que el proceso fisiológico de germinación de esporas es diferente al desarrollo del micelio (Block, 1953), un factor como el contenido de humedad inicial del medio de cultivo puede afectar el proceso de germinación sin modificar de manera significativa la siguiente etapa de crecimiento. Ekundayo y Carlile (1964) reportan que, en la primera etapa de germinación, tiene lugar un cambio morfológico de la espora, que es la hinchazón de la misma, de la cual se tienen evidencias que se trata de un transporte activo de agua, más que un fenómeno osmótico. En el trabajo anteriormente mencionado, también se observó que el contenido de humedad puede afectar la tasa de consumo de la fuente de carbono para la producción de energía que promueve el transporte activo de iones a través de la superficie de la espora modificando con ello la permeabilidad de la misma, lo que favorece el transporte de agua y con ello los subsecuentes procesos que darán lugar a la formación del tubo germinal y elongación del mismo. Estos hechos podrían explicar que a un mayor contenido de humedad inicial en el

medio de cultivo (65%), se incrementa la velocidad en la germinación de esporas de *Rhizopus homothallicus* (Figura 6.1).

Por otra parte, se ha reportado que el contenido de humedad inicial del medio de fermentación, influye tanto en el crecimiento microbiano como en los procesos de biosíntesis de enzimas (Imandi y col., 2010). Sin embargo, los valores de actividad lipasa obtenidos a 55 y 65% de contenido de humedad inicial, no fueron significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$) al cabo de 28 h de fermentación. Lo anterior, sugiere que las diferencias entre sistemas con diferente contenido de humedad inicial, y que están relacionadas principalmente con la porosidad del sistema, difusión y transferencia de oxígeno, así como en la difusión y solubilidad de nutrientes (Amin y col., 2011), no tuvieron efecto sobre la producción de lipasas en estos sistemas de cultivo.

6.2 Efecto del tamaño de partícula y tipo de soporte inerte sobre el crecimiento de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* en fermentación en medio sólido y sobre la producción de lipasas

6.2.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula en el cultivo sólido es un factor importante a considerar porque determina el espacio vacío (inter-partícula) en donde se llevan a cabo procesos de transferencia de calor y de masa (productos y nutrientes) que afectan el crecimiento microbiano (Krishna, 2005). En este trabajo se tomaron como referencia las condiciones de fermentación reportadas por Rodríguez y col., 2006, en la cual, emplearon bagazo de caña como soporte sólido con un tamaño de partícula de 0.84-1.68 mm (material retenido en tamices no. 10 y 12), para la producción de lipasas por *Rhizopus homothallicus* a 40 °C. Estos estudios se llevaron a cabo a 45 °C, por lo que se decidió evaluar un mayor tamaño de partícula en la espuma de poliuretano (1.68-2.88 mm) con el objetivo de evitar problemas de transferencia de calor y masa que pudieran disminuir el crecimiento del microorganismo.

La Figura 6.3 presenta los resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de lipasas en sistemas con diferente tamaño de partícula. No se observó diferencia

significativa ($\alpha < 0.05$) entre los valores obtenidos de μ , fase *lag* y perfiles de producción de CO_2 de ambos tratamientos. Sin embargo, si se encontró diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en la actividad lipasa producida entre tratamientos, siendo mayor al emplear el menor tamaño de partícula (0.84-2 mm) en un periodo de 20-24 h de fermentación (Anexo G). Por lo anterior, se concluye que los tamaños de partícula evaluados no tienen efecto sobre los parámetros de crecimiento, pero sí sobre la actividad lipasa obtenida en el cultivo de *Rhizopus homothallicus* empleando espuma de poliuretano como soporte inerte y un contenido de humedad inicial de 55%. Este comportamiento se puede atribuir a diferencias en la tasa de transferencia de oxígeno a través del medio de cultivo, lo cual fue observado por Oostra y col. (2000) y cuyo parámetro es alterado por la porosidad en el medio y la distribución de los filamentos fúngicos.

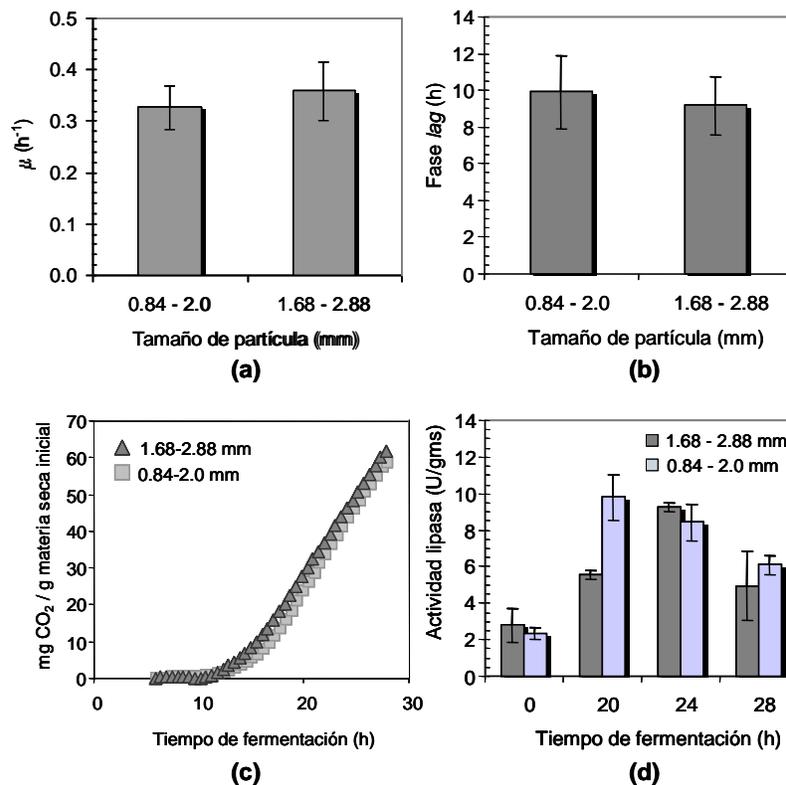


Figura 6.3 Efecto del tamaño de partícula sobre (a) la tasa específica de crecimiento (μ), (b) fase *lag*, (c) producción de CO_2 y (d) actividad lipasa durante la fermentación en medio sólido de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis*. La actividad lipasa de los extractos de fermentación (sección 5.7.2) se determinó de acuerdo a la sección 5.10.1.2.

6.2.1.1 Cinética de producción de lipasas en fermentación en medio sólido

La Figura 6.4 presenta los resultados de la cinética de producción de lipasas empleando un tamaño de partícula de 0.84-2.0 mm de la espuma de poliuretano y 55% de contenido de humedad inicial en los sólidos de fermentación. En este gráfico se observa que los mayores títulos de actividad lipasa se obtienen en un tiempo de fermentación de 20-24 h ($\alpha < 0.05$) (Anexo G), periodo en el cual se observa la mayor velocidad de producción de CO₂ en el cultivo; y posteriormente, decrece la actividad enzimática, lo mismo que la actividad metabólica del microorganismo. Por tanto, se concluye que la mayor actividad lipasa se produce durante la fase de crecimiento rápido del cultivo. Este mismo comportamiento fue observado por Rodríguez y col. (2006) durante la producción de lipasas en cultivo sólido de *Rhizopus homothallicus*, es decir, obtuvieron la mayor actividad enzimática al tiempo en que se observó la mayor producción de CO₂ y consumo de O₂, concluyendo que la producción de lipasas puede estimarse indirectamente, a través de la medición de los gases provenientes del metabolismo del cultivo.

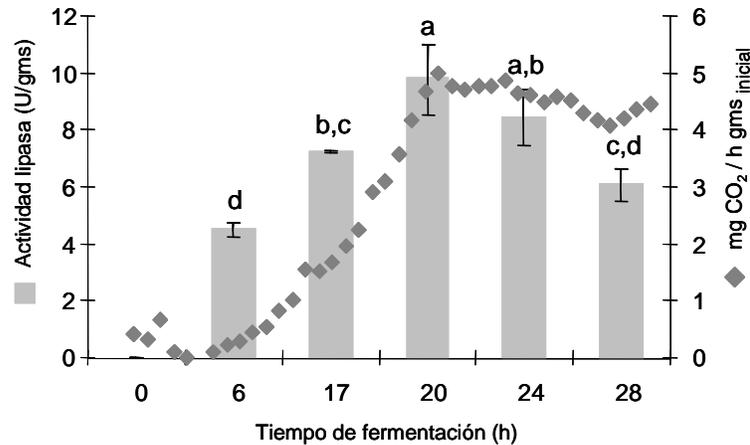


Figura 6.4 Cinética de producción de lipasas y tasa de producción de CO₂ durante la fermentación en medio sólido de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis*. La actividad lipasa de los extractos enzimáticos (sección 5.7.2) se determinó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.10.1.2. a,b,c,d Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) de actividad lipasa entre tiempos de fermentación.

En los experimentos analizados anteriormente se utilizó espuma de poliuretano de baja densidad (puf) como soporte inerte en los procesos de fermentación y la actividad lipasa se determinó empleando los extractos enzimáticos. En esta etapa, también se observó que éste material presentaba propiedades electrostáticas que dificultan su manejo y aplicación directa en sistemas biocatalíticos, lo cual es uno de los objetivos principales de este trabajo de investigación. Por tanto, en la siguiente experimentación se propuso evaluar otro tipo de material (agrolita expandida) que soslayara este problema.

6.2.2 Tipo de soporte inerte

La espuma de poliuretano de baja densidad (puf) y la agrolita expandida fueron evaluados como soportes inertes en la fermentación en medio sólido para la producción de lipasas por hongos termotolerantes. En la Tabla 6.1 se muestran los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento y la producción de lipasa sobre ambos soportes. No hay diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) para la tasa de crecimiento específico (μ) y fase *lag* en los soportes evaluados. Por otra parte, los mayores valores de actividad lipasa (Tabla 6.1) y tasa de producción de CO₂ en ambos soportes fueron observados a las 20 h del cultivo (Figura 6.5) (Anexo G), empleándose en ambos casos 55% de contenido de humedad inicial (máxima capacidad de retención de agua en agrolita expandida) y un tamaño de partícula de 0.84-2.0 mm. Aquí, se observó que la producción de lipasas fue mayor (40%) en agrolita que en puf. Y este hecho podría atribuirse a diferencias entre ambas matrices de fermentación como la tasa de transferencia de O₂, porosidad y geometría de los materiales, así como a la distribución de los filamentos fúngicos dentro de la matriz del soporte. Además, se ha reportado que la producción de lipasas por FMS es más dependiente de la tasa de transferencia de oxígeno que del crecimiento del cultivo (Elibol y Ozer, 2000; Oostra y col., 2001). Finalmente y con base en los resultados obtenidos, la agrolita se seleccionó como soporte inerte para la producción de lipasas en fermentación en medio sólido.

Tabla 6.1 Parámetros de crecimiento y actividad lipasa durante la fermentación en medio sólido de *Rhizopus homothallicus* (cepa 13a) con dos diferentes soportes inertes

Soporte inerte	$\mu_{CO_2}^b$ (h ⁻¹)	Fase lag ^b (h)	Actividad lipasa (U/gms) ^d		
			pNFP		
			20 h ^c	24 h ^b	28 h ^b
PUF ^a	0.32 ± 0.04	9.9 ± 2.0	4.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1
Agrolita	0.42 ± 0.06	10.8 ± 1.1	6.4 ± 0.1	2.2 ± 1.3	1.9 ± 0.8

^a PUF, Espuma de poliuretano.

^b No se encontraron diferencias significativas entre soportes inertes (ANOVA, $\alpha < 0.05$).

^c Existe diferencia significativa entre soportes inertes (ANOVA, $\alpha < 0.05$).

^d La actividad lipasa se determinó de acuerdo a la sección 5.10.1.1.

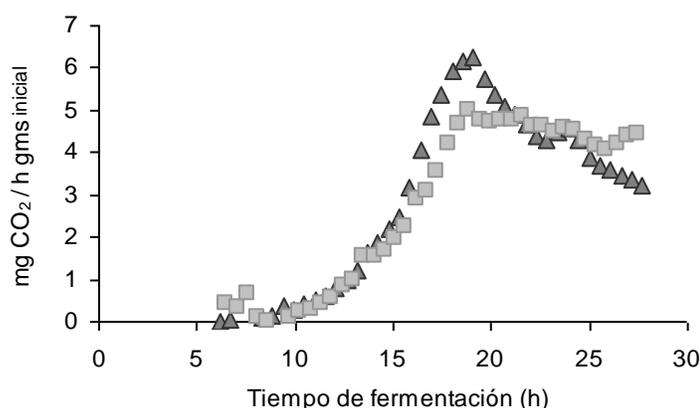


Figura 6.5 Tasa de producción de CO₂ durante la fermentación en medio sólido de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* empleando como soportes inertes (■) puf y (▲) agrolita.

6.3 Efecto del tipo de secado de los sólidos fermentados sobre la actividad lipasa

El secado es el último paso en la producción de los biocatalizadores y tiene el propósito de estabilizar el producto y preservar su actividad al disminuir el contenido de humedad por medio de una sublimación (liofilización) o una evaporación (secado con aire). En este trabajo, se evaluaron estos dos tipos de secado para los sólidos fermentados, con el propósito de comparar los efectos colaterales que conllevan a una pérdida de la actividad enzimática y el tiempo de operación (Tejeda y col, 1995). En la Tabla 6.2, se muestran los resultados comparativos de la actividad lipasa de los sólidos fermentados correspondientes al

cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (cepa 19), que fueron secados por ambos tratamientos. Durante el secado por evaporación se pierde el 16% de la actividad, lo cual concuerda con los resultados de Martínez-Ruíz y col. (2008) quienes reportan una pérdida del 17% al secar con una corriente de aire a un flujo de 500 mL/min, a 45° durante 24 h. En contraste, la pérdida de actividad fue considerablemente mayor durante el secado por liofilización (40%), posiblemente a una desnaturalización de la enzima por frío (López y col., 2008).

Tabla 6.2 Comparación de dos tipos de secado de los sólidos fermentados

Tratamiento	Tiempo de secado (h)	Actividad lipasa ^a (U/gms)	Actividad residual (%)
Testigo	-	74.01	100
Liofilización (Sublimación)	8	44.27	59.8
Aire (Evaporación)	3	61.46	83.8

^a La actividad lipasa corresponde a las 20 h de cultivo y se determinó de acuerdo a la sección 5.10.1.2

Por lo anterior, se seleccionó el tipo de secado por evaporación, que consistió en someter los sólidos húmedos a una corriente continua de aire. Posteriormente, se planteó determinar el tiempo de secado del material biológico, tomando como referencia muestras de fermentación de la cepa 19 (*Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*). Para tal propósito, se inyectó aire a un flujo de 10 L/min y 33°C en la sección inferior de los reactores en columna que contenían la materia fermentada, correspondiente a los tiempos 0, 16, 20, 24 y 40 h de cultivo. Consecutivamente, se determinó el contenido de humedad del aire a la salida de las columnas (sección superior), cuya variable se utilizó para monitorear de manera indirecta, el progreso en la pérdida de humedad de los sólidos fermentados por un periodo de 5 h.

En la Figura 6.6 se presenta el comportamiento del contenido de humedad del aire de salida y se observa que durante las primeras 1.5 h de proceso se tiene una disminución lenta del contenido de humedad. Posteriormente, este parámetro disminuye hasta alcanzar un valor aproximado al 10% en un tiempo de 3 h. También se observó en este periodo, que a mayor contenido de micelio en la materia fermentada, disminuye la velocidad de secado. Tejeda y col. (1995) explican que durante esta etapa del proceso se pierde humedad a mayor velocidad,

debido a que se generan mayores gradientes de presión de vapor de agua del sólido con respecto a la presión de vapor del aire. Finalmente, ambas presiones de vapor se igualan, por lo que el sistema se encuentra en equilibrio y el contenido de humedad en el aire de salida permanece constante.

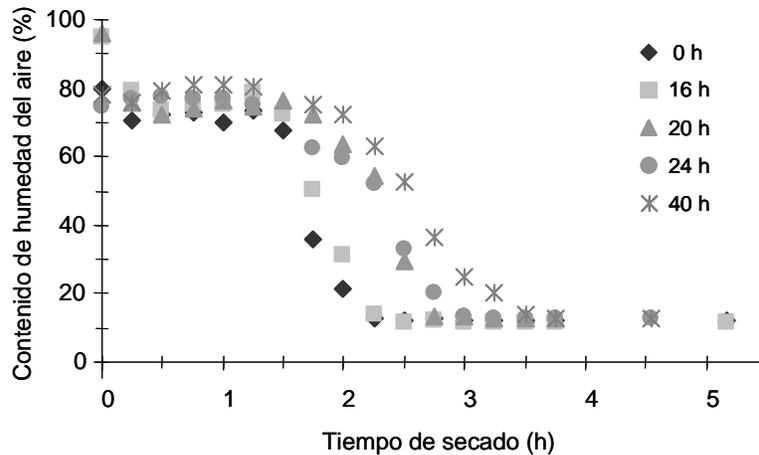


Figura 6.6 Cinética de contenido de humedad del aire a la salida de la columna durante el secado de material sólido fermentado con diferente diferente tiempo de incubación con *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (cepa 19).

Finalmente, se concluye que el secado con aire permite obtener sólidos fermentados con un contenido de humedad final menor a 1%, en un corto tiempo de operación (3 h), el cual es 2.6 veces menor con respecto al proceso de liofilización, además de significar una técnica más sencilla y considerablemente más económica.

6.4 Producción de lipasas inmovilizadas en los sólidos fermentados (Biocatalizadores)

Una vez establecido el tipo de soporte inerte (agrolita), el tamaño de partícula (0.84-2.0 mm) y el contenido de humedad inicial (55%) se llevó a cabo la producción de lipasas en fermentación en medio sólido por seis cepas de hongos termotolerantes (*Rhizopus* sp.) y una cepa termófila (*Rhizomucor* sp.) a 45 °C por 20 h (Sección 5.7.2). Es importante mencionar que todas las cepas presentaron el mismo perfil de velocidad de producción de CO₂, con un máximo a las 20 h de cultivo, tiempo en el cual, se obtienen los mayores títulos de actividad

lipasa. Posterior a este periodo, la materia húmeda fermentada contenida en las columnas de vidrio se deshidrató por 3 h con una corriente de aire a una temperatura de entrada de 33 °C y flujo de 10 L/min (Sección 5.8), obteniéndose al final de este proceso los sólidos fermentados deshidratados (biocatalizadores).

En la Tabla 6.3 se presentan los valores de tasa específica de crecimiento (μ), fase *lag* y actividad lipasa, obtenidos para cada cepa fúngica. Entre las diferentes cepas probadas, se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) para los valores de μ y actividad lipasa, mientras que para los valores de fase *lag* no se obtuvieron diferencias significativas. Los valores de la tasa específica de crecimiento, oscilaron entre 0.4 y 0.5 h⁻¹. Con respecto a la actividad lipasa, los mayores títulos obtenidos corresponden a los biocatalizadores de las cepas 19 y 43a, usando como sustratos *p*NFP (15.5 y 11.1 U/gms, respectivamente) y aceite de oliva (74.0 y 72.4 U/gms, respectivamente). Estos valores fueron similares a los obtenidos con la enzima comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme[®] RM IM) (118.1 U/gms, sobre aceite de oliva como sustrato).

La Tabla 6.3 también presenta la relación de valores de actividad enzimática entre ambos sustratos (R); para todas las lipasas evaluadas la actividad enzimática fue mayor (R > 1) al usar triglicéridos a la obtenida con el *p*NFP. Lo anterior, hace evidente la preferencia hacia los sustratos naturales (triglicéridos) con respecto a los sustratos artificiales. El primer tipo posee las características interfaciales apropiadas para la interacción enzima-sustrato (Beisson y col., 2000), mientras que el segundo tipo de moléculas no necesariamente se diseñaron para incrementar la afinidad por el sustrato sino para mejorar el desempeño de los métodos analíticos, principalmente en lo que se refiere a sensibilidad, rapidez y posibilidad de automatizar el sistema (Hasan y col., 2009; Schmid y Verger, 1998). Además, los diferentes valores de R entre cepas de *Rhizopus* sugieren la presencia de lipasas diferentes, lo cual coincide con trabajos previos que reportan disimilitudes entre secuencias N-terminal de diversas lipasas producidas por *Rh. homothallicus* (13a), *Rh. niveus*, *Rh. oryzae* y *Rh. delemar* (Hiol y col., 2000; Mateos y col., 2006).

Tabla 6.3 Parámetros de crecimiento y actividad lipasa de siete cepas fúngicas durante los cultivos en estado sólido empleando agrolita como soporte inerte

Cepa	μ (h ⁻¹)	Fase lag (h)	Actividad lipasa					
			(U/gms) ^{a, b}			R ^d		
			pNFP	Aceite de oliva				
9a	0.53 ± 0.020	A	11.0 ± 0.9	2.7 ± 0.6	D	36.7 ± 4.0	C	13.5
13a	0.38 ± 0.001	C	11.3 ± 1.4	8.4 ± 0.5	C	30.0 ± 1.8	C	3.5
13b	0.50 ± 0.003	B	9.1 ± 1.2	1.9 ± 0.7	D	22.5 ± 0.1	D	10.7
19	0.41 ± 0.006	C	8.5 ± 0.2	15.2 ± 1.6	A	74.0 ± 7.0	B	4.8
23a	0.41 ± 0.004	C	8.8 ± 0.8	n.d ^c		3.2 ± 0.3	E	-
43a	0.40 ± 0.005	C	8.0 ± 0.5	11.1 ± 0.6	B	72.4 ± 5.7	B	6.4
56c	0.36 ± 0.034	D	8.1 ± 1.1	7.1 ± 0.9	C	16.8 ± 0.3	D	2.4
Lipozyme [®] RM IM						118.12 ± 1.0	A	-

ABCDE Letras distintas indican diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan ($\alpha < 0.05$).

^a La actividad lipasa corresponde a la obtenida a las 20 h de cultivo.

^b La actividad lipasa (U) de la materia seca fermentada, se reporta en unidades de actividad por gramo de materia seca (U/gms).

^c n.d: no detectada.

^d R: Relación de actividad sobre aceite de oliva entre actividad sobre pNFP.

Es importante mencionar que, los valores de actividad lipasa sobre aceite de oliva obtenidos en estos cortos procesos fermentativos fueron similares o superiores a los obtenidos en otros procesos de FMS que emplearon cepas fúngicas silvestres o mutantes con producción de lipasa mejorada (Tabla 6.4).

Una ventaja importante de este sistema de FMS es el empleo de un soporte inerte (agrolita expandida) como una matriz simple para inmovilizar la enzima, disminuyendo así la posibilidad de incorporar compuestos no deseables en los procesos biocatalíticos, lo cual podría ocurrir con soportes orgánicos complejos. Este hecho además, puede facilitar los protocolos de purificación de productos. Actualmente, existen pocos reportes sobre la producción de enzimas en FMS con soportes inertes. Específicamente para la producción de

lipasas se han empleado materiales como resinas poliméricas -Amberlita IRA-900- (Christen y col., 1995) y agrolita expandida (Martínez-Ruíz y col., 2008). En este último trabajo, el material fermentado (biocatalizador) fue usado directamente para la síntesis de oleato de etilo, obteniendo altas tasas de esterificación y conversión de sustrato; además, este biocatalizador conservó más del 80% de su actividad catalítica después de siete meses de almacenamiento a 4 °C. Por tanto, el potencial de la producción de biocatalizadores vía fermentación en medio sólido es elevado, ya que representan ventajas tecnológicas y económicas para su empleo en diversos procesos catalíticos tanto en sistemas acuosos (reacciones de hidrólisis) como no acuosos (reacciones de síntesis y resolución de mezclas racémicas) (Fernandez y col., 2006; Nagy y col., 2006; Ghanem, 2007). Sin embargo, previo a su aplicación es importante considerar la estabilidad de los catalizadores biológicos, principalmente en medios no acuosos en donde la actividad catalítica generalmente se ve disminuida (Adamczak y Krishna., 2004).

Tabla 6.4 Producción de lipasas por diferentes cepas fúngicas en fermentación en medio sólido

Microorganismo	Tipo	Actividad (U/gms) ^{a, b}	Tiempo (h)	Sustrato sólido	Referencia
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Silvestre	80	12	RAO ^d – Bagazo	Córdova y col, 1998
<i>Penicillium restrictum</i>	Silvestre	30	24	Pasta de babassu	Gombert y col, 1999
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Silvestre	30	36	Pasta de babassu	Gutarra y col, 2007
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Silvestre	26.4	n.r. ^c	Pasta de babassu	Cavalcanti y col, 2005
<i>Rhizopus oligosporus</i> T ^{UV} -31	Mutante	76.6	48	Harina de almendra	Iftikhar y Hussain, 2002
<i>Rhizopus oligosporus</i> ISU ^{UV} -16	Mutante	81.2	48	Harina de almendra	Christen y col, 2005

^a La actividad lipasa se determinó usando aceite de oliva como sustrato.

^b La actividad lipasa (U) se reportó en unidades de actividad por gramo de materia seca (U/gms).

^c n.r.: no reportada.

^d RAO: Residuos de la extracción del aceite de oliva

Con base en los resultados obtenidos, en la segunda parte experimental, se consideraron propiedades de los solventes orgánicos, tales como polaridad y grupos funcionales, además de la temperatura del sistema, para probar su efecto sobre la estabilidad de los biocatalizadores producidos y de la lipasa comercial Lipozyme[®] RM IM.

PARTE II

Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos

Además de la actividad enzimática, la estabilidad de lipasas en solventes orgánicos es un parámetro importante a considerar para seleccionar sus aplicaciones industriales. Por lo tanto, en esta etapa experimental se probó el efecto de diferentes solventes orgánicos y de la temperatura sobre la estabilidad de las lipasas presentes en los biocatalizadores producidos por cada cepa fúngica y para la enzima comercial Lipozyme[®] RM IM.

6.5 Estabilidad y actividad de los biocatalizadores en solventes orgánicos

A partir de la década de los 80's, época en la que comenzaron a surgir las primeras aplicaciones de enzimas en medios orgánicos como sistemas de reacción, también iniciaron trabajos con el objetivo de correlacionar la actividad y estabilidad de los biocatalizadores con propiedades relacionadas a la polaridad de los solventes orgánicos (Zaks y Klibanov, 1985), tales como: constante dieléctrica (ϵ) (Affleck y col., 1992), polarizabilidad, capacidad de disociación de puentes de hidrógeno (α), capacidad de formación de puentes de hidrógeno (β) (Nurok y col., 1999), índice de polaridad (Gupta y col., 1997) y Log P (Laane y col., 1997; Lima y col., 2004a; Lima y col., 2004b), cuyo valor se ha empleado comúnmente como una medida de la polaridad, aunque en realidad, esta propiedad denota hidrofobicidad, la cual está relacionada con la polaridad, pero no son sinónimos (Laane y col., 1997).

El Log P es la propiedad que se ha empleado con mayor frecuencia para demostrar que existe una correlación entre la polaridad del medio no acuoso con la actividad y estabilidad de algunas enzimas (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999; Kanwar y Goswami, 2002; Lima y col., 2004b). Sin embargo, en este trabajo no se encontró una correlación entre el valor de Log P de los solventes evaluados y la estabilidad de las lipasas ensayadas (Figura 6.7), las cuales fueron producidas por seis cepas de hongos termotolerantes (L-9a, L-13a, L-13b, L-19, L-43a y L-56c) y una cepa termófila (L-23a), así como la enzima comercial Lipozyme[®] RM IM. Esta falta de correlación también se observó para las lipasas producidas por *Acinetobacter* sp. SY-01 (Han y col., 2003) y *Acinetobacter* sp. RAG-1 (Snellman y col., 2002).

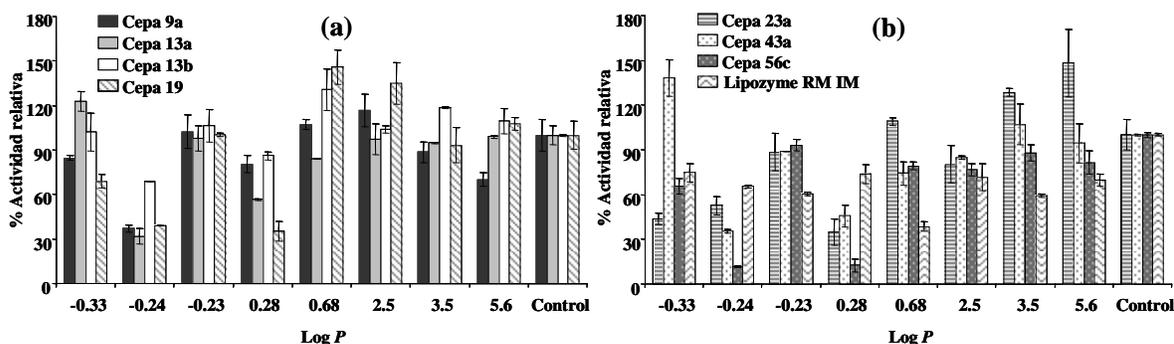


Figura 6.7 Efecto de los solventes orgánicos sobre la estabilidad de lipasas producidas por las cepas (a) 9a, 13a, 13b, 19 y (b) 23a, 43a, 56c y Lipozyme RM IM. Los solventes empleados, con su respectivo valor de $\text{Log } P$ fueron: acetonitrilo, - 0.33; etanol, - 0.24; acetona, - 0.23; *i*-propanol, 0.28; acetato de etilo, 0.68; tolueno, 2.5; *n*-hexano, 3.5; *n*-decano, 5.6. La actividad lipasa se determinó como se describe en la sección 5.10.1.2.

Posteriormente, se consideró emplear en este trabajo el momento dipolar como parámetro de polaridad; cuyo valor depende de las propiedades químicas y estructurales del solvente orgánico, tales como: número y tipo de enlaces químicos, presencia de cargas deslocalizadas, electronegatividad de átomos, tamaño y simetría molecular, y potencial electrostático, las cuales en conjunto determinan la estabilidad de las moléculas adyacentes (Wade, 2004). Por lo tanto, con el objetivo de establecer una correlación entre el tipo de solvente y la estabilidad enzimática, los medios se ordenaron de acuerdo a sus grupos funcionales (Wade, 2004) y valor de momento dipolar, de la siguiente manera: no polares (*n*-decano, *n*-hexano, tolueno), polares próticos (*i*-propanol, etanol) y polares apróticos (acetato de etilo, acetona, acetonitrilo). Para determinar la estabilidad enzimática cada biocatalizador se incubó durante 1 h en los solventes orgánicos a 25 °C y se midió la actividad lipasa empleando aceite de oliva como sustrato (sección 5.10.1.2). El procedimiento anterior nos permitió establecer cuatro diferentes perfiles de actividad relativa que se muestran en la Figura 6.8. Además, se observó que la estabilidad fue afectada por diversos fenómenos que incluyen: inhibición, promovida por solventes de estructura similar al sustrato de la enzima; así como desnaturalización y activación, ocasionadas por solventes que provocan modificaciones estructurales o del medio que rodea a la enzima. Los resultados estadísticos para cada uno de los biocatalizadores se reportan en el Anexo G.

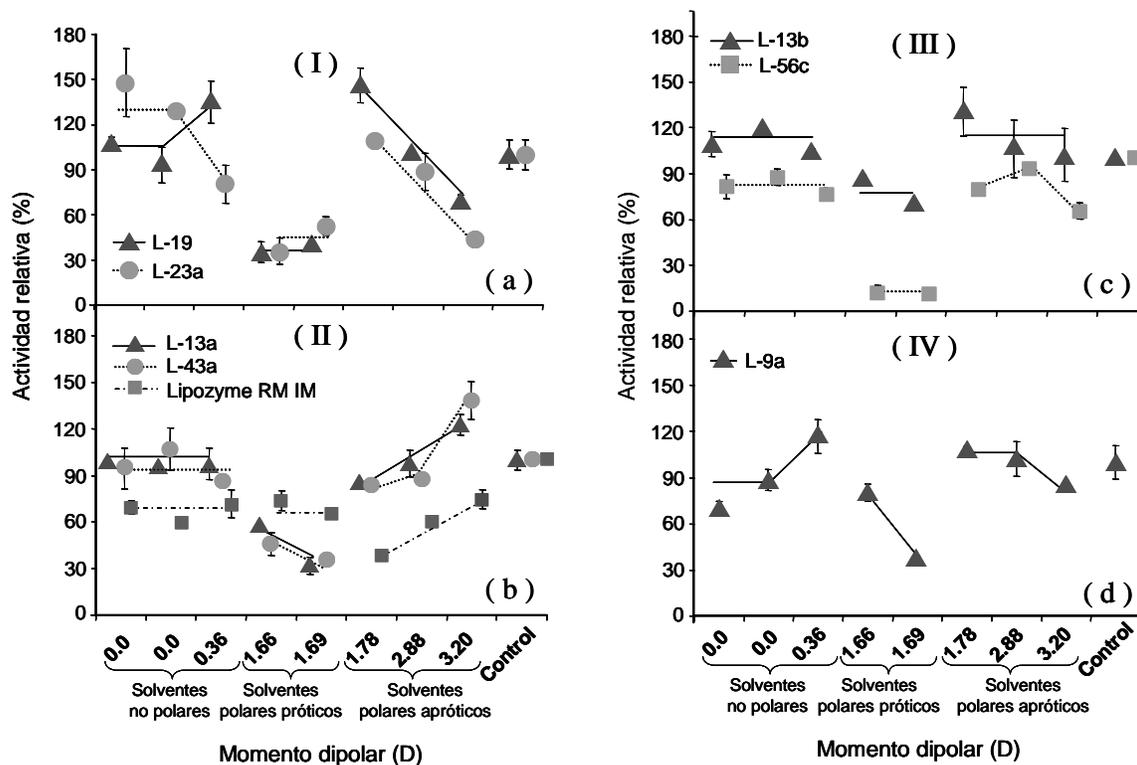


Figura 6.8 Perfiles de estabilidad de lipasas después de su exposición (1 h) a diferentes solventes orgánicos. Las lipasas empleadas en este estudio fueron producidas por seis cepas de hongos termotolerantes y una termófila. L-19, L-23a (Perfil I) (a); L-13a, L-43a, Lipozyme® RM IM (Perfil II) (b); L-13b, L-56c (Perfil III) (c); L-9a (Perfil IV) (d). Los solventes y su momento dipolar fueron: *n*-decano, 0.0; *n*-hexano, 0.0; tolueno, 0.36; *i*-propanol, 1.66; etanol, 1.69; acetato de etilo, 1.78; acetona, 2.88; acetonitrilo, 3.20. La actividad se midió como se describe en la sección 5.10.1.2.

Cabe mencionar que el objetivo de establecer una correlación entre la actividad relativa de las lipasas con los valores de $\log P$ y momento dipolar no fue alcanzado. Estas observaciones concuerdan con Valivety y col. (1991), quienes concluyen que es probable que un solo parámetro de polaridad de los solventes no sea suficiente para predecir la estabilidad y actividad enzimática en medios orgánicos.

Los valores de actividad relativa fluctuaron entre 70 a 148% después de incubar los biocatalizadores en solventes no polares (*n*-decano, *n*-hexano, tolueno), con referencia al biocatalizador sin tratamiento con solventes orgánicos (control) cuyo valor se consideró como 100%. Por tanto, estos biocatalizadores podrían ser empleados en sistemas con medios de reacción constituidos por solventes no polares. Resultados similares han sido reportados para

la lipasa libre e inmovilizada producida por el basidiomiceto *Bjerkandera adusta* R59, cuyos valores de actividad residual fueron de 70 a 120% después de 24 h de incubación en ciclohexano, *n*-hexano y *n*-heptano a temperatura ambiente (Bancerz y Ginalska, 2007); este comportamiento se atribuyó al hecho de que los solventes orgánicos no polares no secuestran la capa de agua que rodea a la superficie de la enzima. En contraste a estos resultados, Sulong y col. (2006) encontraron que la actividad relativa de la lipasa, producida por la bacteria tolerante a solventes orgánicos *Bacillus sphaericus* 205y, disminuyó hasta 40% después de 30 min de incubación en tolueno a 37 °C. Estos resultados muestran que no es posible establecer una regla general sobre el comportamiento de la actividad y estabilidad en solventes no polares.

Por otra parte, se ha establecido que por lo general, las enzimas conservan su actividad y estabilidad en solventes no polares dentro de diversos procesos biocatalíticos (Zaks y Klivanov, 1985; Laane y col, 1987). Sin embargo, la disponibilidad de lipasas que sean activas y estables en solventes polares, podría abrir nuevas oportunidades en el área de Biocatálisis con sustratos polares. En este trabajo, el tratamiento de las lipasas con solventes polares próticos (*i*-propanol y etanol) tuvo un efecto negativo sobre la actividad relativa de los biocatalizadores, obteniendo valores de hasta 12% para el biocatalizador L-56 en presencia de ambos solventes orgánicos. De manera similar, valores bajos de actividad relativa fueron reportados después de 1 h de exposición en solventes polares próticos para lipasas producidas por diversos microorganismos, tales como: *P. simplicissimum*, 33% en etanol (Sztajer y col., 1992), *P. aurantiogriseum*, menos del 2% en metanol, etanol e *i*-propanol a 29 °C (Lima y col., 2004b) y *Bacillus megaterium*, 45% en etanol a 28 °C (Lima y col., 2004). En contraste a este comportamiento, es importante mencionar que las lipasas de los biocatalizadores L-9a y L-13b conservaron una actividad relativa mayor al 80% en *i*-propanol (Figura 6.8). Estos resultados son comparables a los reportados para las lipasas producidas por *P. simplicissimum*, 79% después de 1 h en propanol (Sztajer y col., 1992), *Bacillus megaterium*, 97% después de 1 h en *i*-propanol a 28 °C (Lima y col., 2004a) y *Bacillus sphaericus* 205y, 96% después de 30 min a 37 °C en etanol (Sulong y col., 2006). Esta elevada actividad relativa, podría atribuirse a una moderada competencia de los alcoholes por los puentes de hidrógeno formados por los

grupos amida (Babu y col., 2001), además de la sustitución de moléculas de agua con grupos hidroxilo de las moléculas de alcohol (Gupta y col., 1997).

Los resultados concernientes al efecto de los solventes polares apróticos (acetato de etilo, acetona, acetonitrilo) muestran que en la mayoría de los biocatalizadores evaluados (L-9a, L-13a, L-13b, L-19, L-23a y L-43a) se obtuvo una elevada actividad relativa (80-146%) después de 1 h de incubación a 25 °C (Figura 6.8). Esta información resulta interesante, ya que la inestabilidad de lipasas en solventes polares apróticos es un fenómeno frecuente y se asocia al secuestro de la capa de agua que cubre la superficie de la enzima (Azevedo y col., 2001), aunado a la penetración del solvente al interior de la proteína, provocando el desplegamiento y la subsecuente desnaturalización de la enzima (Wangikar y col., 1997). Actualmente, existen pocos trabajos que reporten la estabilidad de lipasas en solventes polares apróticos. La lipasa producida por *Pseudomonas* sp. mostró valores de actividad relativa de 100 a 110% después de 15 h de exposición a temperatura ambiente en acetona, tetrahidrofurano y acetato de etilo (Pogorevc y col., 2002). Adicionalmente, Wu y col. (2007) evaluaron la lipasa producida por *M. javanicus* y observaron además de una elevada estabilidad, un incremento en la actividad relativa respecto al control, después de 2 h de incubación a 25 °C en acetonitrilo (85%), acetato de etilo (168%) y acetona (246%).

6.6 Actividad de hidrólisis y síntesis de los biocatalizadores L-19 y L-43a

Los medios acuosos son los sistemas tradicionales de las lipasas para llevar a cabo procesos de hidrólisis de ésteres y los solventes orgánicos se implementaron como una alternativa para innovar y mejorar los procesos de síntesis a nivel industrial (Sellek y Chaudhuri, 1999) y se ha observado que modificando el tipo y las condiciones de estos sistemas no acuosos es posible incrementar en algunos casos, la estabilidad y actividad catalítica (Yang y col., 2004). Por lo anterior, se evaluó la estabilidad de las lipasas en función del valor del momento dipolar (D) de los solventes orgánicos, tanto en reacciones de hidrólisis como de síntesis del enlace éster. Para tal propósito, fueron seleccionados los biocatalizadores L-19 y L-43a por mostrar los mayores valores de actividad en la hidrólisis de aceite de oliva (74.0 ± 7.0 y 72.4 ± 5.7 , respectivamente) y actividad relativa (superior a 70%) en solventes no polares y

polares apróticos. Estos fueron expuestos por una hora en los solventes orgánicos y posteriormente se determinó la actividad lipasa en la hidrólisis de aceite de oliva y la síntesis de oleato de etilo.

La Figura 6.9 presenta los resultados de actividad relativa en reacciones de hidrólisis y síntesis en función del momento dipolar (D). Aquí, se observa una actividad relativa superior al 80% en solventes no polares (*n*-decano, *n*-hexano y tolueno) y mayor al 70% en *i*-propanol. Sin embargo, el etanol redujo la actividad de hidrólisis (L-19 y L-43a) más del 80% y provocó aproximadamente un 50% de reducción en la actividad de síntesis (L-43a). Estos resultados sugieren que las moléculas de etanol podrían causar cambios estructurales en la enzima, tal como fue observado en la fosfatasa ácida de *Penaeus penicillatus* (Chen y col., 1999). Por otra parte, los solventes polares apróticos (tetrahidrofurano, acetona, acetato de etilo y acetonitrilo) no afectaron la estabilidad tanto de la síntesis de oleato de etilo (L-19) como de la hidrólisis de aceite de oliva (L-43a). Estos datos sugieren que la interacción entre los solventes polares apróticos y la enzima no afecta el nivel de hidratación o la conformación, requeridos para la actividad enzimática (Slotema y col., 2003; Yang y col., 2004).

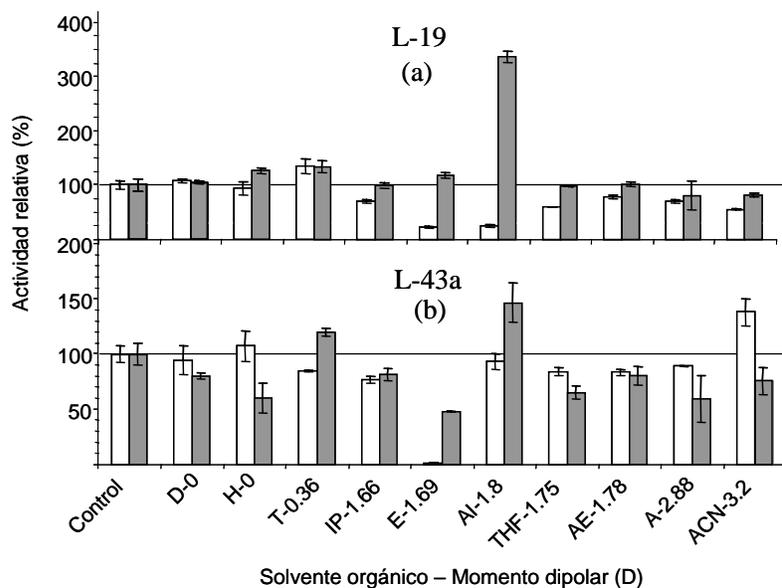


Figura 6.9 Actividad relativa de lipasas después de una hora de exposición a solventes orgánicos, agrupados por su momento dipolar: (a) L-19; (b) L-43a. La actividad lipasa se evaluó de acuerdo a la sección 5.10.1.2 para la (□) hidrólisis de aceite de oliva y sección 5.10.2 para la (■) síntesis de oleato de etilo. Los solventes fueron: *n*-decano, D; *n*-hexano, H; tolueno, T; *i*-propanol, IP; etanol, E; alcohol *i*-amílico, AI; tetrahidrofurano, THF; acetato de etilo, AE; acetona, A; acetonitrilo, ACN.

Por otra parte, después de incubar los biocatalizadores en solventes orgánicos se observó un incremento en la actividad lipasa (hidrólisis y síntesis) con respecto al biocatalizador sin tratamiento (control) en los siguientes casos: la actividad de síntesis del biocatalizador L-19 se incrementó 1.26, 1.18, 1.34 y 3.36 veces en *n*-hexano, etanol, tolueno, y alcohol *i*-amílico, respectivamente; de manera similar, la proporción en la reacción de hidrólisis se incrementó 1.35 veces en tolueno. En el caso del biocatalizador L-43a, la actividad se incrementó 1.20 y 1.46 veces en tolueno y alcohol *i*-amílico, respectivamente (para la reacción de síntesis) y 1.38 veces en acetonitrilo (para la reacción de hidrólisis). Wu y col. (2007) sugieren que este incremento en la actividad enzimática podría explicarse por la transición estructural de la forma inactiva “cerrada” a la forma activa “abierta” de la lipasa, como resultado del tratamiento con solventes orgánicos. Estos autores observaron un incremento en la actividad (superior a 193%) para la lipasa inmovilizada producida por *Mucor javanicus* después del tratamiento por 2 h a 25 °C con solventes polares próticos y apróticos (*i*-propanol, acetato de etilo y acetona). El mismo efecto fue reportado para las lipasas producidas por *Penicillium aurantiogriseum* y *Bacillus megaterium* después de 1 h de incubación en *n*-heptano (solvente no polar) con valores de actividad relativa de 113% y 120%, respectivamente (Lima y col., 2004b; Lima y col., 2004a).

En la actualidad, se han establecido diversos procesos biocatalíticos empleando lipasas en solventes orgánicos no polares como medios de reacción (Hasan y col., 2006). Por tanto, los resultados obtenidos para los biocatalizadores L-19 y L-43a en referencia a su estabilidad e incremento en la actividad relativa en solventes polares (*i*-propanol, etanol, alcohol *i*-amílico, tetrahidrofurano, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo) podrían permitir el desarrollo de reacciones incorporando sustratos polares (amidas, flavonoides, lactonas, carbohidratos, ácidos hidroxicinámicos). Además, los solventes polares representan ventajas tecnológicas comparadas a los solventes no polares tales como, baja toxicidad, menores puntos de ebullición y menores costos. Finalmente, una ventaja adicional de estos biocatalizadores es la aplicación directa de los sólidos fermentados en procesos biocatalíticos, lo cual disminuye los costos del proceso en relación a sistemas en los cuales el biocatalizador debe ser extraído, purificado e inmovilizado.

6.7 Efecto de la temperatura y de los solventes orgánicos sobre la estabilidad de los biocatalizadores

Actualmente, las lipasas se utilizan para la producción industrial de bloques quirales, fármacos, agroquímicos e ingredientes para la industria alimentaria, y el número de aplicaciones en procesos biotecnológicos incrementa constantemente. Sin embargo, la temperatura de reacción en diversas aplicaciones excede con frecuencia los 45°C. Por tanto, estas enzimas deben ser termoestables en solventes orgánicos de diferente polaridad (Talukder y col., 2007).

Para evaluar el efecto de la temperatura y tipo de solvente orgánico sobre la estabilidad de las lipasas, los biocatalizadores L-19 y L-43a se incubaron por 1 h en tolueno (no polar), *i*-propanol (polar prótico) y acetonitrilo (polar aprótico) a 30, 40 y 50 °C, posteriormente se determinó la actividad en la síntesis de oleato de etilo (sección 5.10.2).

La Figura 6.10 presenta los resultados de actividad relativa en función de la temperatura y tipo de solvente. Aquí, se observa que la actividad relativa del biocatalizador L-19 fue superior (en una proporción de 10 a 100%) a la del control en la mayoría de las condiciones evaluadas; solamente se observó una reducción en la actividad (50%) después de incubar en *i*-propanol a 50 °C. Talukder y col., (2007) también observaron un incremento en la actividad de la lipasa producida por *Rhizopus oryzae*, y evidenciaron por dicroísmo circular, cambios en la estructura secundaria y terciaria de la proteína después del tratamiento con *i*-propanol, seguidos de una activación enzimática. En contraste, la actividad lipasa del biocatalizador L-43a solamente se incrementó después de incubar en tolueno a 30 y 40 °C. Además, se observó una pérdida importante de actividad después del tratamiento con *i*-propanol y acetonitrilo de 30 a 50 °C, inclusive se observó una inactivación total a 50 °C.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que las enzimas presentes en el biocatalizador L-19 son termoestables en solventes orgánicos de diferente polaridad, lo cual podría representar oportunidades de inclusión en aplicaciones industriales.

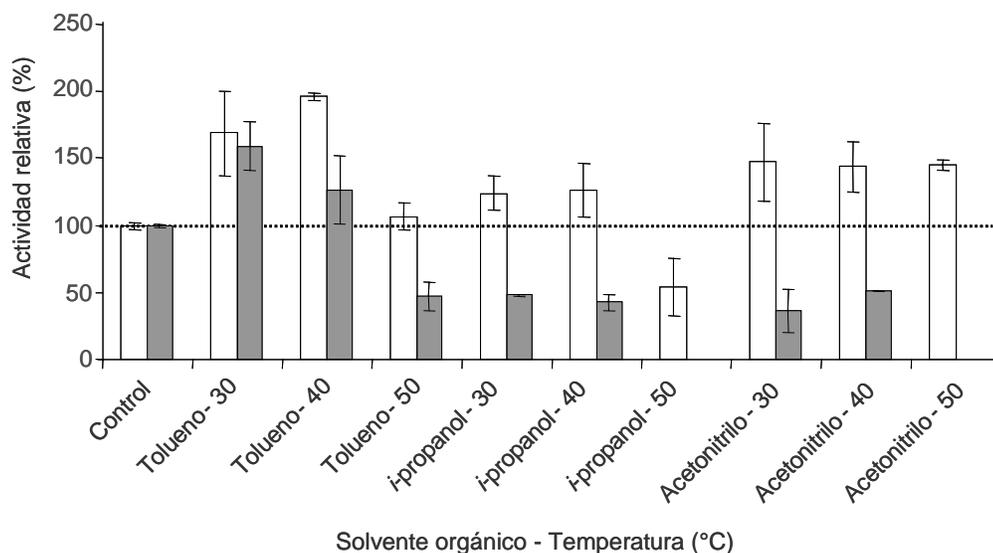


Figura 6.10 Efecto del solvente orgánico (tolueno, *i*-propanol y acetonitrilo) y la temperatura (30, 40 y 50 °C) sobre la actividad relativa de los biocatalizadores (□) L-19 y (■) L-43a. La actividad lipasa se evaluó por la síntesis de oleato de etilo como se describe en la sección 5.10.2.

Por otra parte, al observar los buenos resultados de actividad enzimática y de estabilidad de los biocatalizadores L-13a, L-19 y L-43a, se planteó el objetivo de aplicar distintos procesos de inmovilización para incrementar tales propiedades, además de evaluar su efecto sobre la selectividad y facilidad de recuperación del biocatalizador del medio de reacción.

PARTE III

Inmovilización de lipasas: Estudios de estabilidad y propiedades enantioselectivas

Durante la siguiente etapa experimental, se propuso evaluar dos metodologías de inmovilización para incrementar la estabilidad y actividad de las lipasas producidas, modificar sus propiedades selectivas y facilitar la recuperación del biocatalizador. Para este propósito, el Laboratorio de Ingeniería de Biocatalizadores y Biotransformaciones (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. España) contribuyó con la implementación de los protocolos de inmovilización que permitieron manipular las lipasas en términos de orientación, rigidez y conformación, aunado al diseño de las condiciones experimentales. Los

derivados enzimáticos obtenidos fueron evaluados con resultados satisfactorios en diversos procesos catalíticos, cuya finalidad fue la síntesis de biomoléculas de importancia para la industria farmacéutica, tales como: (S)-Ácido mandélico (AM), precursor de fármacos prescritos para la incontinencia urinaria; (S)- ácido-2-hidroxi-4-fenilbutanoico (S-AHFB), precursor de antihipertensivos; (S)-*n*-metil-fenilglutarato [(S)-MFG] y (S)-*n*-etil-fenilglutarato [(S)-EFG], ambos precursores de moléculas con actividad biológica (antibióticos, agentes citotóxicos, antidepresivos y antihipertensivos).

6.8 Producción y extracción de lipasas a partir de los biocatalizadores producidos por fermentación en medio sólido

Para realizar los estudios de inmovilización, las lipasas se produjeron en fermentación en medio sólido de acuerdo a lo establecido en la sección 5.14. Los biocatalizadores correspondientes a las cepas termotolerantes 13a, 19 y 43a, fueron seleccionados para realizar la siguiente etapa experimental con base en dos criterios: 1) Presentaron los mayores títulos de actividad lipasa y 2) su alta estabilidad en solventes orgánicos con diferente momento dipolar. En la Tabla 6.5 se presentan los valores de actividad lipasa, en cuyos ensayos se empleó aceite de oliva como sustrato (sección 5.10.1.2). Cabe mencionar que, es necesario partir de biocatalizadores que presenten altos valores de actividad, debido a la subsiguiente aplicación de procesos que podrían ocasionar una disminución de la misma, tales como la extracción y la inmovilización.

Tabla 6.5 Actividad lipasa de los biocatalizadores producidos en FMS

No.	Cepa	Actividad lipasa ^{a, b} (U /g Biocatalizador)
13a	<i>Rhizopus homothallicus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	94.2 ± 9.9
19	<i>Rhizopus microsporas</i> var. <i>tuberosus</i>	73.8 ± 5.7
43a	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i>	88.6 ± 4.0

^a La actividad lipasa reportada corresponde a las 20 h de cultivo sólido.

^b La actividad lipasa (U) sobre aceite de oliva de la materia seca fermentada, se reportó en unidades de actividad por gramo de biocatalizador (U/g Biocatalizador).

Posteriormente, con la finalidad de poner a punto la técnica de extracción de lipasas de los sólidos fermentados, se evaluaron concentraciones de 0.01 a 1% (v/v) de un surfactante no iónico (Tritón X-100) en solamente dos (13a y 19) de los tres biocatalizadores, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.14. En la Figura 6.11, se observa que empleando soluciones al 0.5 y 1% de Tritón X-100 se obtienen los mayores porcentajes de actividad recuperada (AR) en el sobrenadante. Rodríguez y col. (2006) reportaron 69% de AR al emplear 0.5% de Tritón X-100 para extraer de los sólidos fermentados las lipasas producidas por la cepa 13a, cuyo valor es similar al obtenido en este trabajo para el biocatalizador de la misma cepa (65.4%) y menor con respecto al biocatalizador de la cepa 19 (88.9%). Por tanto, se decidió emplear 0.5% de Tritón X-100 para extraer las lipasas de los biocatalizadores, evitándose emplear concentraciones mayores, que podrían generar una competencia del surfactante no iónico con la enzima por algunos soportes de inmovilización, tal como se ha observado con octil-agarosa (Fernández-Lorente y col., 2007). Además, se ha reportado que la presencia de Tritón X-100 en un rango de concentración de 0.25-0.5%, promueve la disociación de agregados proteína-proteína que pudieran formarse en soluciones acuosas e interferir en los procesos de inmovilización de monómeros de enzima (Fernández-Lorente y col., 2007; Palomo y col., 2007).

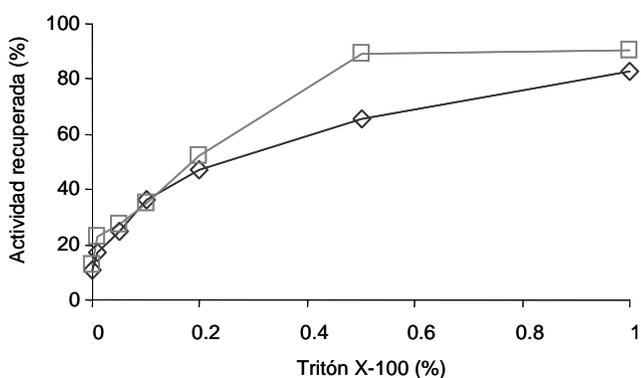


Figura 6.11 Efecto de la concentración de Tritón X-100 sobre la extracción de lipasas de los biocatalizadores producidos por las cepas (◇) 13a y (□) 19. La actividad enzimática del sobrenadante se determinó sobre *p*NPB a pH 7.0 y 25°C como se describe en la sección 5.15.

Mateos y col. (2006) emplearon una resina polimérica (Amberlita XAD-2) para eliminar el detergente (Tritón X-100 al 0.5%) después de la extracción de la lipasa producida por *Rhizopus homothallicus* (cepa 13) en FMS. Lo anterior, a causa del efecto inhibitorio del Tritón X-100 sobre ésteres de *p*-nitrofenol de ácidos grasos de cadena larga (C14-C18), reportado para las lipasas producidas por *Candida cylindracea*, *Aspergillus carneus*, *Penicillium* sp. (Helistöa y Korpela, 1998) y *Rhizopus homothallicus* (Mateos y col., 2006). En el presente trabajo no se observó este efecto de inhibición al evaluar la actividad sobre *p*-NFB y fue posible medir actividad en presencia de Tritón X-100 hasta una concentración de 1%. Esto podría explicarse considerando las diferencias en tamaño e hidrofobicidad de los sustratos, es decir, el *p*NFB al ser de menor tamaño molecular (C-4) e hidrofobicidad, se facilita su acceso hacia el sitio activo, el cual, se encuentra expuesto debido a la concentración del detergente que favorece la conformación abierta (activa) de la lipasa. En el caso del *p*NFP, cuyo tamaño (C-16) e hidrofobicidad es mayor, compete con las moléculas de Tritón X-100 por el acceso al sitio activo de la enzima (Fernández-Lorente y col., 2007).

Los extractos que contienen la actividad extracelular de los biocatalizadores fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Las bandas de proteína se revelaron mediante tinción con plata y las bandas con actividad lipasa, incubando el gel en un amortiguador 0.1 M de fosfato de sodio (pH 6.2) que contenía 0.02% (p/v) de α -naftil acetato (disuelto previamente en acetona) y 0.05% (p/v) de Fast Blue RR (sal). Los resultados presentados en la Figura 6.12 revelan una sola banda con actividad lipolítica en los extractos enzimáticos producidos por las cepas 13a, 19 y 43a, con una masa molecular estimada de 31 kDa. Estos datos coinciden con el trabajo de Mateos y col. (2006), quienes reportan la producción de una lipasa monomérica por *Rhizopus homothallicus* (cepa 13a) con una masa molecular estimada de 29.5 kDa; y es similar a los datos reportados para lipasas producidas por diversas especies del género *Rhizopus*, tales como *Rhizopus niveus*, 30 kDa (Bastida y col., 1998); *Rhizopus japonicus* NR 400, 30 kDa (Suzuki y col., 1986); *Rhizopus chinensis*, 28.4 kDa (Yasuda y col., 2000) y *Rhizopus oryzae*, 32 kDa (Hiol y col., 2000).

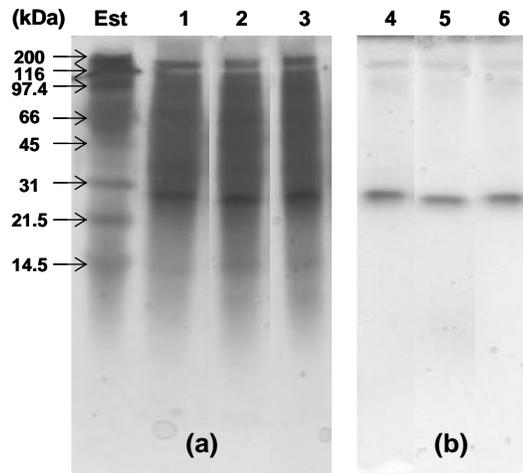


Figura 6.12 (a) Tinción con plata de gel de electroforesis en condiciones nativas. Est, Estándar de pesos moleculares; línea 1, extracto enzimático 13a; línea 2, extracto enzimático 19; línea 3, extracto enzimático 43a. (b) Zimograma de lipasas después de electroforesis en condiciones nativas. Línea 4, lipasa 13a; línea 5, lipasa 19; línea 6, lipasa 43a.

6.9 Inmovilización de lipasas producidas por hongos termotolerantes

El propósito de esta parte experimental fue probar el efecto de dos tipos de inmovilización sobre la estabilidad y actividad de las enzimas. Así, las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a fueron inmovilizadas sobre los soportes Octil-agarosa -adsorción interfacial- y MANAE-glutaraldehído -este soporte promueve la formación de enlaces covalentes a través de sus grupos aldehído ($-CHO$) con los grupos amino (NH_3^+) de las lisinas presentes en la superficie de la proteína- (Sección 5.18), obteniéndose dos derivados enzimáticos con diferente orientación, rigidez y conformación (Figura 6.13).

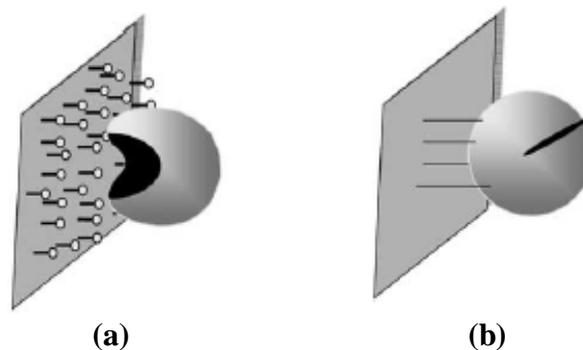


Figura 6.13 Derivados enzimáticos obtenidos mediante dos protocolos de inmovilización. (a) Adsorción interfacial sobre Octil-agarosa y (b) Unión covalente multipuntual en MANAE-glutaraldehído.

La Figura 6.14 presenta el curso de la inmovilización enzimática en ambos soportes y se observa que la adsorción de lipasas sobre Octil-agarosa se efectúa en un periodo corto de incubación (30 min), respecto al requerido para que las enzimas reaccionen con el soporte MANAE-glutaraldehído (2 h). En ambos casos, se considera un tiempo breve para la inmovilización de lipasas (Filho y col., 2008), comparado con métodos que emplean diferentes soportes comerciales como: Hidrogel de alcohol polivinílico (BioChemMac Co., Rusia), 7 h (Pliega y col., 2000); resinas macroporosas de adsorción (MTODIAION), 12 h (Yu y col., 2004); Eupergit C250L (Pharma Polymers, Alemania), 24 h; Celita 545 (Serva, Alemania), 72 h (Gorokhova y col., 2002) y Diatomita (Shanghai Fengcheng Reagent Factory), 18 h (Yang y col., 2009).

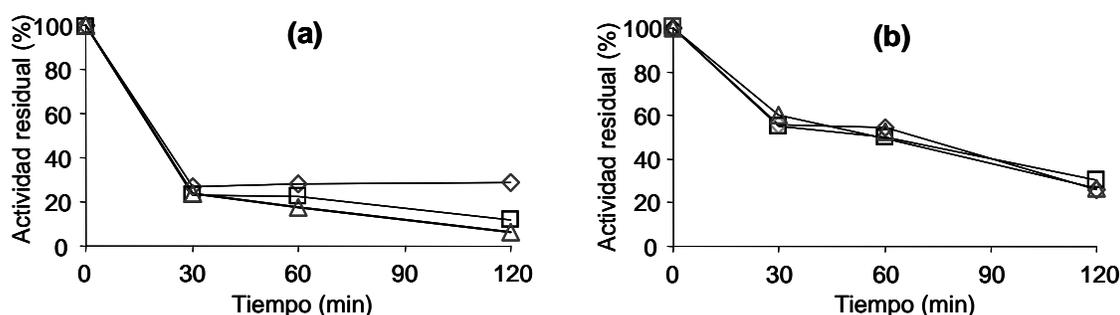


Figura 6.14 Curso de la inmovilización de lipasas producidas por las cepas (◇) 13a, (□) 19 y (△) 43a, sobre (a) Octil-agarosa y (b) MANAE-glutaraldehído. (a) La reacción se llevó a cabo en un amortiguador 25 mM de fosfato de sodio (pH 7.0) a 25°C. (b) La reacción se realizó en un amortiguador 200 mM de fosfato de sodio (pH 7.0) a 25°C, ambas reacciones bajo agitación moderada y constante. La actividad enzimática se determinó sobre *p*NPB a pH 7.0 y 25°C de acuerdo a la sección 5.15. La actividad residual representa la relación porcentual entre la actividad del sobrenadante y la actividad total de la suspensión al inicio del proceso de inmovilización.

Una vez finalizados los procesos de inmovilización y obtenidos los derivados enzimáticos (Octil-agarosa y MANAE-glutaraldehído) de cada uno de las cepas (13a, 19 y 43a), se determinó el rendimiento y la actividad enzimática sobre la hidrólisis de *p*NFB. Estos resultados se presentan en la Tabla 6.6, donde se observa un mayor rendimiento del proceso,

cuando la enzima se inmoviliza a través de enlaces covalentes al soporte MANAE-glutaraldehído que cuando lo hace a través de interacciones hidrofóbicas al soporte Octil-agarosa.

Con respecto a la actividad relativa de los derivados, se obtuvieron valores superiores al 100%, para las lipasas 13a y 19 inmovilizadas sobre Octil-agarosa. Es importante mencionar que el incremento en la actividad enzimática, no es un fenómeno observado comúnmente durante procesos de inmovilización o adsorción a soportes sólidos. De hecho, la inmovilización covalente de lipasas sobre MANAE-glutaraldehído no promovió efectos de incremento en la actividad enzimática (Tabla 6.6).

Tabla 6.6 Rendimiento y actividad relativa de los derivados enzimáticos obtenidos mediante dos protocolos de inmovilización de lipasas producidas por hongos termotolerantes

Fuente No. cepa	Soporte	Rendimiento ^a (%)	Actividad relativa ^b (%)
13a	Octil-agarosa	85	120
19	Octil-agarosa	74	113
43a	Octil-agarosa	73	80
13a	MANAE-glutaraldehído	99	100
19	MANAE-glutaraldehído	91	100
43a	MANAE-glutaraldehído	97	100

^a El rendimiento se definió como la diferencia porcentual de la actividad total de la suspensión al inicio del proceso de inmovilización menos la actividad del sobrenadante

^b La actividad relativa se define como la relación porcentual entre la actividad observada y la actividad teórica esperada. La actividad se midió sobre pNFB a pH 7.0 y 25 °C

Bastida y col. (1998) reportan un incremento en la actividad de diferentes lipasas después de ser adsorbidas sobre Octil-agarosa (Tabla 6.7). Fernández-Lorente y col. (2008) reportaron este mismo fenómeno al inmovilizar la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* sobre Octil-agarosa, obteniendo 200% de actividad relativa. Fernández-Lafuente y col. (1998) sugieren que este incremento en la actividad se debe al mecanismo de adsorción interfacial de cada enzima, que involucra los sitios hidrofóbicos más expuestos de la lipasa, y que se encuentran generalmente rodeando al sitio catalítico, el cual, queda disponible para la actividad enzimática.

Tabla 6.7 Actividad relativa de los derivados enzimáticos obtenidos mediante la inmovilización de diferentes lipasas sobre Octil-agarosa y MANAE-glutaraldehído

Fuente de lipasas	Soporte	Actividad relativa ^a (%)
<i>Candida antarctica</i> A	Octil-agarosa	200
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Octil-agarosa	2,000
<i>Mucor javanicus</i>	Octil-agarosa	300
<i>Rhizomucor miehei</i>	Octil-agarosa	700
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Octil-agarosa	150
<i>Rhizopus niveus</i>	Octil-agarosa	600
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MANAE-glutaraldehído	80
<i>Rhizopus niveus</i>	MANAE-glutaraldehído	80

^a La actividad relativa se define como la relación porcentual entre la actividad observada y la actividad teórica esperada. La actividad se midió sobre *p*-nitrofenil propionato a pH 7.0 y 25 °C

Finalmente, se concluye que a través de ambos tipos de inmovilización se obtienen altos valores de rendimiento y actividad relativa en los derivados enzimáticos.

6.10 Efecto del tipo de inmovilización sobre la estabilidad de lipasas en función de la temperatura y pH

Uno de los principales objetivos en el desarrollo de catalizadores enzimáticos con lipasas es su incursión en reacciones enantio- y regioselectivas, las cuales se llevan a cabo a temperaturas moderadas (25-45 °C) y es importante mantener su estabilidad en estas condiciones de operación. Por tanto, con el propósito de evaluar la estabilidad de las lipasas inmovilizadas en función de la temperatura, los derivados obtenidos mediante adsorción sobre Octil-agarosa fueron seleccionados tomando como base los siguientes argumentos: 1) Permiten analizar la estabilidad de una enzima en condiciones similares a las cuales estaría la proteína con un alto grado de pureza, y 2) es uno de los tipos de inmovilización que ha proporcionado la mayor termoestabilidad en diversas lipasas evaluadas previamente (Fernández-Lorente y col., 2007b; Palomo y col., 2002).

Para evaluar la termoestabilidad, se pesaron 0.2 g de los derivados Octil-agarosa 13a, 19 y 43a, respectivamente. Posteriormente, se resuspendieron en 2.83 mL de amortiguador de

fosfatos 25 mM (pH 7) y se incubaron a una temperatura de 40 °C. En estas condiciones el derivado Octil-agarosa de la lipasa 19 conservó el 100% de actividad relativa (AR) hasta 3.2 h; por lo que se decidió incrementar la temperatura a 45 °C, observándose una pérdida en la AR de tan solo el 10% después de 1h y finalmente, después de permanecer 2 h a 50 °C, perdió el 80% de la AR (Figura 6.15).

La inmovilización sobre Octil-agarosa de la lipasa producida por la cepa 19 mejoró la estabilidad térmica de la enzima (100% AR, 3.2 h), ya que la actividad residual del biocatalizador L-19 (sólidos fermentados deshidratados) disminuye hasta el 20% a 40 °C en 1 h. Una mejora en la termoestabilidad también se observó en las lipasas de las cepas 13a y 43a cuando fueron adsorbidas sobre Octil-agarosa; con respecto a los biocatalizadores L-13a y L-43a, cuyos valores de actividad residual después de 1 h a 40 °C fueron 34.1 y 20.8%, respectivamente. En otros trabajos también se ha reportado una mayor termoestabilidad de las lipasas producidas por *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus* (Bastida y col., 1998) y *Bacillus thermocatenuatus* (Fernández-Lorente y col., 2008), cuando fueron adsorbidas sobre Octil-agarosa, con respecto a su forma libre.

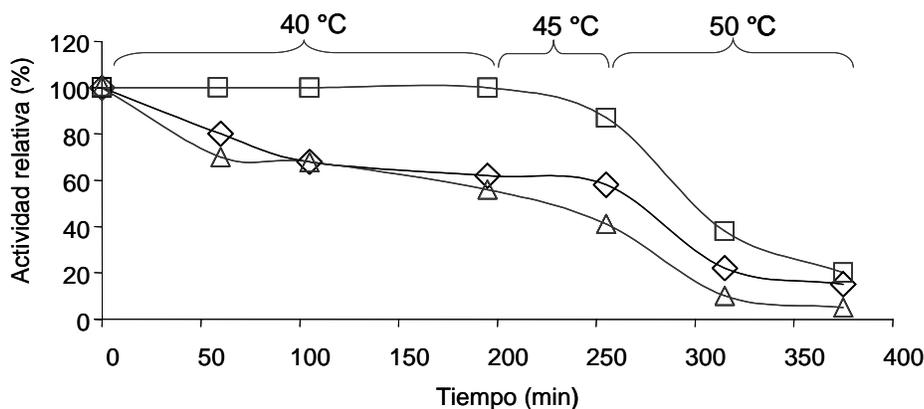


Figura 6.15 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las enzimas inmovilizadas en Octil-agarosa correspondientes a las cepas (◇) 13a, (□) 19 y (△) 43a. Los estudios se realizaron en un amortiguador 25 mM de fosfato de sodio (pH 7.0). La actividad enzimática se determinó de acuerdo a la sección 5.15. La actividad relativa (AR) se reportó empleando como referencia un derivado Octil-agarosa sin tratamiento.

Con base en los resultados anteriores, se tomó como referencia la lipasa producida por la cepa 19, para comparar la estabilidad de dos derivados enzimáticos: Octil-agarosa y MANAE-glutaraldehído, en función del pH del medio (5 y 7). Con este fin, se pesaron 0.2 g de los derivados y se suspendieron en 2 mL de amortiguador 25 mM de citrato (pH 5) o fosfatos (pH 7). Estos valores se definieron en función de las condiciones de operación para las subsecuentes reacciones de hidrólisis (enantioselectivas y asimétricas).

En la Figura 6.16 se observa que el derivado Octil-agarosa es más estable a pH 5, conservando el 60% de actividad después de 2 h, en contraste a la pérdida total de actividad en 0.5 h a pH 7. En referencia al derivado MANAE-glutaraldehído, no se observó efecto del pH sobre la estabilidad y en ambos casos se obtuvo un 40% de actividad residual, después de 2 h incubación. Estos resultados confirman que la estabilización de la forma abierta de la lipasa sobre soportes hidrofóbicos (Octil-agarosa) pueden producir enzimas inmovilizadas más estables que la unión covalente multipuntual (MANAE-glutaraldehído) (Palomo y col., 2004).

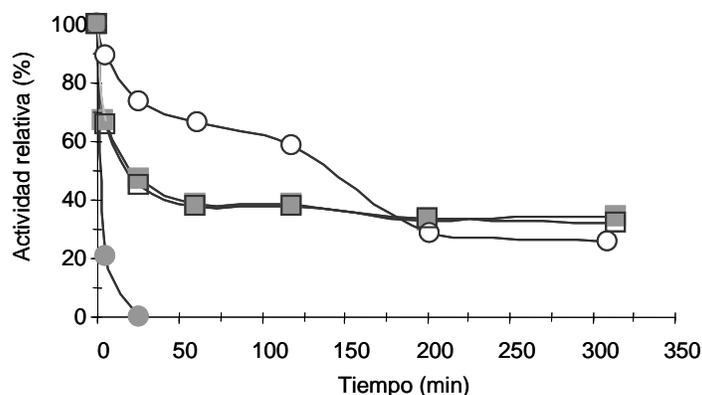


Figura 6.16 Efecto del pH sobre la estabilidad de dos derivados enzimáticos de la lipasa producida por la cepa 19. (○) Octil-agarosa 19-pH 5, (●) Octil-agarosa 19-pH 7, (□) MANAE-glutaraldehído 19-pH 5, (■) MANAE-glutaraldehído 19-pH 7. La actividad enzimática se determinó sobre *p*-NPB a pH 7.0 y 25°C de acuerdo a la sección 5.15. La actividad relativa (AR) se reportó empleando como referencia un derivado sin tratamiento.

6.11 Modificación de las propiedades enantioselectivas de lipasas producidas por hongos termotolerantes a través del tipo de inmovilización

Actualmente, existen diversas herramientas que permiten mejorar las propiedades selectivas de las lipasas, como: Técnicas de ingeniería de proteínas o evolución dirigida. Sin embargo, los procesos de inmovilización representan otra alternativa para promover distorsiones estructurales en la proteína que en algunos casos, pueden localizarse en el centro catalítico. Por tanto, es posible que a través de métodos de inmovilización puedan conferirse diferencias en rigidez, orientación y conformación, lo cual permitiría obtener derivados enzimáticos con diferentes propiedades catalíticas (Mateo y col., 2007). En esta etapa experimental, se empleó esta estrategia para modificar la enantioselectividad de las lipasas producidas por tres cepas de hongos termotolerantes (13a, 19 y 43a) inmovilizadas sobre Octil-agarosa (adsorción interfacial) y MANAE-glutaraldehído (unión covalente multipuntual), evaluando la hidrólisis enantioselectiva de los compuestos quirales ácido (\pm)-2-*O*-butiril-2-fenilacético [(\pm)-OBFA] y (\pm)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo [(\pm)-HFBE], así como la hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales di-*n*-metil [DMFG] y di-*n*-etil-fenil-glutarato [DEFG].

6.11.1 Hidrólisis enantioselectiva del ácido (\pm)-2-*O*-butiril-2-fenilacético

El ácido (\pm)-2-*O*-butiril-2-fenilacético [(\pm)-OBFA] es una molécula quiral cuyo centro asimétrico se ubica en el nucleófilo o sitio aceptor del grupo acilo y es soluble en un rango de pH de 5 a 7. Por tanto, se probó el efecto de ambos niveles de pH sobre la hidrólisis enantioselectiva de este sustrato, catalizada por tres derivados enzimáticos de la lipasa producida por la cepa 19 (Octil-agarosa, MANAE-glutaraldehído y MANAE-glutaraldehído-NH₂). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.8 y muestran que a pH 7 se obtienen mayores porcentajes de conversión con respecto a pH 5, en ambos casos a 25 °C. Este efecto fue más notable en el derivado MANAE-glutaraldehído, observando una conversión 8 veces mayor en un tiempo de reacción de 24 h, con respecto a la conversión a pH 5 en 48 h. Sin embargo, se observó un efecto contrario del pH sobre la enantioselectividad de la reacción, es decir, los derivados fueron menos selectivos a pH 7 con respecto a pH 5. Finalmente, cabe

mencionar que la modificación química (aminación) del derivado MANAE-glutaraldehído no promovió cambios en la enantioselectividad de la reacción.

Puede concluirse que al favorecer la actividad enzimática en la hidrólisis del sustrato [(±)-OBFA] por efecto del pH, disminuye la selectividad de las enzimas, independientemente del tipo de inmovilización. Este comportamiento también fue observado en la hidrólisis enantioselectiva de [(±)-OBFA], catalizada por las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus thermocatenuatus* inmovilizadas por unión covalente unipuntual (CNBr-agarosa y CNBr-agarosa-NH₂) (Palomo y col., 2007; Fernández-Lorente y col., 2008b); *Candida rugosa* y Lecitase®Ultra (fosfolipasa A1) inmovilizadas por adsorción interfacial sobre Octil-agarosa (Palomo y col., 2002; Fernández-Lorente y col., 2007b), cuyos datos se presentan en la Tabla 6.9.

Tabla 6.8 Hidrólisis enantioselectiva de [(±)-OBFA] catalizada por los derivados enzimáticos inmovilizados de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a

Lipasa	SopORTE de inmovilización	pH	Tiempo de reacción (h)	c ^a (%)	E ^b	Isómero preferente
19	Octil-agarosa	5	48	2.6	5.2	S
19	Glutaraldehído	5	48	2.7	25.8	S
19	Glutaraldehído-NH ₂	5	42	5.8	8.5	S
19	Octil-agarosa	7	24	8.0	1.9	S
19	Glutaraldehído	7	24	21.4	2.7	S
19	Glutaraldehído-NH ₂	7	28	9.0	5.6	S
13a	Octil-agarosa	5	48	2.5	∞	S
13a	Glutaraldehído	5	24	9.5	7.6	S
43a	Octil-agarosa	5	48	4.8	∞	S
43a	Glutaraldehído	5	24	9.5	9.8	S

^a c = conversión.

^b La relación enantiomérica (E) se reportó como la proporción entre porcentajes de los isómeros hidrolizados [(S)-OBFA] y [(R)-OBFA] a partir de la mezcla racémica.

Las reacciones subsecuentes con los derivados de las lipasas 13a y 43a, se realizaron a pH 5 (25 °C), debido a que la enantioselectividad se favoreció en estas condiciones de reacción. Es importante mencionar, que la enantioselectividad de las lipasas 13a y 43a se

modificó a través del tipo de inmovilización con un notable incremento en dicha propiedad ($E = \infty$) hacia la producción del isómero (*S*)-Ácido mandélico (AM), por los derivados Octil-agarosa de ambas lipasas. Esto indica que la conformación adquirida por el sitio activo de la enzima cuando ésta es adsorbida a la superficie hidrofóbica, limita el acceso del isómero (*R*)-OBFA (Figura 6.17). Las diferencias entre los derivados Octil-agarosa 13a y 43a respecto al derivado Octil-agarosa 19 sugieren diferencias conformacionales durante la adsorción de la lipasa debido a características propias de la enzima, en este caso, al tamaño de la tapa del sitio activo y al número de residuos hidrofóbicos presentes en esta región (Fernández-Lorente y col., 2008). Además, se ha reportado que el pH del medio de reacción, también puede contribuir en la selectividad, principalmente si el sustrato posee algún grupo funcional ionizable, en este caso el grupo carboxilo (Palomo y col., 2002; Fernández-Lorente y col., 2008b).

Tabla 6.9 Hidrólisis enantioselectiva de [(±)-OBFA] catalizada por lipasas inmovilizadas

Origen Lipasa	Soporte	pH ^a	c ^b (%)	E ^c	Isómero preferente	Referencia
<i>C. antarctica</i> -B	CNBr-agarosa ^d	7	15	1	-	Palomo y col., 2007
	CNBr-agarosa- NH ₂ ^d	7	11	2.6	<i>R</i>	''
<i>P. fluorescens</i>	CNBr-agarosa	7	19	2.0	<i>R</i>	''
	CNBr-agarosa- NH ₂	7	18	3.4	<i>R</i>	''
	CNBr-agarosa	5	12	29	<i>R</i>	''
	CNBr-agarosa- NH ₂	5	13	12	<i>R</i>	''
<i>T. lanuginosa</i>	CNBr-agarosa	7	18	3	<i>R</i>	''
	CNBr-agarosa- NH ₂	7	17	6	<i>R</i>	''
	CNBr-agarosa	5	10	1.1	<i>R</i>	''
	CNBr-agarosa- NH ₂	5	13.5	1.3	<i>R</i>	''
<i>C. antarctica</i> /Novozyme 435	Lewatit [®]	5	-	>100	<i>S</i>	Cabrera y col., 2009
<i>Candida rugosa</i>	Octil-agarosa	7	-	1.6	<i>S</i>	Palomo y col., 2002
	Octil-agarosa	5	-	85	<i>S</i>	''
<i>B. thermocatenuatus</i>	Octil-agarosa	5	-	>100	<i>S</i>	Fernández-Lorente y col., 2008
<i>B. thermocatenuatus</i>	CNBr-agarosa	7	15-20	1.8	<i>S</i>	Fernández-Lorente y col., 2008b
	CNBr-agarosa	5	15-20	>100	<i>S</i>	''
Fosfolipasa A1	Octil-agarosa	5	10-15	>100	<i>R</i>	Fernández-Lorente y col., 2007b
Lecitase [®] Ultra	Octil-agarosa	7	10-15	12	<i>R</i>	''

^a La temperatura de reacción en todos los casos fue de 25 °C

^b c = conversión

^c La relación enantiomérica (*E*) se reportó como la proporción entre porcentajes de los isómeros hidrolizados [(*S*)-OBFA] y [(*R*)-OBFA] a partir de la mezcla racémica

^d CNBr-agarosa: Unión covalente unipuntual; CNBr-agarosa- NH₂: Unión covalente unipuntual y aminación química

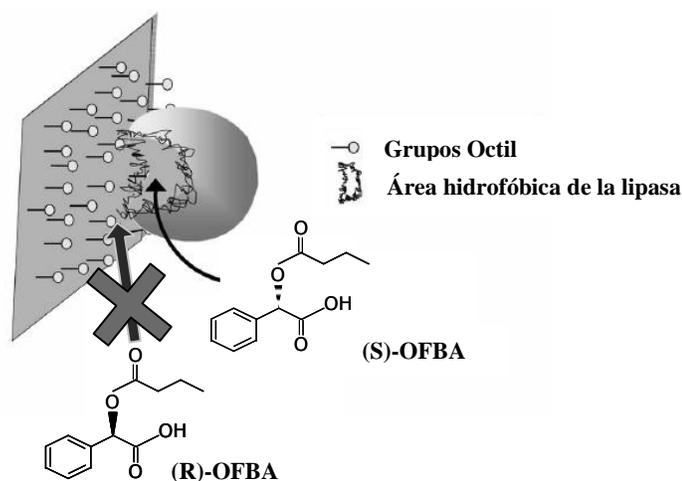


Figura 6.17 Efecto de la adsorción interfacial de las lipasas 13a y 43a en Octil-agarosa sobre la enantioselectividad del sustrato [(±)-OBFA] (Fernández-Lorente y col., 2008a).

Cabe mencionar que la enantioselectividad hacia la formación del isómero (*S*)-Ácido mandélico (AM), expresada por los derivados Octil-agarosa de las lipasas producidas por las cepas de hongos termotolerantes 13a y 43a, es comparable a la obtenida por las lipasas producidas por *Bacillus thermocatenuatus* y *Candida antarctica*-B, cuyo nombre comercial es Novozyme 435. La importancia industrial y económica del (*S*)-AM radica en su aplicación para la síntesis de moléculas de interés farmacéutico, como precursor de la (*S*)-Oxibutinina, receptor antagonista muscarínico, el cual está indicado para el tratamiento de la incontinencia urinaria, sin embargo, efectos secundarios no deseados (sequedad de mucosas, visión borrosa, náuseas, insomnio y palpitaciones cardiovasculares) del isómero *R* limitan su utilidad clínica (Palomo, 2003). Otro grupo de importancia en químicos finos y farmacéutica son diversos derivados de lactosas como: 1-metil-7-oxabicyclo[2,2,1]heptan-2-ona y (-)-8-epi-9-desoxigoniopipirona (Fernández-Lorente y col., 2007b).

6.11.2 Hidrólisis enantioselectiva de (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo

El compuesto (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo [(±)-HFBE] es una molécula quiral cuyo centro asimétrico se ubica en el donador del grupo acilo y es soluble en un rango de pH de 5 a 7. Por tanto, el efecto de esta variable se probó sobre la enantioselectividad de la hidrólisis de este sustrato, catalizada por tres derivados enzimáticos de la lipasa producida por

la cepa 19 (Octil-agarosa, MANAE-glutaraldehído y MANAE-glutaraldehído-NH₂) y dos derivados enzimáticos de las lipasas producidas por las cepas 13a y 43a (Octil-agarosa y MANAE-glutaraldehído), también se evaluó el efecto del co-disolvente (15% acetonitrilo) y la temperatura (4 y 25 °C). Los resultados de la Tabla 6.10 muestran que el pH del medio no es un factor que modifique la enantioselectividad de la reacción, catalizada por las lipasas evaluadas (13a, 19 y 43a). Sin embargo, se observó un ligero incremento en la selectividad de los derivados Octil-agarosa con respecto al resto de los derivados enzimáticos. Además, disminuir la temperatura de reacción de 25 a 4 °C, provocó un incremento en el valor de $E= 3$ a 4. Estos resultados, coinciden con los obtenidos por Palomo (2003), quien obtuvo valores de $E= 4.7$ en la hidrólisis enantioselectiva de [(±)-HFBE] catalizada por la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* adsorbida a un soporte hidrófobico y empleando una temperatura de reacción de 4 °C y los derivados enzimáticos producidos por unión covalente de la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* mostraron menores valores de enantioselectividad.

Tabla 6.10 Hidrólisis enantioselectiva de [(±)-HFBE] catalizada por derivados enzimáticos de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a

Lipasa	Soporte	Condiciones de reacción	Tiempo de reacción (h)	c ^a (%)	E^b	Isómero preferente
19	Octil-agarosa	pH 7, 25°C	4	13.8	3.0	<i>S</i>
19	Glutaraldehído	pH 7, 25°C	4	40.3	1.2	<i>S</i>
19	Glutaraldehído-NH ₂	pH 7, 25°C	4	31.0	1.4	<i>S</i>
19	Octil-agarosa	pH 5, 25°C	4	16.5	3.9	<i>S</i>
19	Glutaraldehído	pH 5, 25°C	4	32.3	1.0	-
19	Glutaraldehído-NH ₂	pH 5, 25°C	72	74.1	1.4	<i>S</i>
19	Octil-agarosa	pH 5, 25°C, 15% ACN	72	44.7	4.0	<i>S</i>
19	Octil-agarosa	5, 4°C	72	63.5	4.7	<i>S</i>
13a	Octil-agarosa	5, 25°C	6	19.1	1.3	<i>R</i>
13a	Glutaraldehído	5, 25°C	2	18.2	1.7	<i>S</i>
43a	Octil-agarosa	5, 25°C	6	18.3	1.2	<i>R</i>
43a	Glutaraldehído	5, 25°C	2	18.0	1.8	<i>R</i>

^a c = conversión

^b La relación enantiomérica (E) se reportó como la proporción entre porcentajes de los isómeros hidrolizados [(*S*)- HFBE] y [(*R*)- HFBE] a partir de la mezcla racémica

En general, todos los derivados evaluados presentaron bajos valores de *E* en la hidrólisis enantioselectiva de [(±)-HFBE]. Si comparamos los resultados obtenidos con la hidrólisis enantioselectiva del sustrato [(±)-OBFA], podríamos concluir que la *E* de las lipasas 13a, 19 y 43a se modificó a través del tipo de inmovilización, en las reacciones cuyo sustrato tiene localizado el carbono quiral en la parte nucleófilo del sustrato éster [(±)-OBFA], contrario a lo observado en el sustrato cuyo carbono quiral se ubica en el donador acilo del sustrato éster [(±)-HFBE].

Por otra parte, se observa que el isómero mayoritario formado por los derivados de la lipasa 19 es el (*S*)-ácido-2-hidroxi-4-fenilbutanoico (*S*-AHFB), el cual es un precursor del Enalapril (*S*)-1-[N-[1-etoxicarbonil-3-fenilpropil]-L-alanil]-L-prolina, fármaco importante para el control de la hipertensión y en el tratamiento de insuficiencias cardíacas. Además, los fármacos derivados del *S*-AHFB presentan un menor poder de inhibición que los obtenidos a partir del isómero (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutanoico (*R*-AHFB), por tanto es necesario desarrollar una técnica eficaz para la resolución de dicha mezcla racémica (Palomo, 2003).

6.11.3 Hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales di *n*-metil fenil-glutarato (DMFG) y di *n*-etil fenil-glutarato (DEFG)

A través de la hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales di-*n*-metil [DMFG] y di-*n*-etil-fenil-glutarato [DEFG] es posible obtener derivados quirales del ácido 3-arilglutárico, empleados en la industria de químicos finos y farmacia como precursores para la síntesis de diversas moléculas con actividad biológica, las cuales poseen un fragmento quiral glutárico en sus estructuras, esencial para su actividad. Entre estos fármacos destacan: (-)-paroxetina hidrocloreto, un receptor antagonista de la serotonina; piperidinas, empleadas para el tratamiento del asma; 1-amino-2-fenil-4-(piperidin-1-il)-butano, un antagonista del receptor CCR5 involucrado en la transmisión del VIH-1 a las células y SCH 54016, un potente inhibidor del colesterol (Cabrera y col., 2008).

En este trabajo se evaluó la enantioselectividad de los derivados Octil-agarosa y MANAE-glutaraldehído de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a en la hidrólisis

asimétrica de los compuestos pro-quirales di-*n*-metil [DMFG] y di-*n*-etil-fenil-glutarato [DEFG], de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.19.

Con respecto a la hidrólisis asimétrica de DMFG, ambos derivados de la lipasa 19 generaron como único producto el monoéster quiral, (*S*)-*n*-metil-fenilglutarato [(*S*)-MFG]. Mientras que al emplear el sustrato DEFG, solamente el derivado MANAE-glutaraldehído presentó una elevada enantioselectividad hacia la producción del (*S*)-*n*-etil-fenilglutarato [(*S*)-EFG]. Por tanto, en la hidrólisis asimétrica catalizada por los derivados de la lipasa 19, tanto el grupo carboalcoxi como el tipo de inmovilización tuvieron efecto sobre la enantioselectividad del producto de reacción (*S*)-*n*-metil-fenilglutarato y (*S*)-*n*-etil-fenilglutarato (Tabla 6.11). Estos resultados son importantes porque las hidrólisis asimétricas catalizadas por los derivados enzimáticos usados en este trabajo permiten obtener mayores rendimientos de los compuestos quirales con respecto a la hidrólisis cinética de racematos (Fernández-Lorente y col., 2007c). Como se puede observar en la Tabla 6.12, el isómero *S* también es el producto preferente de la Fosfolipasa A1 (Lecitase[®] Ultra) y de la lipasa producida por *Bacillus thermocatenuatus* en la hidrólisis asimétrica de los sustratos DMFG y DEFG, respectivamente. Sin embargo, el factor de asimetría (*A*) fue menor con respecto a los derivados de la lipasa 19 evaluados en este trabajo para ambos sustratos.

Tabla 6.11 Hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales DMFG y DEFG catalizada por derivados enzimáticos de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a

Lipasa	Soporte	Sustrato	Tiempo de reacción (h)	c ^a (%)	A ^b	Isómero preferente
19	Octil-agarosa	DMFG	96	10.0	∞	<i>S</i>
19	Glutaraldehído	DMFG	96	40.0	∞	<i>S</i>
19	Octil-agarosa	DEFG	21	18.6	1.3	<i>R</i>
19	Glutaraldehído	DEFG	48	62.9	∞	<i>S</i>
13a	Octil-agarosa	DEFG	24	19.1	7.2	<i>R</i>
13a	Glutaraldehído	DEFG	24	50.0	7.2	<i>R</i>
43a	Octil-agarosa	DEFG	24	39.9	7.6	<i>R</i>
43a	Glutaraldehído	DEFG	24	74.5	5.8	<i>R</i>

^a c = conversión

^b A = El factor de asimetría se reportó como la proporción entre los isómeros del monoéster, *n*-metil fenil-glutarato [MFG] y *n*-etil fenil-glutarato [EFG]

Los derivados de las lipasas 13a y 43a presentan un valor de $A \approx 7$ y una inversión en la enantioselectividad respecto a los derivados de la cepa 19. Es decir, producen (*R*)-*n*-etil-fenilglutarato como isómero mayoritario. En la hidrólisis asimétrica catalizada por los derivados de las lipasas 13a y 43a, el tipo de inmovilización no modificó la enantioselectividad de la reacción.

Tabla 6.12 Hidrólisis asimétrica de los sustratos pro-quirales DMFG y DEFG catalizada por lipasas inmovilizadas

Origen / Lipasa	Soporte	Sustrato	c ^a (%)	A ^b	Isómero preferente	Referencia
Fosfolipasa A1	CNBr-agarosa ^c	DMFG	20	10	S	Cabrera y col., 2008
Lecitase®Ultra	Octil-agarosa	DMFG	20	5	S	”
<i>C. antarctica</i> /Novozyme 435	Lewatit®	DMFG	-	13	R	Cabrera y col., 2009
<i>B. thermocatenuatus</i>	Octil-agarosa	DEFG	-	44	S	Fernández-Lorente y col., 2008a
”	CNBr-agarosa ^c	DEFG	15-20	55	S	Fernández-Lorente y col., 2008b
”	Glioxil-agarosa ^c	DEFG	15-20	13	S	”

^a c = conversión

^b El factor de asimetría se reportó como la proporción entre los isómeros del monoéster, *n*-metil fenil-glutarato [MFG] y *n*-etil fenil-glutarato [EFG]

^c CNBr-agarosa: Unión covalente unipuntual; Glioxil-agarosa: Unión covalente multipuntual

Finalmente, se concluye que el derivado MANAE-glutaraldehído de la lipasa 19, es candidato para ser empleado en la hidrólisis enantioselectiva de los sustratos DMFG y DEFG para la obtención de bloques quirales del ácido 3-arilglutárico, empleados en la industria de químicos finos y farmacia. Sin embargo, es conveniente identificar las condiciones de reacción que permitan mejorar el porcentaje de conversión y los rendimientos del proceso.

Al observar diferencias catalíticas importantes de las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a, se planteó el objetivo de identificar características estructurales de estos biocatalizadores. Por tanto, en la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos del análisis de espectrometría de masas efectuado sobre bandas extraídas de geles de poliácridamida y reveladas por una técnica de zimografía.

PARTE IV

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La espectrometría de masas se llevó a cabo con la finalidad de identificar la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de proteínas (lipasas) a través de la interpretación de los espectros de fragmentación de péptidos generados a partir de la proteólisis con tripsina (digestión tríptica). La muestra se introdujo en el espectrómetro de masas previo fraccionamiento mediante una nanocolumna de fase reversa (C18). Esto permitió la entrada secuencial de los péptidos generados en la digestión tríptica y su aislamiento y fragmentación por el espectrómetro de masas. Las muestras analizadas fueron bandas recuperadas de geles de poliacrilamida y reveladas por una técnica de zimografía para lipasas (sección 5.16).

6.12 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Como resultado del análisis de la fragmentación de péptidos que corresponden a la lipasa producida por la cepa 43a, se encontraron 2 péptidos, uno de ellos (IINEPTAAAIAYGLDK) marcado en color rojo en la Figura 6.18, con un alto índice de confiabilidad (Score > 95) presentó identidad con una proteína producida por *Rhizopus stolonifer* (no identificada), ubicada en el Gen ID: gi|219774023|emb|CAW37039.1| (Anexo H).

Las secuencias de los péptidos obtenidos fueron analizadas con la ayuda de una “herramienta de búsqueda de alineamiento básico local” BLAST (por sus siglas en inglés) de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), encontrándose homología con la proteína de choque térmico Hsp70 proteína 1 de *Rhizopus stolonifer* cuya estructura primaria se presenta en la Figura 6.18 y cuyas propiedades funcionales corresponden al de una chaperona. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la secuencia de aminoácidos corresponda a una lipasa, ya que se ha observado en organismos eucariontes y específicamente en estudios del género *Rhizopus*, que las lipasas son sintetizadas como pre-pro-proteínas de acuerdo a Hama y col., 2007 y Ueda y col., 2002 (Figura 6.19), elucidando que el pro-péptido está involucrado en la interacción con la membrana celular y los procesos de secreción de la enzima, además de ser indispensable para generar una lipasa activa al participar en el

plegamiento de la proteína madura. Por lo tanto, se considera que el pro-péptido actúa como una chaperona intramolecular (Ueda y col., 2002; Hama y col., 2007). La información anterior podría explicar la similitud de la secuencia perteneciente a la lipasa producida por *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (cepa 43a) con una chaperona.

```

1  MSEGKSVGIDLGTTYSCVGVWQNDRVEIIANDQGNRTTPSYVGFTDSERLIGDAAKNQVA 60
61  MNPYNTVFDKRLIGRRFNDAEVQADMKHSFKVVEKESKPIIQVEYKGETKTFTPEEIS 120
121 AMILVKMKETAEAAYLGSVAVKNAVITVPAYFNDSQRQATKDALISGLNVQRIINEPTAAA 180
181 IAYGLDKKVEGERNVLIIFDLGGGTFDVSLLTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVAH 240
241 FMQEFKRKFKKDITGNARAIRRLRTACERAKRTLSSAAQTTEIDSLFEGVDFYTSLTRA 300
301 RFEELNQDLFRNTMEPVEKVLDRSKIDKSQVHDIIVLVGGSTRIPKVQKLVSDFFNGKEPN 360
361 KSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDTSEKTQDLLLLDVAPLSLGIETAGGVMTALIKRNTTV 420
421 PTKKSEVFSTYADNQPGVLIQVFEGERARTKDNNILGKFELSGIPPAPRGVQVEVTFDV 480
481 DANGILNVSALDKTTGKSNKITITNDKGRLSKEDIERMVNDAEKYKAEDEAAAASRIQAKN 540
541 GLESYAYNLRNTLQDERSV GALPEEDKTKLNAAVDES IKWLDESQEASKEEYESKQKELE 600
601 EIANPIMMKFYQQAGGAPGGAPGAAPGGFPGAGAAPGSTDETDGPSIEEVD 660

```

Figura 6.18 Secuencia de aminoácidos de la proteína Hsp70 de *Rhizopus stolonifer*, obtenida mediante un análisis de homología con ayuda del software BLAST de NCBI. El código de color de los aminoácidos es el siguiente: rojo, péptido identificado por espectrometría de masas; azul, secuencia consenso del motivo serina del sitio catalítico.

Otro aspecto importante a señalar en la Figura 6.18, se refiere a la secuencia G-K-S-V-G (en color azul), que corresponde a la secuencia consenso serina del sitio catalítico ó secuencia consenso lipasa-esterasa (G-X-S-X-G) presente en los genes que codifican para lipasas en células eucariotas (Ueda y col., 2002; Liu y col., 2008).

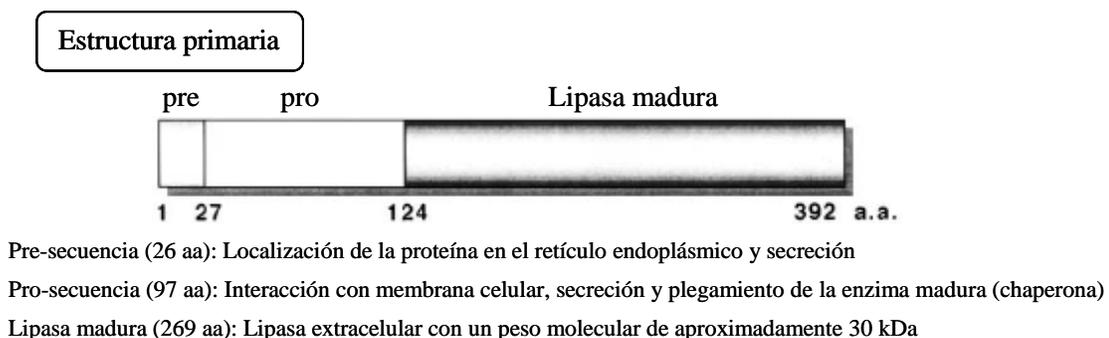


Figura 6.19 Representación esquemática de la lipasa sintetizada por *Rhizopus oryzae*

Adicionalmente, se identificaron cinco secuencias consenso potenciales de N-glicosilación en la proteína (N-X-S/T, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina), con ayuda del software “ExPASy Proteomics tools” (<http://www.expasy.ch/tools/>), estos son -N-R-T-(35), -N-D-S-(151), -N-K-S-(358), -N-T-T-(416) y -N-V-S-(486) (Figura 6.20). En el caso de la lipasa producida por *Aureobasidium pullulans* HN2-3 se encontraron tres sitios potenciales de N-glicosilación: -N-R-T-(41), -N-C-T-(163) y -N-P-T-(222) (Liu y col., 2008). De igual manera, la lipasa de *Rhizopus oryzae* tiene tres sitios potenciales de N-glicosilación y se observó además, que no contribuyen con la termoestabilidad de la enzima (Ueda y col., 2002). Esto lo comprobaron al incubar a 40 °C por 30 min, la lipasa nativa (glicosilada) y la lipasa después del tratamiento con una endoglicosidasa H (Endo H), obteniendo una pérdida del 50% en la actividad enzimática en ambos casos. En este trabajo obtuvimos una actividad relativa del 20.8% después de incubar a 40 °C por 60 min la lipasa producida por *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (cepa 43a). Por tanto, una perspectiva consistiría en corroborar si los sitios identificados están glicosilados y si contribuyen con la termoestabilidad de las enzimas.

```

MSEGKSVGIDLGTYSVGVWQNDRVEIIANDQGNRTTPSYVGFDTDSERLIGDAAKNQVAMNPYNTVFDARLIGRRFND      80
AEVQADMKHSFKVVEKESKPIIQVEYKGETKTFTPEEISAMILVKMKETAEEAYLGSVAVKNAVITVPAYFNDSQRQATKD    160
AGLISGLNVQRIINEPTAAAIAYGLDKKVEGERNVLIFDLGGTTFDVSLLTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVAH    240
FMQEFKRKFKKDIIGNARAIRRLRTACERAKRTLSSAAQTTEIDSLFEGVDFYTSLTRAFEELNQDLFRNTMEPVEKVL    320
RDSKIDKSQVHDIVLVGGSTRIPKVQKLVSDFNGKEPNKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGDTSEKTQDLLLLLDVAPLSL    400
GIETAGGVMTALIKRNTTVPTKKSEVFSTYADNQPGVLIQVFEGERARTKDNNILGKFELSGIPPARGVPQVEVTFDVD    480
ANGILNVSALDKTTGKSNKITITNDKGRLSKEDIERMVNDAEKYKAEEAAAASRIQAKNGLESYAYNLRNTLQDERSVGA    560
LPEEDKTKLNAAVDES IKWLDESQEASKEEYESKQKELEEIANPIMMKFYQQAGGAPGGAPGAAPGGFPGAGAAPGSTDE    640
TDGPSIEEVD
.....N..... 80
.....N..... 160
..... 240
..... 320
.....N..... 400
.....N..... 480
.....N..... 560

```

Figura 6.20 Los sitios potenciales de N-glicosilación con las secuencias Asn-Xaa-Ser/Thr se marcan en color azul. Asparagina con potencial N-glicosilación se marca en color rojo.

Los resultados correspondientes a las bandas de zimografía para lipasas de las cepas 13a y 19, no dieron niveles de confiabilidad aceptables (Score < 45) (Anexo H), por lo cual, no fue posible identificar las proteínas.

Capítulo 7

Conclusiones

CONCLUSIONES

PARTE I

Producción de lipasas por fermentación en medio sólido

- Al incrementar el contenido de humedad inicial en el medio de cultivo, de 55 a 65%, disminuye el periodo de la fase *lag*, lo cual se atribuye a diferencias en la permeabilidad y la velocidad de los procesos de transporte de agua a través de la espora, seguidos de la formación del tubo germinal y elongación del mismo.
- Los tamaños de partícula evaluados 1) 0.84-2.0 mm y 2) 1.68-2.88 mm, no tienen efecto sobre los parámetros cinéticos de crecimiento (μ y fase *lag*), pero sí sobre la actividad lipasa obtenida en el cultivo de *Rhizopus homothallicus* sobre espuma de poliuretano y un contenido de humedad inicial de 55%.
- En ambos soportes inertes evaluados (puf y agrolita), los mayores valores de actividad lipasa y tasa de producción de CO₂ se observaron a las 20 h del cultivo con 55% de contenido de humedad inicial y empleando un tamaño de partícula de 0.84-2.0 mm. Sin embargo, la actividad enzimática fue mayor (40%) en agrolita que en puf.
- Se evaluaron dos métodos de secado para la materia fermentada, liofilización y corriente de aire, siendo seleccionado este último proceso, con base en las ventajas que representa respecto al otro, tales como: mayor actividad enzimática residual (83.8%), el tiempo de proceso (3 h), además de significar una técnica sencilla y considerablemente más económica.
- Los Biocatalizadores producidos por las cepas de hongos termotolerantes *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (L-19) y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (L-43a), expresaron

títulos de actividad lipasa comparables a la preparación enzimática comercial Lipozyme® RM IM (Novozymes). Por tanto, estos sólidos fermentados son candidatos para aplicaciones industriales.

PARTE II

Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos

- El empleo conjunto del momento dipolar y la clasificación de los solventes orgánicos con base en sus grupos funcionales, permitió obtener cuatro perfiles de actividad relativa (estabilidad); lo cual sugiere diferencias estructurales entre las lipasas evaluadas.
- Los Biocatalizadores L-9a, L-13a, L-13b, L-19, L-23a y L-43a presentaron elevada estabilidad en solventes polares (próticos y apróticos).
- El Biocatalizador L-19 fue termoestable en solventes orgánicos polares y no polares.
- El tratamiento de los Biocatalizadores L-19 y L-43a con solventes polares incrementó la actividad lipasa (actividad relativa mayor a 100%).
- Los Biocatalizadores producidos en este trabajo son potencialmente aplicables en procesos biotecnológicos. En particular, en sistemas catalíticos con solventes orgánicos polares como medio de reacción, los cuales poseen ventajas tecnológicas tales como baja toxicidad, bajos puntos de ebullición, bajo costo y la posibilidad de emplear una amplia variedad de sustratos polares.

PARTE III

Inmovilización de lipasas: Estudios de estabilidad y propiedades enantioselectivas

- Se estableció una concentración de 0.5% de Tritón X-100 para la extracción de lipasas de los sólidos fermentados producidos por las cepas 13a, 19 y 43a.

- Las lipasas producidas por las cepas 13a, 19 y 43a poseen una masa molecular aproximada de 31 kDa.
- Las lipasas 13a y 19 presentan una ligera activación, 20 y 13% respectivamente, cuando son adsorbidas sobre el soporte hidrofóbico de inmovilización Octil-agarosa.
- La inmovilización de la lipasa producida por la cepa 19, a través de adsorción interfacial sobre el soporte hidrofóbico Octil-agarosa, incrementó la termoestabilidad con respecto a la enzima libre.
- La inmovilización de la lipasa producida por la cepa 19 sobre el soporte hidrofóbico Octil agarosa a pH 5, genera una estructura más estable que su análogo producido a pH 7 y que la unión covalente multipuntual sobre el soporte (MANAE-glutaraldehído).
- La enantioselectividad (*E*) de las lipasas 13a, 19 y 43a, se modificó por el método de inmovilización, en el compuesto cuyo carbono quiral se localiza en la parte nucleófilo del sustrato éster [(±)-OBFA], contrario a lo observado en el sustrato cuyo carbono quiral se ubica en el donador acilo del sustrato éster [(±)-HFBE].
- El grupo carboalcoxi y el tipo de inmovilización modifican la enantioselectividad de los derivados enzimáticos de la lipasa 19 en la hidrólisis asimétrica de los compuestos pro-quirales di-*n*-metil [DMFG] y di-*n*-etil-fenil-glutarato [DEFG].

PARTE IV

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

- Como resultado del análisis de fragmentación de péptidos de la banda electroforética correspondiente a la cepa 43a, se encontró un péptido (IINEPTAAAIAYGLDK) con un alto índice de confiabilidad (Score > 95) en la correspondencia a una proteína producida por

Rhizopus stolonifer, con alta homología a la proteína de choque térmico Hsp70 proteína 1, cuya estructura primaria y propiedades funcionales corresponden al de una chaperona.

- La similitud de la secuencia perteneciente a la lipasa producida por *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (cepa 43a) con una chaperona se explica con base a las evidencias en estudios del género *Rhizopus*, de que las lipasas se sintetizan como una pre-pro-proteína (pro-péptido), que es indispensable para generar una lipasa activa al participar en el plegamiento de la proteína madura, además de estar involucrada en la interacción con la membrana celular y los procesos de secreción de la enzima, por lo que se considera que el pro-péptido actúa como una chaperona intramolecular.
- En la banda correspondiente a la cepa 43a, se identificaron cinco secuencias consenso potenciales de N-glicosilación en la proteína, los cuales fueron -N-R-T-(35), -N-D-S-(151), -N-K-S-(358), -N-T-T-(416) y -N-V-S-(486), sin embargo, con base en evidencias experimentales de este trabajo, éstos no contribuyen en la termoestabilidad de la enzima.
- Finalmente, se concluye las lipasas producidas en este trabajo no son termoestables como se esperaba, aún cuando datos bibliográficos sugieren que son enzimas glicosiladas y además, son producidas por microorganismos termotolerantes, lo que posiblemente daría lugar a la obtención de enzimas termoestables.

Capítulo 8

Perspectivas

PERSPECTIVAS

- Producción de lipasas sobre soportes sólidos inertes con resistencia mecánica a los sistemas de agitación de los procesos catalíticos.
- Evaluación de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas de manera natural en la materia seca fermentada (Biocatalizadores), inmovilizadas por adsorción interfacial sobre Octil agarosa y por unión covalente multipuntual sobre MANAE-glutaraldehído, en la resolución de mezclas racémicas con medios acuosos en presencia de co-solventes orgánicos.

Capítulo 9

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

A

Abel H., Marie D., Nathalie R., Danielle D., Louis S., Louis C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 2000. 26: 421-430.

Adamczak M., Krishna S.H. Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* 2004. 42: 251–264.

Affleck R., Haynes C.A., Clark D.S. Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. 89: 5167-5170.

Ajima A., Yoshimoto T., Takahashi K., Tamaura Y., Saito Y., Inada Y. Polymerization of 10-hydroxydecanoic acid in benzene with polyethylene glycol-modified lipase. *Biotechnol Lett.* 1985. 7: 303-306.

Alhir S., Markakis P., Chandan R.C. Lipase of *Penicillium caseicolum*. *J. Agric. Food Chem.* 1990. 38: 598-601.

Amin F., Bhatti, H.N., Rehman S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *African J. Biotechnol.* 2011. 10: 5514-5523.

Arima K., Liu W.H., Beppu T. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. *Agr. Biol. Chem.* 1972. 36 (11): 1913-1917.

Arpigny J.L., Jaeger K.E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 1999. 343: 177-183.

Arroyo M. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica.* 1998. 39: 23-39.

Awan U., Shafiq K., Mirza S., Ali S., Rehman A., ul-Haq I. Mineral constituents of culture medium for lipase production by *Rhizopus oligosporous* fermentation. *Asian J. Plant Sci.* 2003. 12: 913-915.

B

Babu K.R., Moradian A., Douglas D.J. The methanol-induced conformational transitions of β -lactoglobulin, cytochrome *c*, and ubiquitin at low pH: A study by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001. 12: 317-328.

Balashev K., Jensen T.R., Kjaer K., Bjørnholm T. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie.* 2001. 83: 387-397.

Bhagwat S.S., Bevinakatti H.S., Doble M. Transesterification of substituted ethanols-modelling studies. *Biochem. Eng. J.* 2005. 22: 253-259.

Bancerz R., Ginalska G. A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 34: 553–560.

Bárzana E., Karel M., Klibanov A.M. Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnol. Bioeng.* 1989. 34: 1178-1185.

Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernández-Lafuente R., Huguet J., Guisán J.M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 1998. 58: 486–493.

Benjamin S., Pandey A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2000. 43: 453-460.

Benjamin B., Pandey A. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. *Bioresource Technol.* 1996. 55: 167-170.

Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000. 133–153.

Beys S.W., Mitidieri S., Schrank A., Vainstein H.M. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* 2005. 40: 321-326.

Blomberg A. Adler N. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 1992. 33: 145-212.

Bornscheuer U., Kazlauskas R., *Hydrolases in organic synthesis. Regio- and stereoselective biotransformations.* Wiley-VCH. Germany, 1999.

Bornscheuer T.U., Bessler C., Srinivas R., Krishna S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* 2002. 20: 433-437.

Brady D., Steenkamp L., Skein E., Chaplin J.A., Reddy S. Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR. *Enzyme Microb. Technol.* 2004. 34: 283–291.

C

Cabrera Z., Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., Asymmetric hydrolysis of dimethyl 3-phenylglutarate catalyzed by Lecitase Ultra®. Effect of the immobilization protocol on its catalytic properties. *Enzyme Microb. Technol.* 2008. 43: 531–536.

Cabrera C, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo J.M., Guisan J.M. Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical Modification. *Process Biochem.* 2009. 44: 226–231.

Cabrera C, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo J.M., Guisan J.M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009. 57: 171–176.

Camacho P.B., Robles M.A., Camacho R.F., González M.P., Molina G.E. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 2003. 33: 845–853.

Castilho L.R., Polato C.M.S., Baruque E.A., Sant'Anna Jr G.L., Freire D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.* 2000. 4: 239-247.

Cavalcanti E.D.C., Gutarra M.L.E., Freire D.M.G., Castilho L.R., Júnior G.L.S. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2005. 48: 79-84.

Chang Q.L., Lee Ch.H., Parkin K.L. Comparative selectivities of immobilized lipases from *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* (Fraction B) for esterification reactions with glycerol and glycerol analogues in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 1999. 25: 290-297.

Chen Q.X., Zhang R.Q., Yang P.Z., Li Y., Chen S.L., Li S., Yang Y., Zhou H.M. Effect of ethanol on the activity and conformation of *Penaeus penicillatus* acid phosphatase. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999. 26: 103–107.

Choo D.W., Kurihara T., Suzuki T., Soda K., Esaki N. A cold-adapted lipase of an alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: Gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. 64: 486–491.

Christen P., Angeles N., Corzo G., Farres A., Revah S., Microbial lipase production on a polymeric resin. *Biotechnol. Tech.* 1995. 9: 597-600.

Córdova J., Nemmaoui M., Ismaili-Alaoui M., Morin A., Roussos S., Raimbault M., Benjilali B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 1998. 5: 75-78.

Córdova J., Roussos S., Baratti J., Nungaray J., Loera O. Identification of mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micol. Apl. Int.* 2003. 15(2): 37-44.

Corzo G., Revah S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technol.* 1999. 70: 173-180.

Cross H., Marriott R., Grogan G. Enzymatic esterification of lavandulol – a partial kinetic resolution of (*S*)-lavandulol and preparation of optically enriched (*R*)-lavandulyl acetate. *Biotechnol. Lett.* 2004. 26: 457–460.

D

Degrassi G., Uotila L., Klima R., Venturi V. Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. *App. Environ. Microbiol.* 1999. 65: 3470-3472.

Destain J., Roblain D., Thonart P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 1997. 19: 105-107.

Devanesan M.G., Viruthagiri T., Sugumar N. Transesterification of Jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.* 2007. 6: 2497-2501.

Dias Ribeiro B., Machado C.A., Zarur C.M.A., Guimarães F.D.M. Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Res.* 2011. 1-16.

Domínguez A., Costas M., Longo M.A., Sanromán A. A novel application of solid state culture: Production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 2003. 25: 1225-1229.

Dossat V., Combes D., Marty A. Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 2002. 30: 90-94.

Ducret A., Trani M., Lortie, R. Lipase catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme Microb. Technol.* 1998. 22: 212-216.

E

Ekundayo J.A., Carlile M.J. The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*; spore swelling and germ-tube emergence. J. Gen. Microbiol. 1964. 35: 261-269.

Elibol M., Ozer D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochem. 2000. 36: 325-329.

Engström K., Vallin M., Syrén P., Hult K., Bäckvall J. Mutated variant of *Candida antarctica* lipase B in (S)-selective dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. Org. Biomol. Chem. 2011. 9: 81-82.

F

Fakhreddine L., Kademi A., Aït-Abdelkader N., Baratti J.C. Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. Biotechnol. Lett. 1998. 20: 879–883.

Fan X., Matthey M. Small enzymes with esterase activities from two thermophilic fungi, *Emericella nidulans* and *Talaromyces emersonii*. Biotechnol. Lett. 1999. 21: 1071-1076.

Fernandes M.L.M., Saad E.B., Meira J.A., Ramos L.P., Mitchell D.A., Krieger N.. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. J. Mol. Cat. B: Enzym. 2006. 263: 8–13.

Fernández-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P., Fernández-Lorente G., Guisán J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. Chem. Phys Lipids. 1998. 93: 185–197.

Fernández-Lafuente R., Rosell C.M., Rodríguez V., Santana C., Soler G., Bastida A., Guisán J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. Enzyme Microb. Technol. 1993. 15: 546–50.

Fernández-Lorente G. Tesis de Doctorado. Hidrólisis enantio-regioselectiva de ésteres quirales y poliésteres catalizada por lipasas adsorbidas a soportes hidrofóbicos. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Orgánica. 2000. Madrid. España.

Fernández-Lorente G., Betancor L., Carrascosa A.V., Guisán J.M. Release of omega-3 fatty acids by the hydrolysis of fish oil catalyzed by lipases immobilized on hydrophobic supports. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011. 88: 1173–1178.

Fernández-Lorente G., Cabrera Z., Godoy C., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisán J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem.* 2008a. 43: 1061–1067.

Fernandez-Lorente G., Godoy C.A., Mendes A.A., Lopez-Gallego F., Grazu V., de las Rivas B., Palomo J.M., Hermoso J., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. *Biomacromolecules.* 2008b. 9: 2553–2561.

Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Cabrera Z., Fernandez-Lafuente R, Guisán J.M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnol. Bioeng.* 2007. 97(2): 242-250.

Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase® Ultra. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2007b. 47: 99–104.

Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Cabrera Z., Guisan J.M., Fernández-Lafuente R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.* 2007c. 41: 565–569.

Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Mateo C., Guisan J.M., Fernández-Lafuente R. Resolution of paroxetine precursor using different lipases. Influence of the reaction conditions on the enantioselectivity of lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2004. 34:264-269.

Ferrer M., Plou F.J., Nuero O.M., Reyes F., Ballesteros A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2000. 75: 569-576.

Filho M., Pessela B.C., Mateo C., Carrascosa A.V., Fernandez-Lafuente R., Guisán J.M. Immobilization–stabilization of an α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. *Enzyme Microb. Technol.* 2008. 42: 265–271.

Fischer B.E., Kleber H.P. Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. *J. Basic Microbiol.* 1987. 27: 427-432.

Fuciños P., Abadín C.M., Sanromán A., Longo M.A., Pastrana L., Rúa M.L. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. *J. Biotechnol.* 2005. 117: 233–241.

G

George E., Tamerler C., Martínez A., Martínez M.J., Keshavarz T. Influence of growth medium composition on the lipolytic enzyme activity of *Ophiostoma piliferum* (Cartapip™). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1999. 74: 137-140.

Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron.* 2007. 63: 1721–1754.

Guisán J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme. Microb. Technol.* 1988. 10: 375-382.

Goldstein L. Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Methods Enzymol.* 1976. 44: 397-443.

Gombert A.K., Pinto A.L., Castilho L.R., Freire D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem.* 1999. 35: 85–90.

Gorokhova I.V., Ivanov A.E., Zubov V.P. Coprecipitation of *Pseudomonas fluorescens* lipase with hydrophobic compounds as an approach to its immobilization for catalysis in nonaqueous media. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2002. 28: 38–43.

Graber M., Bousquet-Dubouch M.P., Sousa N., Lamare S., Legoy M.D. Water plays a different role on activation thermodynamic parameters of alcoholysis reaction catalyzed by lipase in gaseous and organic media. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. 1645: 56-62.

Gryglewicz S. Lipase catalysed synthesis of sebacic and phtalic esters. *Enzyme Microb. Technol.* 2003. 33: 952-957.

Gulati R., Saxena R.K., Gupta R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. *Process Biochem.* 2000. 36: 149-155.

Gupta M.N., Batra R., Tyagi R., Sharma A.. Polarity index: The guiding solvent parameter for enzyme stability in aqueous-organic cosolvent mixtures. *Biotechnol. Prog.* 1997. 13: 284-288.

Gutarra M.L.E., Godoy M.G., Castilho L.R., Freire D.M.G. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007. 82: 313–318.

H

Haki G.D., Rakshit S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technol.* 2003. 89: 17-34.

Hama S., Tamalampudi S., Shindo N., Numata T., Yamaji H., Fukuda H., Kondo A. Role of N-terminal 28-amino-acid region of *Rhizopus oryzae* lipase in directing proteins to secretory pathway of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. 79: 1009–1018.

Han S., Back J., Yoon M., Shin P., Cheong C., Sung M., Hong S., Chung I., Han Y. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter species* SY-01. *Biochimie*. 2003. 85: 501–510.

Hartmeier W. Immobilized biocatalysts: From simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* 1985. 3: 149-153.

Hasan F., Shah A.A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 2006. 39: 235-251.

Hasan F., Shah A.A., Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 2009. 27: 782–798.

Hatzinikolaou D., Macris J.B., Christakopoulos P., Kekos D., Kolisis F.N., Fountoukidis G. Production and partial characterization of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 1996. 18: 547-552.

Helistö P., Korpela T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb. Technol.* 1998. 23: 113–7.

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

Hita E., Robles A., Camacho B., González P.A., Esteban L., Jiménez M.J., Munio M.M., Molina E. Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor. *Biochem. Eng. J.* 2009. 46: 257-264.

Hölker U., Höfer M., Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. 64: 175-186.

Huge-Jensen B., Gaialuzzo D.R., Jensen R.G. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *Lipids*. 1987. 22: 559-565.

Huisman G.W., Gray D. Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. 13:352-358.

I

Ibrik A., Chahinian H., Rugani N., Sarda L., Comeau L.C. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. 1998. *Lipids*. 33:377-384.

Iftikhar T., Hussain A. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A kinetic study. *Biotechnol.* 2002. 1: 15-20.

Imandi S.B., Karanam S.K., Garapati H.R. Optimization of process parameters for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from niger seed oil cake (*Guizotia abyssinica*). *J. Microb. Biochem. Technol.* 2010. 2: 28-33.

Isobe K., Nokihara K., Yamaguchi S., Mase T., Schmid R.D. Crystallization and characterization of monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii*. *Eur J Biochem.* 1992. 203: 233-237.

J

Jaeger K.E., Reetz M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998, 16: 396-403.

Jonzo M.D., Hiol A., Zagol I., Druet D., Comeau L.C. Concentrates of DHA from fish oil by selective esterification of cholesterol by immobilized isoforms of lipase from *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 2000. 27: 443-450.

K

Kanwar L., Goswami P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme Microb. Technol.* 2002. 31: 727–735.

Kennedy J.F.; Cabral J.M.S. *Solid Phase Biochemistry*. Ed. Wiley Pub. New York. 1983.

Khmelnitsky Y., Rich O.J. Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999. 3: 47-53.

Kikkawa S., Takahashi K., Katada T., Inada Y. Esterification of chiral secondary alcohols with fatty acid in organic solvents by polyethylene glycol-modified lipase. *Biochem. Int.* 1989. 19: 1125-1131.

Kirk O., Christensen M.W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.* 2002. 6: 446-451.

Kordel M., Hofmann B., Schomburg D., Schmid R.D. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.* 1991. 173: 4836-4841.

Krieger N., Bhatnagar T., Baratti C.J., Baron M.A., de Lima M.V., Mitchell D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* 2004. 42: 279-286.

Krishna C., Solid-state fermentation systems—An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2005. 25:1–30.

Kwon D.Y., Rhee J.S. A simple a rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *JAOCS.* 1986. 63: 89–92.

L

Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 1987. 30: 81-87.

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

Li C.Y., Cheng C.Y., Chen T.L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* 2001. 29: 258-263.

Lima V.M., Krieger N., Mitchell D.A., Baratti J.C., Filippis I., Fontana J. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2004a. 31: 53-61.

Lima V.M., Krieger N., Mitchell D.A., Fontana J. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng. J.* 2004b. 18: 65-71.

Lima V.M., Krieger N., Sarquis M.I.M., Mitchell D.A., Ramos L.P., Fontana J.D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol. Biotechnol.* 2003. 41:105-110.

Lin S.F., Chiou C.M., Tsai Y.C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Lett.* 1995. 17: 959-962.

Liu Z., Li X., Chi Z., Wang L., Li J., Wang X. Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern. *Anton. Leeuw.* 2008. 94: 245-255.

Long K., Ghazali H.M., Ariff A., Ampon K., Bucke C. Mycellium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* link: Pattern and factors involved on its production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1996. 67: 157-163.

López F.C., Darse K.R. Rossky J.P. Mechanistic elements of protein cold denaturation. *J. Phys. Chem. B.* 2008. 112: 5961-5967.

López-Gallego F., Betancor L., Mateo C., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde cross-linking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* 2005. 119: 70–75.

Lowry R.R., Tinsley I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1976. 53: 470-472.

M

Mahadik N.D., Puntambekar U.S., Bastawde K.B., Khire J.M., Gokhale D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem.* 2002. 38: 715-721.

Malcata F.X., Reyes H.R., García H.S., Hill C.G., Amundson C.H. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 1992. 14: 426-446.

Maliszewska I., Mastalerz P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. *Enzyme Microb. Technol.* 1992. 14: 190-193.

Martinek K., Mozhaev V.V. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. *Adv. Enzymol.* 1987. 57: 179-249.

Martínez-Ruíz A., García H.S., Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008. 151: 393–401.

Mase T., Matsumiya Y., Matsuura A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM-7268 lipase. *Biosci. Biotech. Bioch.* 1995. 59: 329-330.

Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 2007. 40(6): 1451-1463.

Mateos Diaz J.C., Rodríguez J.A., Roussos S., Córdova J., Abousalham A., Carriere F., Baratti J.. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microb. Technol.* 2006. 39(5):1042-1050.

McCabe R.W., Rodger A., Taylor A. A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. *Enzyme Microb. Technol.* 2005. 36: 70-74.

Mendes A.A., Rodrigues D.S., Filice M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Palomo J.M. Regioselective monohydrolysis of per-O-acetylated-1-substituted- β -glucopyranosides catalyzed by immobilized lipases. *Tetrahedron.* 2008. 64: 10721–10727.

Mingarro Y., Abad C., Braco L. Interfacial activation based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. 92: 3308-3312.

Mittal S., Khanna S., Roy A., Bharatama P.V., Chawlac H.P.S. *Candida rugosa* lipase mediated multigram synthesis of acid part of *S(+)*-atliprofen, a new NSAID and molecular modeling studies aimed at predicting selectivity of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 2005. 36: 232–238.

Moreau B., Lognay G.C., Blecker Ch., Brohée J.Ch. Synthesis of novel D-glucuronic acid fatty esters using *Candida Antarctica* lipase in *tert*-butanol. *Biotechnol. Lett.* 2004. 26: 419–424.

N

Nagy V., Tóke E.R., Keong L.C., Sztatker G., Ibrahim D., Omar I.C., Szakács G., Poppe L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2006. 39: 141-148.

Novozymes A/S, Ficha de datos del producto: Lipozyme[®] RM IM. Versión 6 p.

Nurok D., Kleye R.M., Muhoberac B.B., Frost M.C., Hajdu P., Robertson D.H., Kamat S.V., Russell A.J.. Study of enzyme-catalyzed reactions in organic solvents using multiple linear regression. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 1999. 7: 273–282.

O

Oostra J., le Comte E.P., van den Heuvel J.C., Tramper J., Rinzema A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 2001. 75(1): 13-24.

P

Palomo C.J.M. Tesis de Doctorado. Control y modulación de la selectividad de derivados inmovilizados de distintas lipasas, en reacciones de química orgánica desarrolladas en sistemas macro-acuosos. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Orgánica. 2003. Madrid. España.

Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Adv. Synth. Catal.* 2007. 349: 1119–1127.

Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Mateo C., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb. Tech.* 2002. 31: 775–783.

Palomo J.M., Fuentes M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. General trend of lipase to self-assemble living bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules.* 2003b. 4:1–6.

Palomo J.M., Peña, M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Pisabarro A.G., Fernández-Lafuente R., Ramirez L., Guisan J.M. Solid phase handling of hydrophobins: A new tool to study lipases. *Biomacromolecules.* 2003c. 4: 204-210.

Palomo J.M., Segura R.L., Fernández-Lorente G., Pernas M., Rúa M.L., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. Purification, immobilization and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol. Prog.* 2004a. 20: 630-635.

Palomo J.M., Segura R.L., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. *Biomacromolecules.* 2004b. 5: 249-254.

Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T. The realm of microbial lipases for biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999. 29:119-131.

Pandey A., Zoccol C.R., Rodríguez-León J.A., Nigam P. Solid state fermentation in Biotechnology: Fundamentals and applications. first ed., Asiatech Publishers, Inc. 2001. pp. 25.

Passicos E., Santarelli X., Coulon D. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnol. Lett.* 2004. 26: 1073–1076.

Pastorino L., Pioli F., Zilli M., Converti A., Nicolini C. Lipase-catalyzed degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Enzyme Microb. Technol.* 2004. 35: 321–326.

Pencreac'h G., Baratti J.C. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia*: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme Microb. Tech.* 1996. 18: 417-422.

Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrel J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999. 20: 3551-3567.

Pernas M.A., López C., Pastrana L., Rúa M.L. Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *J. Biotechnol.* 2000. 84: 163–174.

Pernas M.A., López C., Rúa M.L., Hermoso J. Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. FEBS. Lett. 2001. 501: 87-91.

Pliega F.M., Kochetkov K.A., Singh I., Parmar V.S., Belokon Y.N., Lozinsky V.I. Immobilization of hog pancreas lipase in macroporous poly(vinylalcohol)-cryogel carrier for the biocatalysis in water-poor media. Biotechnol. Lett. 2000. 22: 551–554.

Pogorevc M., Stecher H., Faber K. A caveat for the use of log P values for the assessment of the biocompatibility of organic solvents. Biotechnol. Lett. 2007. 24: 857–860.

R

Ramesh M., Girish B., Mahalingeshwara K.B. Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. Microbiol. Mol. Biol. R. 2000. 64: 461-488.

Rathi P., Sapna B., Sexena R., Gupta R. A hyperthermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. Biotechnol. Lett. 2000. 22: 495-498.

Rivera-Muñoz G., Tinoco-Valencia J.R., Sánchez S., Farrés A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. Biotechnol. Lett. 1991. 13:277–280.

Rehm S., Trodler P., Pleiss J. Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. Protein Sci. 2010. 19: 2122-2130.

Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Millar R. Lipases at interfaces: A review. Adv. Colloid Interface Sci. 2009. 147-148: 237–250.

Rodríguez J.A., Mateos J.C., Nungaray J., González V., Bhagnagar T., Roussos S., Córdova J., Baratti J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. Process Biochem. 2006. 41: 2264–2269.

Rohit S., Yusuf C., Uttam C.B. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 2001. 19: 627-662.

S

Salis A., Pinna M., Monduzzi M., Solinas V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel síntesis. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2008. 54: 19-26.

Sánchez V.M., Rebolledo F., Gotor V. *Candida antarctica* Lipase-catalyzed doubly enantioselective aminolysis reactions. Chemoenzymatic synthesis of 3-Hydroxypyrrolidines and 4-(silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers. *J. Org. Chem.* 1999. 64: 1464-1470.

Sandana M.J.G., Takeuchi S. Understanding structural features of microbial lipases - An overview. 2008. *Anal. Chem. Ins.* 3: 9–19.

Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M.R., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S., Dufour D., Raimbault M. On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem.* 1994. 29: 13-24.

Schmid A., Hollmann F., Byung P.J., Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. 13: 359-366.

Schmid R.D., Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998. 37: 1608 – 1633.

Sellek, G.A., Chaudhuri, J.B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme Microb. Tech.* 1999. 25: 471-482.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996. 68: 850-858.

Slotema W.F., Sandoval G., Guieysse D., Straathof A.J.J., Marty J. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia. *Biotechnol. Bioeng.* 2003. 82: 664–669.

Smallwood I.M. *Handbook of organic solvent properties*. First ed., Arnold, London, 1996.

Snellman E., Sullivan E., Colwell R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem.* 2002. 269: 5771–5779.

Stöcklein W., Sztajer H., Menge U., Schmid R.D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. 1168: 181-189.

Straathof A., Panke S., Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. 13: 548-556.

Sugihara A., Shimada Y., Takada N., Nagao T., Tominaga T. *Penicillium abeanum* lipase: Purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. *J. Ferment. Bioeng.* 1996. 82: 498-501.

Sulong M.R., Abd Rahman R.N.Z.R., Salleh A.B., Basri M. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Protein Expr. Purif.* 2006. 49: 190–195.

Suzuki M., Yamamoto H., Mizugaki M. Purification and general properties of a metal—insensitive lipase from *Rhizopus japonicus* NR. 400. *J. Biochem.* 1986. 100: 1207–1213.

Szczęsna-Antczak M., Antczak T., Piotrowicz-Wasiak M., Rzyńska M., Binkowska N., Bielecki S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. *Enzyme Microb. Tech.* 2006. 39: 1214–1222.

Sztajer H., Liinsdorf H., Erdmann H., Menge U., Schmid R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. 1124: 253-261.

Sztajer H., Maliszewska J. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol Lett.* 1989. 11: 895-898.

T

Talukder M.M.R., Tamalampudy S., Li C.J., Yanglin L., Wu J., Kondo A., Fukuda H. An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. *Biochem. Eng. J.* 2007. 33: 60–65.

Tejeda M.A., Montesinos C.R.M., Guzmán Z.R. Secado. En: *Bioseparaciones*. UNISON. Hermosillo, Sonora, México. 1995.

Therisod M., Klibanov A.M. Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 1987. 109: 3977-3981.

Tjosås F., Anthonsen T., Egholm J.E. Biocatalytic resolution of saphenic acid. Substrate preferences for lipases A and B from *Candida antarctica*. *ARKIVOC*. 2008. 6: 81-90.

Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M.A., Di Luccio M., Oliveira J.V. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 2010. 3: 182–196.

Turner N.A., Vulfson E.N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. *Enzyme Microb. Technol.* 2000. 27: 108-113.

U

Ueda M., Takahashi S., Washida M., Shiraga S., Tanaka A. Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2002. 17: 113–124.

ul-Haq I., Idrees S., Rajoka I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochem.* 2002. 37: 637-641.

V

Valero F., Río J.L., del Poch M., Sola, C. Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. J. Ferment. Bioeng. 1991. 72: 399-401.

Valivety R.H., Johnston G.A., Suckling C.J., Halling P.J. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. Biotechnol. Bioeng. 1991. 38: 1137-1143.

van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. Curr. Opin. Microbiol. 2003. 6: 213-218.

Van Etten J.L., Bulla L.A., St. Julian G. Physiological and morphological correlation of *Rhizopus stolonifer* spore germination. J. Bacteriol. 1974. 117: 882-887.

Vieille C., Zeikus G.J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. R. 2001. 65: 1-43.

Vorderw lbecke T., Kieslich K., Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays. Enzyme Microb. Technol. 1992. 14: 631-639.

W

Wade Jr L.G., Organic Chemistry, Pearson Prentice Hall, fifth ed., Madrid, 2004.

Wangikar P.P., Michels P.C., Clark D.S., Dordick J.S. Structure and function of subtilisin BPN' solubilized in organic solvents. J. Am. Chem. Soc. 1997. 119: 70-76.

Wei, D., Gu, Ch., Song, Q. and Su, W. Enzymatic esterification for glycoside lactate synthesis in organic solvent. Enzyme Microb. Technol. 2003. 33: 508-512.

Wu J.C., Lee S.S., Mahmood M.M.B., Chow Y., Talukder M.M.R., Choi W.J. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. J. Mol. Cat. B: Enzym. 2007. 45: 108-112.

X

Xu Y., Wang D., Mu X.Q., Zhao G.A., Zhang K.Ch. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2002. 18: 29–37.

Y

Yang G., Wu J., Xu G., Yang L. Enhancement of the activity and enantioselectivity of lipase in organic systems by immobilization onto low-cost support. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 2009. 57: 96–103.

Yang L., Dordick J.S., Garde S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophys. J.* 2004. 87: 812-821.

Yasuda M., Ogino H., Kiguchi T., Kotani T., Takakura S., Ishibashi T., Nakashima T., Fukuda H., Ishikawa H. Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. *J. Ferment. Bioeng.* 2000. 88: 571–573.

Yu H., Wu J., Ching C.B. Enhanced activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized on macroporous adsorptive resins for ibuprofen resolution. *Biotechnol. Lett.* 2004. 26: 629–633.

Z

Zaks A., Klivanov A.M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* 1988. 263: 3194-3201.

Zaks A., Klivanov A.M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. 82: 3192-3196.

Anexos



ANEXO A

Resultados de la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y el gen 28S del rARN Laboratorio de Biotecnología Industrial. Centro de Biotecnología Genómica - IPN

I. Código de la cepa: 9a

ID Genbank: AY803935.1

Por ITS:

Rhizopus microsporus var. *rhizopodiformis* strain NRBC 32997 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Total score 1971, Max. ident. 99%.

Por 28S:

Not reported

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

GTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCC
ATGGCGCCGGGAATTCGATTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACATAATGTATTGG
CACTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAA
GGTCGTAACCTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTGTTCTG
GGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCCTTTGGGAAGGAAGGTGCCTGGTACCC
TTTACCATATAACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACCTTTTAACAATGGAT
CTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATT
CGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCTATAGAGTACGCTTGC
TTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGATGGACAAGCTCGGTTA
AATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAATTAACGAA
CTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGGCCAACCAAAAACATATAATCTAGGGGTTCTGCTAGC
CAGAAGATATTTAATGATCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGGGGGACTACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCATAT

GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTT
GGCGTAATCATGGTCA

II. Código de la cepa: 13b

ID Genbank: DQ641312.1

Por ITS:

Rhizopus microsporus var. *oligosporus* strain R-47 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Max. score 634, Max. ident. 83%.

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

AGTGAATGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCC
ATGGCGGCGCGGGAATTCGATTTCCGTAGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAATGTATC
GGCACTTTACTGGGAGAGGGGGGATTCATCCTCTCCTCCTGGTATTGTTTGCTCCTATACTG
TGAATCTCTGGCGATGAAGGTTTCGGTTGTTGTTATGAATGATGACTGAACCTTTGGGAGAGA
CTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTGTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAAATCAGGT
GTGCCTTGTGTACACCTGGTACCCTTTGCCATATACTATGAATTCAGGAATTTAAAAAGTTTA
AAAAAAAAAACAACCTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAA
GTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACT
CTATGGATCTTCTATAGAGTACGCTTGCTTCAGTATCATAACAAACCCACACATAAAAATCTT
TTTTTTTTTATGTGGTGATGGGCAAGTTCGGCGGCCAGTAATATTATTATTGCTTGCTGCTG
ATTGCCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTCTCGCATCGAATTACGAACTACCTAGCCATCGTG
CCTTTTTTGGTCCAAAAAACCAAAAAACGTAAACCTAGGGGGTTCTGCCAGCCAGCAGATA
TTTGCATGCCTTCTCAACTATGATCTGAAGTCAAGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGC
TCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCT

Secuencia 26S

Not reported

III. Código de la cepa: 19

ID Genbank: EF151442.1

Por ITS:

Rhizopus microsporus isolate F17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence, Max. score 1160, Max. ident. 97%.

Por 28S:

Rhizopus microsporus var. *tuberosus* strain BCRC 33955 28S ribosomal RNA gene, partial sequence identities = 576/576 (100%).

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

ATTTATTGGCCTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTG
GGAAAAGGTCGTAACCTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATTAATGGGTAGGCC
TGTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGCAGGTGCCT
GGTACCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACCTTTTAAC
AATGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATT
GCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCTATAGAGTA
CGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAAATTTATTTTATGTGGTGATGGACAAGC
TCGGTTAAATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAA
TTACRAACTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAACATATAATCTAGGGGTTT
TGCTAGCCAGCAGATATTTTAATGATCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGTGGGACTACCCGC
TGAACCTAAGCATATCATAACGGGGGAAAAAAGTCTTTAACTAATGTATTGGCACTTTACTG
GGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAAGGTCGTAAC
TACCTTTTCGGAGAACTCAGGAAA

Secuencia 26S

TCWCAATTCGGGTTGTACGGCGAGTGACAGGAAAGCTCAAAGTTGGAACCTGTTTGGCCTAGC
TAAACCGGATTGTAACTGTAGAAGTGTTCAGGCAAGCCGGACCGATAAGTCCTTTGGAA
CAGGGCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTCGGTCTGAGCATTTGCCTTTTGCGATACT
TTCAAAGAGTCAGGTTGTTTGGGAATGCAGCCTAAATGGGTGGTAAATCTCACCTAAAGCTA

AATATTGGCGAGAAACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAA
AGAGAGTTAAACAGTATGTGAAATTGTTAAAAGGGAACCGTTTGGAGCCAGACTGGCTTGTCT
GTAATCAGTCTAAGCTTCGGCTTGGATGCACTTGCAGGCTATGCCTGCCAACGACAATTTGGC
TTGAGGGAAAAAACTAAGGGAAATGTGGCCCATCCGTGGGTGTTATAGTCCCTTAGAAAATAC
CTTGGGCTGGATTGAGGTACGCAGCGAATGCTATTTGGCGAGTTGGCTGGGAATATTTTCTGA
GGTGCTTTGGTACTGAGGTTGATATTCCTAGTTACACTTCTATTTCGCTTAGGTTGTTGGCTTA
ATGACTCTAAATGACCCGTCTAAAACCCGGGCCAAA

IV. Código de la cepa: 23a

ID Genbank: DQ119001.1

Por ITS:

Rhizomucor pusillus ATCC 36606 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Max. score 1007, Max. ident. 97%.

Por 28S:

Rhizomucor pusillus NRRL28626 28S ribosomal RNA gene, partial sequence identities = 544/548 (**99%**).

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

CAAAGGTTGGGAATCGTGGTGACTCTATTGGTGAGCCGCGATTCTCTCCTTTTTGTGAAATGT
TCTGAGGGAGGATACAGATCTCTCGACCTTTTATTTTACATATTTGAGAGACTGTTGTTTAAAC
AAATTGAAAGTTTTGGATCAGAAATGATTCAAGACGATAAAATTTCAAACAACCTTCTCACCA
ATGGATCACTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGTAGCAAATTGCGAAAAGTAATGCGATCTG
CAGCCTTTGCGAATCATCGAATTCTCGAACGCACCTTGCACCCTTTGGTTCATCCATTGGGTA
CGTCTAGTTCAGTATCTTTATTAACCCCTAAAGGTTTATTTTTTGATAAATCTTTGGATTTGC
GGTGCTGATGGATTTTCATCCGTTCAAGCTACCCTTACAATTTGTATGTTGTTGACCCTTGAT
ATTTCCCTTGAGGGCTTGCATTGGTATCTAATTTTTTACCAGTGTGCTTCGAGATGATCAAGTA
TAAAGGTCAATCAACCACAAATAAATTTCAACTATGGATCTGAACTTAGATGGGATTACCCGC
TGAACCTAAGCATATCAATAAGGCGGGAAGGGTCTTTAAAAGGTTGTGGAAATCGTGGTGAC

CTCTATTGGTGAGCCGCGATTCTCTCCTTTTTGGTAAAAGGTTCGAAGGGATTCTTCAGATCT
TTTGACCTTTTTTTTTTCAAATTTGATTGATGGTGGTTTACA

Secuencia 26S

AACATACCCTTAGTAGCGGCGAGCGAGTGGGTAAGCTCAAGTTTAAAACCTGTTTGCCTAGA
CAAACCTTATTGTAAACTAAGGACGTGCTATCCAGGCTCTTTGGACCTTCAAGTCCTTTGGAA
TAAGGCTTCACAGAGGGTGACAATCCCGTAGAGGGTCTTGAAAGAGTCTATTGCGATGCATGC
TCCAAGAGTCAGGTTGTTTGGGAATGCAGCCTAAAGTGGGAGGTAAATCCCTCCTAAAGCTAA
ATATTGGCGAGAGACCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGGACTTTGAAAA
GAGAGTCAAAGTACGTGAAATTGCTTAAAGGGAAGCGTTTGGAGCTAGTTTGGCTAGTCTGT
TATCAGCCTGAGCTTCGGCTTTGGTGTACTATCAGGCTATTTGCCGGCCAACTTTCAGGATTG
GAAGGAAAGCTTAGTGCTTTGGAGTCTAAAGAGACCTTTGCGGAAGCCTCTGGTGGAGCGTTG
GTCTGCCTTGCCCTTCTGAACCTATAGTTGGCTTAATGGCTCTAAACGGCCCGTCTTGAAAC
GGCGGACAA

V. Código de la cepa: 43a

ID Genbank: AF115732.1

Por ITS:

Rhizopus microsporus var. *chinensis* 18S ribosomal RNA gene partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence. Max score 688, Max. ident. 87%.

Por 28S:

Not reported

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

AAAAACAAAGTTTGGGCCTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCCTTCTATACTGTGA
ACCTCTGGACAGTAAGGACGTAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATAAAGGTAATAATG
GGTAGGCCTGTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAACCT
CAGGTGCCTGGTCCCCTTTACCATATAACATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACA
ACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCTCATCGATGAAAACATAACCAAARTGCGATAACTA

GTGTGAATTGCATATTCGTGAATCTTCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCAATCTATGGATCTTC
TATAGAGAACGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCTCATATTAATTTTTTGGGAGAGGGGA
TGGACAACCTCCCGTTACAAATAATTAATAACCRCTTGGCTAAAATAACCCTCCTTGTAAT
TCGTTAAACCACTAACCACCTATACCCCGGGTTTTTAGGACCAAACCAAAAAAAAAAATTAT
CTAGGGGGGGTGCCAGCCAGGAAATATTTTATATTTCTTTAAATATCCTCAGAAGGGGGGGG
GGGATTTCCCCCTGATCTTTCCCCCAGTTATTTCCCCCGGAGAGAAA

VI. Código de la cepa: 56c

ID Genbank

Por ITS:

Rhizopus microsporus ATCC 14050 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence, identities = 348/348 (100%).

Por 28S:

Not reported

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

AAAAAGGTTTTGGGGCCCTTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTG
AACCTCTGGAGAGAAGGTAGRAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATAAATGCTAAAATG
GGTAGGCCTGTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCCTTTGGGAATCT
TGGTGCCTGGTACCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAA
CTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGGGATAACTAG
TGTGAATTGCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCT
ATAGAGTACGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGAT
GGACAAGCTCGGTTAAATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTT
TCATTAAATTACGAACTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAACATATAATCT
AGGGGTTCTGCTAGCCAGCAGATATTTTAATGATCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGTGGGA
CTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGGAGGGAAAGGACATTAACATAATGTATTGG
CACTTTACTGGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTTCT

ANEXO B

Tamizado de los soportes sólidos inertes para la fermentación en medio sólido

Los soportes sólidos inertes (espuma de poliuretano y agrolita expandida) fueron tamizados como se muestra en la Figura AA.1.

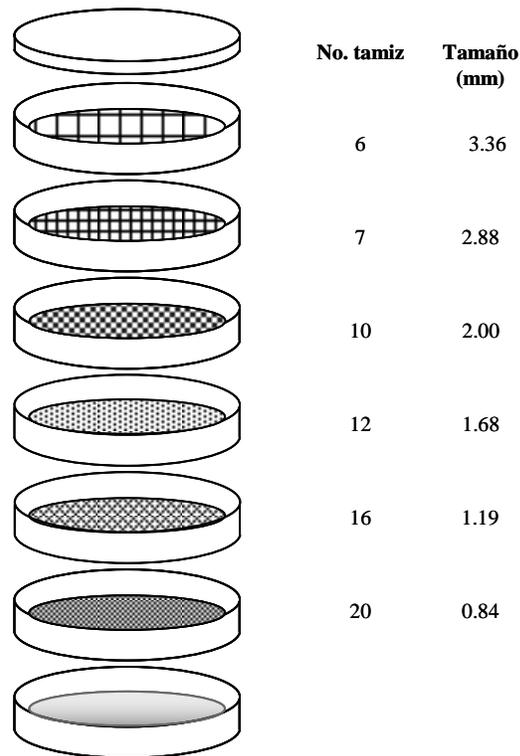


Figura AB.1 Secuencia de mallas para tamizado de soportes sólidos inertes

En un primer experimento se evaluó el tamaño de partícula sobre el crecimiento y la producción de actividad lipasa, empleando como soporte sólido inerte la espuma de poliuretano (PUF). Los tamaños evaluados fueron: 1) 1.68-2.88 mm, material retenido en tamices 10 y 12, y 2) 0.84-2.0 mm, material retenido en tamices 12, 16 y 20. Posteriormente, para evaluar el tipo de soporte inerte sobre las variables antes mencionadas se empleó un tamaño de partícula de 0.84-2.0 mm.

ANEXO C

Curva estándar de *p*-nitrofenol ($\lambda = 410 \text{ nm}$, pH 8, 45 °C)

Se preparó una solución 11 mM de *p*-nitrofenol (*p*NF) en *i*-propanol y se prepararon por duplicado las diluciones que se indican en la Tabla AC.1.

Tabla AC.1 Diluciones para elaborar la curva estándar de *p*-nitrofenol a pH 8

Tubo	Solución 1.1 mM <i>p</i> NF (mL)	<i>i</i> -propanol (mL)	[<i>p</i> NF] ($\mu\text{mol/mL}$)
1	0.000	0.270	0.000
2	0.011	0.259	0.004
3	0.022	0.248	0.008
4	0.054	0.216	0.020
5	0.162	0.108	0.060
6	0.270	0.000	0.100

Posteriormente, se adicionó a cada tubo 2.73 mL de una solución amortiguadora 100 mM Tris-HCl , pH 8.0 (a 45 °C), 20 mM CaCl₂ y 0.25% (p/v) alcohol polivinílico (APV). Los tubos fueron agitados en vortex durante 10 s, incubados a 45 °C por 15 min y se midió la absorbancia de las muestras a 410 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU® UV-160). Los valores obtenidos de absorbancia *versus* concentración de *p*NF ($\mu\text{mol/mL}$) se graficaron y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple. A partir de la pendiente se determinó el coeficiente de extinción molar ($\omega = 15.783 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) del *p*NF.

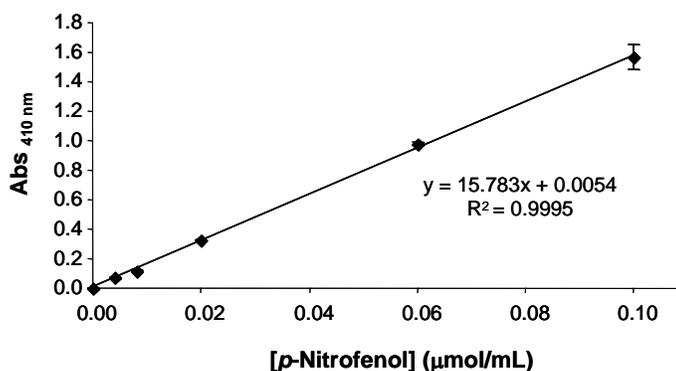


Figura AC.1 Curva estándar de *p*-nitrofenol a pH 8

ANEXO D

Curva estándar de ácido oleico

Se preparó una solución 20 mM de ácido oleico en n-heptano y se prepararon por duplicado las diluciones que se indican en la Tabla AD.1.

Tabla AD.1 Diluciones para elaborar la curva estándar de ácido oleico

Tubo	<i>n</i> -Heptano (mL)	20 mM ác. oleico (mL)	[ácido oleico] (mM)
1	2.5	0.0	0.0
2	2.0	0.5	4.0
3	1.5	1.0	8.0
4	1.0	1.5	12.0
5	0.5	2.0	16.0
6	0.0	2.5	20.0

Posteriormente, se adicionó a cada tubo 0.5 mL de una solución Acetato de cobre-Piridina 50 g/L, pH 6.1, seguido de agitación en vortex por 30. Posteriormente, se midió la absorbancia a 715 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU® UV-160), cuyos valores se graficaron *versus* concentración de ácido oleico (mM) y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple.

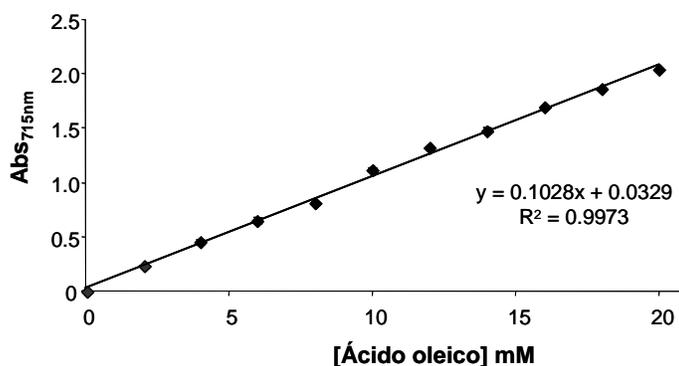


Figura AD.1 Curva estándar de ácido oleico

ANEXO E

Curva estándar de *p*-nitrofenol ($\lambda = 348 \text{ nm}$, pH 7, 25 °C)

Se preparó una solución 11 mM de *p*-Nitrofenol (*p*NF) en *i*-propanol y se prepararon por duplicado las diluciones que se indican en la Tabla AC.1.

Tabla AE.1 Diluciones para elaborar la curva estándar de *p*-nitrofenol a pH 7

Tubo	Solución 1.1 mM <i>p</i> NF (mL)	<i>i</i> -propanol (mL)	[<i>p</i> NF] ($\mu\text{mol/mL}$)
1	0.000	0.270	0.000
2	0.011	0.259	0.004
3	0.022	0.248	0.008
4	0.054	0.216	0.020
5	0.162	0.108	0.060
6	0.270	0.000	0.100

Posteriormente, se adicionó a cada tubo 2.73 mL de una solución amortiguadora 100 mM Tris-HCl , pH 8.0 (a 45 °C), 20 mM CaCl₂ y 0.25% (p/v) alcohol polivinílico (APV). Los tubos fueron agitados en vortex durante 10 s, incubados a 45 °C por 15 min y se midió la absorbancia de las muestras a 410 nm en un espectrofotómetro (SHIMADZU® UV-160). Los valores obtenidos de absorbancia *versus* concentración de *p*NF ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) se graficaron y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple. A partir de la pendiente se determinó el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 6.8289 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$).

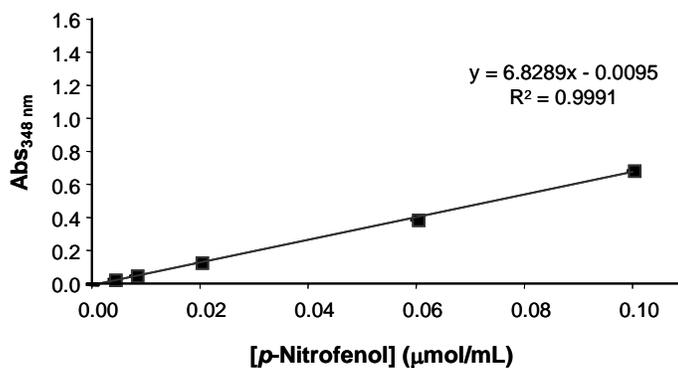


Figura AE.1. Curva estándar de *p*-nitrofenol a pH 7

ANEXO F

Reactivos para la digestión triptica

1. **Solución desteñidora:** 50% (v/v) metanol / 5% (v/v) ácido acético en agua. 10 mL de metanol, 1 mL de ácido acético y 9 mL de agua.
2. **Bicarbonato de amonio 100 mM:** Disolver 0.158 g de NH_4HCO_3 en 20 mL de agua.
3. **Bicarbonato de amonio 50 mM:** Disolver 0.079 g de NH_4HCO_3 en 20 mL de agua.
4. **Acetonitrilo (CH_3CN)**
5. **Ditriotreitol (DTT) 10 mM:** Disolver 0.015 g de DTT en 10 mL de 100 mM NH_4HCO_3 .
6. **Iodoacetamida 55 mM:** Disolver 0.1 g de Iodoacetamida en 10 mL de 100 mM NH_4HCO_3 .
7. **Solución de Tripsina (20 ng/ μL):** 20 μg de Tripsina (Promega, Wisconsin, EUA) en 1000 μL de una solución 50 mM NH_4HCO_3 (4 °C).
8. **Solución de extracción:** Ácido fórmico 5% (v/v) en 50% (v/v) CH_3CN .
9. **Viales para microcentrífuga:** Todos viales fueron enjuagados con agua, etanol, agua, etanol para la remoción de material soluble en acetonitrilo que pudiera interferir durante los procesos de evaporación.

ANEXO G

Resultados de análisis estadísticos

Efecto del contenido de humedad inicial sobre los parámetros de crecimiento de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* en fermentación en medio sólido

A continuación se presentan los resultados de los análisis de varianza (ANOVA), así como las pruebas de diferencia de medias de Duncan, obtenidas con ayuda del paquete estadístico NCSS (2000).

Efecto del contenido de humedad inicial sobre la tasa específica de crecimiento (μ)

Response μ

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Humedad_inicial	1	5.83E-04	5.83E-04	0.33	0.622764	0.065245
S	2	3.52E-03	1.76E-03			
Total (Adjusted)	3	4.10E-03				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de μ a diferentes contenidos de humedad inicial en la materia de fermentación.

Efecto del contenido de humedad inicial sobre la fase *lag*

Response *fase lag*

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Humedad_inicial	1	25.78354	25.78354	20.56	0.045352*	0.651344
S	2	2.507939	1.25397			
Total (Adjusted)	3	28.29148				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre la duración de la fase *lag* a diferentes contenidos de humedad inicial en la material de fermentación.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: fase lag

Term A: Humedad_inicial

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=2 MSE=1.25397

Group	Count	Mean	Different From Groups
65	2	4.0853	55
55	2	9.16305	65

Conclusión: La duración de la fase lag se incrementa al disminuir el contenido de humedad inicial del medio de cultivo.

Efecto del contenido de humedad inicial sobre la actividad lipasa

Response U_gms

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
Term						
A: Humedad_inicial	1	0.39125	0.39125	0.19	0.704909	0.058794
S	2	4.10182	2.05091			
Total (Adjusted)	3	4.49307				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de actividad lipasa obtenidos a diferentes contenidos de humedad inicial en la materia de fermentación.

Efecto del tamaño de partícula y tipo de soporte inerte sobre el crecimiento de *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* en fermentación en medio sólido y sobre la producción de lipasas

Efecto del tamaño de partícula sobre la tasa específica de crecimiento (μ)

Response μ

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
Term						
A: Tamaño de partícula	1	1.03E-03	1.03E-03	0.41	0.588709	0.068673
S	2	0.0050609	2.53E-03			
Total (Adjusted)	3	6.09E-03				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de μ empleando diferentes tamaños de partícula.

Efecto del tamaño de partícula sobre la fase *lag*

Response **fase lag**

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tamaño de partícula	1	0.5486365	0.5486365	0.17	0.720297	0.057829
S	2	6.464128	3.232064			
Total (Adjusted)	3	7.012764				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de la fase *lag* empleando diferentes tamaños de partícula.

Efecto del tamaño de partícula sobre la producción de lipasas en cultivo sólido

Response **Actividad lipasa**

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tamaño de partícula	5	42.72437	8.544873	7.97	0.012597*	0.899578
S	6	6.4324	1.072067			
Total (Adjusted)	11	49.15676				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los valores de actividad lipasa empleando diferentes tamaños de partícula.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad lipasa

Term A: Tamaño de partícula

Alpha=0.050 Error Term=S DF=6 MSE=1.072067

Group	Count	Mean	Different From Groups
28 h-1012	2	4.94	24 h-1012, 20 h-1012
20 h-121620	2	5.54	24 h-1012, 20 h-1012
28 h-121620	2	6.08	20 h-1012
24 h-121620	2	8.42	
24 h-1012	2	9.25	28 h-1012, 20 h-121620
20 h-1012	2	9.78	28 h-1012, 20 h-121620, 28 h-121620

Conclusión: Los mayores títulos de actividad lipasa se obtuvieron al emplear un tamaño de partícula de 0.84-2 mm en un periodo de 20-24 h y un tamaño de partícula de 1.68-2.88 mm en 24 h de fermentación.

Cinética de producción de lipasas en fermentación en medio sólido

Response **Actividad lipase (U/gms)**

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tiempo de fermentación (h)	5	117.5073	23.50147	49.06	0.000087*	1
S	6	2.87415	0.479025			
Total (Adjusted)	11	120.3815				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los valores de la actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad lipasa (U/gms)
 Term A: Tiempo de fermentación (h)
 Alpha=0.050 Error Term=S DF=6 MSE=0.479025

Group	Count	Mean	Different From Groups
0	2	0.01	6, 28, 17, 24, 20
6	2	5.25	0, 17, 24, 20
28	2	6.08	0, 24, 20
17	2	7.555	0, 6, 20
24	2	8.415	0, 6, 28
20	2	9.775	0, 6, 28, 17

Conclusión: La mayor actividad lipasa se produce durante las 20 a 24 h del cultivo.

Efecto del tipo de soporte inerte sobre la tasa específica de crecimiento (μ)

Response **μ**

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Soporte	1	9.00E-03	9.00E-03	3.21	0.215186	0.187513
S	2	5.61E-03	2.80E-03			
Total (Adjusted)	3	1.46E-02				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de μ empleando diferentes tamaños de partícula.

Efecto del tipo de soporte inerte sobre la fase *lag*

Response **fase lag**

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Soporte	1	0.9173809	0.9173809	0.34	0.618257	0.06567
S	2	5.377783	2.688892			
Total (Adjusted)	3	6.295164				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de la fase *lag* empleando diferentes tamaños de partícula.

Efecto del tipo de soporte inerte sobre la actividad lipasa (U/gms)

ANOVA – Efecto del tipo de soporte - 20 h de fermentación

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tiempo-Soporte	1	3.494843	3.494843	112.8	0.008749*	0.996113
S(A)	2	6.20E-02	3.10E-02			
Total (Adjusted)	3	3.55681				
Total	4					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre la actividad lipasa a las 20 h de cultivo empleando diferentes soportes inertes.

ANOVA – Efecto del tipo de soporte - 24 h de fermentación

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tiempo-Soporte	1	4.570021	4.570021	4.3	0.092909	0.390042
S(A)	5	5.32E+00	1.06E+00			
Total (Adjusted)	6	9.888364				
Total	7					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre la actividad lipasa a las 24 h de cultivo empleando diferentes soportes inertes.

ANOVA – Efecto del tipo de soporte - 28 h de fermentación

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Tiempo-Soporte	1	2.829166	2.829166	5.74	0.061935	0.490079
S(A)	5	2.46E+00	4.93E-01			
Total (Adjusted)	6	5.293468				
Total	7					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre la actividad lipasa a las 28 h de cultivo empleando diferentes soportes inertes.

Producción de lipasas inmovilizadas en los sólidos fermentados (Biocatalizadores)

Análisis estadísticos para los valores de μ

Response

μ

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Cepa	6	6.66E-02	1.11E-02	44.03	0,000000*	1
S	13	3.28E-03	2.52E-04			
Total (Adjusted)	19	6.99E-02				
Total	20					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los valores de μ empleando diferentes cepas para la FMS.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: μ

Term A: Cepa

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=13 MSE=2,520301E-04

Group	Count	Mean	Different From Groups
56c	3	0.3608	43a, 19, 23a, 13 b, 9a
13a	2	0.3815	13b, 9a
43a	3	0.4065	56c, 13b, 9a
19	3	0.4146	56c, 13b, 9a
23a	3	0.4193	56c, 13b, 9a
13b	3	0.5002	56c, 13a, 43a, 19, 23a, 9a
9a	3	0.5303	56c, 13a, 43a, 19, 23a, 13b

Análisis estadísticos para los valores de fase lag

Response **fase lag**

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Cepa	6	17.97787	2.996311	1.05	0.430516	0.29258
S	15	42.61699	2.841133			
Total (Adjusted)	21	60.59486				
Total	22					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No existe diferencia significativa entre los valores de la fase lag empleando diferentes cepas para la FMS.

Análisis estadísticos para los valores de actividad lipasa sobre pNFP

Response **Actividad lipasa (pNFP)**

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Cepa	5	726.9027	145.3806	142.85	0,000000*	1
S	24	24.42455	1.01769			
Total (Adjusted)	29	751.3273				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los valores de actividad lipasa sobre pNFP producida por diferentes cepas en FMS.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad lipasa (pNFP)

Term A: Cepa

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=24 MSE=1,01769

Group	Count	Mean	Different From Groups
13b	6	1.9340	56c, 13a, 43a, 19
9	5	2.6877	56c, 13a, 43a, 19
56c	6	7.1331	13b, 9a, 43a, 19
13a	2	8.3663	13b, 9a, 43a, 19
43a	5	11.1456	13b, 9a, 56c, 13a, 19
19	6	15.2238	13b, 9a, 56c, 13a, 43a

Análisis estadísticos para los valores de actividad lipasa sobre aceite de oliva

Response Actividad lipasa (aceite de oliva)

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Cepa	5	726.9027	145.3806	142.85	0,000000*	1
S	24	24.42455	1.01769			
Total (Adjusted)	29	751.3273				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe diferencia significativa entre los valores de actividad lipasa sobre aceite de oliva producida por diferentes cepas en FMS.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad lipasa (aceite de oliva)

Term A: Cepa

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=7 MSE=10,03606

Group	Count	Mean	Different From Groups
23a	2	3.23	56c, 13b, 13a, 9a, 43a, 19
56c	2	16.79	23a, 13a, 9a, 43a, 19
13b	2	22.475	23a, 13a, 9a, 43a, 19
13a	2	29.985	23a, 56c, 13b, 43a, 19
9a	2	36.75	23a, 56c, 13b, 43a, 19
43a	2	67.425	23a, 56c, 13b, 13a, 9a
19	2	74.015	23a, 56c, 13b, 13a, 9a

PARTE II. Estabilidad de lipasas en solventes orgánicos

Estabilidad de lipasas y actividad relativa en solventes orgánicos

Cepa 9a

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	9052.123	1131.515	28.02	0,000018*	1
S	9	363.4233	40.38037			
Total (Adjusted)	17	9415.547				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-19.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=40,38037

Group	Count	Mean	Different From Groups
Etanol (1.69)	2	37.0	Decano (0.0), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Hexano (0.0), Testigo, Acetona (2.88), Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36)
Decano (0.0)	2	70.2	Etanol (1.69), Testigo, Acetona (2.88), Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36)
Propanol (1.66)	2	80.5	Etanol (1.69), Acetona (2.88), Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36)
Acetonitrilo (3.92)	2	84.8	Etanol (1.69), Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36)
Hexano (0.0)	2	88.5	Etanol (1.69), Tolueno (0.36)
Testigo	2	100.0	Etanol (1.69), Decano (0.0)
Acetona (2.88)	2	102.3	Etanol (1.69), Decano (0.0), Propanol (1.66)
Acetato de etilo (1.78)	2	107.3	Etanol (1.69), Decano (0.0), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Tolueno (0.36)	2	116.8	Etanol (1.69), Decano (0.0), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Hexano (0.0)

Conclusión: Ver Perfil IV

Cepa 13a

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	11657.16	1457.145	50.77	0,000001*	1
S	9	258.3131	28.70146			
Total (Adjusted)	17	11915.48				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-13a.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=28,70146

Group	Count	Mean	Different From Groups
Etanol (1.69)	2	32.0	Propanol (1.66), Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Decano (0.0), Testigo, Acetonitrilo (3.92)
Propanol (1.66)	2	56.6	Etanol (1.69), Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Decano (0.0), Testigo, Acetonitrilo (3.92)
Acetato de etilo (1.78)	2	84.3	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Hexano (0.0)	2	94.6	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Tolueno (0.36)	2	97.1	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Acetona (2.88)	2	97.8	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Decano (0.0)	2	99.0	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Testigo	2	100.0	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Acetonitrilo (3.92)	2	122.8	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Decano (0.0), Testigo

Conclusión: Ver Perfil II

Cepa 13b

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	5051.703	631.4629	5.65	0,008947*	0.930217
S	9	1005.533	111.7258			
Total (Adjusted)	17	6057.236				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-13b.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=111,7258

Group	Count	Mean	Different From Groups
Etanol (1.69)	2	68.8	Testigo, Acetonitrilo (3.92), Acetona (2.88), Decano (0.0), Hexano (0.0), Acetato de etilo (1.78)
Propanol (1.66)	2	86.3	Acetato de etilo (1.78)
Testigo	2	100	Etanol (1.69)
Acetonitrilo (3.92)	2	102.2	Etanol (1.69)
Tolueno (0.36)	2	103.8	
Acetona (2.88)	2	106.5	Etanol (1.69)
Decano (0.0)	2	109.4	Etanol (1.69)
Hexano (0.0)	2	118.6	Etanol (1.69)
Acetato de etilo (1.78)	2	130.7	Etanol (1.69), Propanol (1.66)

Conclusión: Ver Perfil III

Cepa 19

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	23310.91	2913.864	47.72	0,000002*	1
S	9	549.559	61.06212			
Total (Adjusted)	17	23860.47				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-19.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=61,06212

Group	Count	Mean	Different From Groups
Propanol (1.66)	2	35.4	Acetonitrilo (3.92), Hexano (0.0), Testigo, Acetona (2.88), Decano (0.0), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Etanol (1.69)	2	39.2	Acetonitrilo (3.92), Hexano (0.0), Testigo, Acetona (2.88), Decano (0.0), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Acetonitrilo (3.92)	2	69.0	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Hexano (0.0), Testigo, Acetona (2.88), Decano (0.0), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Hexano (0.0)	2	93.3	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Testigo	2	100.0	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Acetona (2.88)	2	100.6	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Decano (0.0)	2	107.7	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Tolueno (0.36)	2	134.9	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Acetonitrilo (3.92), Hexano (0.0), Testigo, Acetona (2.88), Decano (0.0)
Acetato de etilo (1.78)	2	145.9	Propanol (1.66), Etanol (1.69), Acetonitrilo (3.92), Hexano (0.0), Testigo, Acetona (2.88), Decano (0.0)

Conclusión: Ver Perfil I

Cepa 23a

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	23885.02	2985.628	27.54	0,000019*	1
S	9	975.585	108.3983			
Total (Adjusted)	17	24860.61				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-23a.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=108,3983

Group	Count	Mean	Different From Groups
Propanol (1.66)	2	34.8	Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Testigo, Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Decano (0.0)
Acetonitrilo (3.92)	2	43.7	Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Testigo, Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Decano (0.0)
Etanol (1.69)	2	52.6	Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Testigo, Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Decano (0.0)
Tolueno (0.36)	2	80.3	Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Etanol (1.69), Hexano (0.0), Decano (0.0)
Acetona (2.88)	2	88.5	Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Etanol (1.69), Hexano (0.0), Decano (0.0)
Testigo	2	100	Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Etanol (1.69), Decano (0.0)
Acetato de etilo (1.78)	2	108.9	Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Etanol (1.69), Decano (0.0)
Hexano (0.0)	2	128.5	Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Etanol (1.69), Tolueno (0.36), Acetona (2.88)
Decano (0.0)	2	148.2	Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Etanol (1.69), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Testigo, Acetato de etilo (1.78)

Conclusión: Ver Perfil I

Cepa 43a

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: Solvente	8	15238.58	1904.823	30.63	0.000012*	1
S	9	559.7563	62.19514			
Total (Adjusted)	17	15798.34				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-43a.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=62.19514

Group	Count	Mean	Different From Groups
Etanol (1.69)	2	35.5	Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Decano (0.0), Testigo, Hexano (0.0), Acetonitrilo (3.92)
Propanol (1.66)	2	45.8	Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Decano (0.0), Testigo, Hexano (0.0), Acetonitrilo (3.92)
Acetato de etilo (1.78)	2	83.6	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Tolueno (0.36)	2	84.6	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Acetona (2.88)	2	89.0	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Decano (0.0)	2	94.5	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Testigo	2	100.0	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Hexano (0.0)	2	107.1	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Acetonitrilo (3.92)	2	138.2	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetato de etilo (1.78), Tolueno (0.36), Acetona (2.88), Decano (0.0), Testigo, Hexano (0.0)

Conclusión: Ver Perfil II

Cepa 56c

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	17369.75	2171.218	113.38	0,000000*	1
S	9	172.3456	19.14951			
Total (Adjusted)	17	17542.09				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa del biocatalizador L-56c.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=19,14951

Group	Count	Mean	Different From Groups
Etanol (1.69)	2	11.5	Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78), Decano (0.0), Hexano (0.0), Acetona (2.88), Testigo
Propanol (1.66)	2	12.7	Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78), Decano (0.0), Hexano (0.0), Acetona (2.88), Testigo
Acetonitrilo (3.92)	2	65.7	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78), Decano (0.0), Hexano (0.0), Acetona (2.88), Testigo
Tolueno (0.36)	2	76.8	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Acetona (2.88), Testigo
Acetato de etilo (1.78)	2	79.2	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Acetona (2.88), Testigo
Decano (0.0)	2	81.5	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Testigo
Hexano (0.0)	2	87.8	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)
Acetona (2.88)	2	93.0	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78)
Testigo	2	100.0	Etanol (1.69), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Tolueno (0.36), Acetato de etilo (1.78), Decano (0.0)

Conclusión: Ver Perfil III

Lipozyme RM IM

Response % Actividad relativa

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Solvente	8	4234.334	529.2918	25.49	0,000026*	1
S	9	186.8866	20.76518			
Total (Adjusted)	17	4421.221				
Total	18					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Existe efecto del tipo de solvente orgánico sobre la actividad relativa de Lipozyme RM IM.

Duncan's Multiple-Comparison Test

Response: Actividad residual (%)

Term A: Solvente

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=20,76518

Group	Count	Mean	Different From Groups
Acetato de etilo (1.78)	2	38.6	Hexano (0.0), Acetona (2.88), Etanol (1.69), Decano (0.0), Tolueno (0.36), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92), Testigo
Hexano (0.0)	2	59.4	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Acetona (2.88)	2	60.5	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Etanol (1.69)	2	65.4	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Decano (0.0)	2	69.5	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Tolueno (0.36)	2	71.7	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Propanol (1.66)	2	73.5	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Acetonitrilo (3.92)	2	74.7	Acetato de etilo (1.78), Testigo
Testigo	2	100.0	Acetato de etilo (1.78), Hexano (0.0), Acetona (2.88), Etanol (1.69), Decano (0.0), Tolueno (0.36), Propanol (1.66), Acetonitrilo (3.92)

Conclusión: Ver Perfil II

ANEXO H

Resultados de la identificación de proteínas por espectrometría de masas

Lipasa - Cepa 19

Protein Group 1

Expression Quality:

Group	Probability	Score	Num Spectra	Num Peptides	% Seq Coverage
Lipase1b	0.8224	79.64	6	6	16.6667
Total (Non-Redundant)	0.8224	79.64	6	6	16.6667

Peptides:

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Score	FValue	Prob	Peptide	Query
1204.19	3609.56	3608.67	23.14	-0.78	0.43	DIALHVIGVIGTAGGTGCVIEFCGE ANESLSMESR	27596
1184.87	3551.59	3549.61	14.99	-1.44	0.30	EHAPWAFNDFGIRCILAPSFADIFFN NCFK	27515
539.03	1614.09	1613.74	9.93	-1.46	0.30	FDADAQYDITVDIK	19111
1038.15	3111.45	3109.41	12.82	-1.80	0.14	ILVCTGPNFGCGSSREHAPWAFND FGIR	27001
641.22	1920.64	1921.92	11.47	-1.60	0.23	QARILVCTGPNFGCGSSR	23437
835.23	2502.68	2503.31	7.29	-2.04	0.05	VFIGSCTNSRIEDLGPAAAIVK GK	25669

Conclusión: Los resultados correspondientes a las bandas de zimografía para lipasa de la cepa 19, no dieron niveles de confiabilidad aceptables (Score < 45), por lo cual, no fue posible identificar la proteína.

Lipasa - Cepa 43a

Protein Group 1

Expression Quality:

Group	Probability	Score	Num Spectra	Num Peptides	% Seq Coverage
Lipase43a	1	101.8	2	2	5.8372
Total (Non-Redundant)	1	101.8	2	2	5.8372

Peptides:

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Score	FValue	Prob	Peptide	Query
830.97	1659.94	1658.88	95.73	6.36	1	IINEPTAAAIAIYGLDK	1128
724.65	2170.93	2170.98	6.07	-2.11	0.053	SVGIDLGTTYSCVGVWQNDR	383

Matching Genes:

gi|219774023|emb|CAW37039.1| (unnamed protein product [*Rhizopus stolonifer*])



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb



Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation

Blanca Hernández-Rodríguez^a, Jesús Córdova^b, Eduardo Bárzana^c, Ernesto Favela-Torres^{a,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, México D.F., Mexico

^b Universidad de Guadalajara, Departamento de Ingeniería Química, Guadalajara, Mexico

^c Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria, México D.F., 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 September 2008
Received in revised form 22 May 2009
Accepted 2 June 2009
Available online xxx

Keywords:
Lipase stability
Organic solvents
Thermotolerant fungus
Lipase production
Solid-state fermentation

ABSTRACT

Dried solid-state fermented solids (biocatalysts) produced by seven thermotolerant fungal strains were tested for lipase activity and stability in organic solvents. Two strains of *Rhizopus* sp. (19 and 43a) produced biocatalysts (L-19 and L-43a) that showed high lipase activities (74 and 72 U/g of dry matter, respectively) comparable to Lipozyme[®] RM IM (118 U/g DM). The use of the dipole moment of the organic solvents along with their classification based on the functional groups (non-polar, protic polar, aprotic polar) allowed the establishment of four different relative activity profiles for the seven biocatalysts evaluated. Compared to a biocatalyst not exposed to the organic solvent (100% relative activity), all biocatalysts showed a high relative activity (greater than 90%) in aprotic polar solvents (acetonitrile, acetone and ethyl acetate), whereas in protic polar solvents (ethanol and *i*-propanol) activity was reduced (lower than 40%). In addition, the incubation of biocatalysts L-19 and L-43a in *i*-amyl alcohol increased lipase activity in the synthesis of ethyl oleate 3.36 and 1.46 times, respectively. L-19 activity also increased after incubation in toluene (2.0 times), *i*-propanol (1.5 times) and acetonitrile (1.3 times) at temperatures from 30 to 50 °C. The results suggest that these biocatalysts can be used for a broad range of lipase reactions.

© 2009 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are serine hydrolases that catalyze the hydrolysis and the synthesis of esters from glycerol and long-chain fatty acids. These enzymes are of great interest for many reasons: they do not require cofactors, they remain active in organic solvents, they can be used with a broad range of substrates, and they often exhibit high enantio- and regio-selectivity [1]. Before the mid-1980s, lipases were used most frequently in laundry applications and in the modification of triglycerides [2]. However, they are also very effective biocatalysts in nearly anhydrous organic solvents [3]. Since lipases can be used in a variety of synthesis reactions (e.g., esterification, transesterification, alcoholysis, acidolysis, aminolysis, acylation and resolution of racemic mixtures), they have become potentially important for biotechnology and industry applications [4].

Biocatalysis in organic solvents has several potential advantages over biocatalysis in aqueous media: (i) increased solubility of hydrophobic compounds; (ii) ability to carry out new reactions

that are kinetically or thermodynamically restricted in water; (iii) suppression of undesirable side reactions; (iv) control or modification of enzyme selectivity (substrate, enantio-, regio-, prochiral); (v) the possibility of recovery of some products by the use of low-boiling-point organic solvents; and (vi) an increased enzyme thermostability [5]. In spite of these advantages, enzymes do not always meet desired levels of activity, productivity and, most importantly, stability in organic solvents [6]. Hydrophobic solvents typically lead to higher enzymatic activity and stability than their hydrophilic counterparts [5], which tend to strip some of the water required for enzymatic function, thereby lowering the catalytic activity [7]. The availability of lipases that were stable in polar solvents would favour new applications in biotechnological processes with polar substrates. For example, Slotema et al. [8] reported oleamide production via direct amidation of carboxylic acid with ammonia. For this reaction, the use of hydrophilic organic solvents with increased polarity shifted the thermodynamic equilibrium, leading to: (i) higher enzymatic activity; (ii) higher dissolution of water generated as reaction product while the water activity remains close to the optimum for the enzyme; (iii) higher solubility of substrates and products; and (iv) higher conversions of substrates into products. Thus, it is still necessary to find lipases that are stable in polar solvents. It has been reported that the structural properties that confer enzyme thermostability also confer stability in organic solvents [9,10]. Therefore, thermophilic or thermotolerant

* Corresponding author at: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 186, C.P. 09340, México D.F., México. Tel.: +52 55 58 04 65 55; fax: +52 55 58 04 65 54.

E-mail address: favela@xanum.uam.mx (E. Favela-Torres).

organisms can be used as suitable resources to obtain enzymes that are stable in organic solvents, since enzymes from these organisms possess intrinsic thermal stability [11].

Fungi are one of the most important sources of lipases for industrial applications. Their enzymes are usually produced extracellularly and can be obtained either by submerged (SmF) or by solid-state (SSF) fermentations [12]. Compared to SmF, SSF is preferable because of its higher productivity, reduced catabolic repression and lower water requirements. In addition, in processes with fast growing or osmotolerant microorganisms and the use of heavy inocula, sterilization of culture medium might be unnecessary due to the low water activity in the solid medium, which limits the growth of undesirable microorganisms. Overall, this leads to a lower capital investment and reduced operating costs [13,14]. Furthermore, the produced enzymes are retained in the fermented solids without expensive extraction, purification and immobilization processing. Hence, dried SSF preparations can be considered as economical biocatalysts for synthetic reactions in organic solvents. Recently, Nagy et al. [15], Fernandes et al. [16] and Martínez-Ruiz et al. [17] have shown the feasibility of using dried fermented solids, containing lipases, in biocatalytic reactions using organic solvents. However, comprehensive stability patterns of those lipase preparations are still unknown in solvents commonly used in different biocatalytic systems; the degree of enzyme stability will be important in determining the economic feasibility of such systems. In the present study, the objective was to produce lipases by SSF on an inert support from six strains of thermotolerant fungi (*Rhizopus* sp.) and one strain of thermophilic fungus (*Rhizomucor* sp.), and then to characterize their stability as a function of both organic solvent polarity and temperature.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and maintenance of cultures

The fungal strains employed in this work were *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (9a), *R. microsporus* var. *oligosporus* (13b), *R. microsporus* var. *tuberosus* (19), *Rhizomucor pusillus* (23a), *R. microsporus* var. *chinensis* (43a) and *R. microsporus* (56c). These strains were isolated [18] and deposited by Jesús Córdova in the Universidad Autónoma Metropolitana microbial collection (Mexico). *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* (13a) was kindly donated by S. Roussos from the IRD culture collection, Marseille, France. Fungal strains were cultured for 7 days at 45 °C on potato dextrose agar (DIFCO) slants and stored at 4 °C. The commercial enzyme preparation Lipozyme® RM IM (Novozymes) was kindly donated by Novozymes (Mexico).

2.2. Inocula preparation

In order to obtain the inocula, each fungal strain was propagated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 60 mL of potato dextrose agar at 45 °C for 7 days. The spores were harvested in 0.01% (v/v) Tween-80 solution and counted in a Neubauer chamber.

2.3. Culture medium composition

The fermentation medium for lipase production contained (g/L) [19]: urea (6.0); olive oil (60.0); lactose (7.5); K₂HPO₄ (7.5); MgSO₄·7H₂O (1.5); polyvinyl alcohol (2.4); plus 6 mL/L of an oligo-elements solution containing (g/L): EDTA (10); MnCl₂·4H₂O (1.98); CoSO₄·7H₂O (2.81); CaCl₂·2H₂O (1.47); CuCl₂·2H₂O (0.17); ZnSO₄·7H₂O (0.29). The pH of the medium was adjusted to 6.5; olive oil was incorporated and then emulsified using an Ultra-Turrax homogenizer (IKA-WERK) at 10 000 rpm for 10 min.

2.4. Production of lipases by SSF

Rhizopus homothallicus var. *rhizopodiformis* (13a) was used to establish the culture conditions in solid-state fermentation. Polyurethane foam (PUF) and expanded perlite were tested as inert solid supports. Both materials were sieved (to obtain particles between 0.8 and 2.0 mm), washed three times with distilled water and dried at 60 °C for 24 h. Supports were impregnated with the culture medium and then inoculated with a spore suspension (3×10^7 spores per gram of dry solid support). In all cases, inoculum volume was lower than 5% of the culture medium volume. Column reactors (2.5 cm × 20 cm) were then packed either with 8 g of impregnated PUF or 20 g of impregnated perlite. Culture conditions: temperature, 45 °C; aeration rate, 40 mL/min; initial moisture content, 55%; initial pH, 6.5. Two columns were sacrificed at each sampling time (20, 24 and 28 h) during the fermentation. Culture media, column reactors and input air were not sterilized for lipase production. For enzyme recovery, the fermented material obtained was mixed with distilled water (1:10 w/v) and vortexed for 1 min. Solid particles were filtered (Whatman 41) and the clear filtrate assayed for lipase activity. Specific growth rate (μ) and lag phase were estimated through respiratory activity by CO₂ measurements during the course of culture. For CO₂ measurements, an on-line gas monitoring system was connected to the outlet air streams from column reactors that were connected to a gas chromatograph linked to a personal computer, as described by Saucedo-Castañeda et al. [20].

2.5. Preparation of naturally immobilized lipases from fermented solids (biocatalysts)

Once SSF conditions were established, production of lipases by six thermotolerant strains (*Rhizopus* sp.) and one thermophilic strain (*Rhizomucor* sp.) was carried out at 45 °C for 20 h. The fermented solids were lyophilized for 12 h at –50 °C in a LYPH LOCK 6 Lyophilizer (LABCONCO®) and stored at 4 °C. Enzymatic activity losses were 17 and 18% when the fermented solids were air-dried or lyophilized, respectively. These lyophilized solids (biocatalysts) were used to evaluate the effect of organic solvent polarity and temperature on lipase stability.

2.6. Assays of hydrolytic lipase activity

Depending on the nature of the lipase (liquid enzymatic extract or dried powder), one of two analytical methods was used to estimate the lipase activity.

2.6.1. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate

Lipase activity in liquid enzymatic extracts was assayed according to the protocol of Pencreac'h and Baratti [21] with some modifications. The assay solution was prepared by creating an emulsion from 1 volume of a 13.4 mM *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) solution (in *i*-propanol) to 9 volumes of a 100 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0 (at 45 °C), containing 20 mM CaCl₂ and 0.25% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA). The reaction mixture contained 2.7 mL of the emulsion and 0.3 mL of an enzyme solution properly diluted in 100 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0 (at 45 °C). Once the reaction was started, absorbance (410 nm against a blank without enzyme) was monitored for 3 min using a spectrophotometer (SHIMADZU® UV-160). The reaction rate was calculated from the slope of the absorbance versus time curve using an apparent molar extinction coefficient of 15.783 cm² μmol^{–1} for *p*-nitrophenol (pNP). One unit of activity (IU) was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol of pNP per min at 45 °C and pH 8.0 under the assay conditions. All assays were done in triplicate; the results are presented as mean ± standard deviation.

2.6.2. Hydrolysis of olive oil

Lipase activity in biocatalysts (dried solids) was measured using a colorimetric method based on the formation of copper soaps of free fatty acids (Kwon and Rhee [22] with some modifications [19]). The reaction mixture consisted of 20 g olive oil and 100 mL of 100 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0 (at 45 °C), containing 10 mM CaCl₂, 0.25% (w/v) polyvinyl alcohol and 0.3% (w/v) arabic gum. This system was emulsified for 10 min at 10 000 rpm (45 °C) using an Ultra-Turrax (IKA-WERK®). The reaction was started by adding 3 mL of emulsion per 40 mg of biocatalyst. Incubation was performed at 45 °C for 15 min, and enzymatic activity was stopped with 0.6 mL of 6 M HCl. Fatty acids released were extracted in 3 mL of *n*-heptane, vortexed for 30 s. The tubes were centrifuged (9800 × g, 10 min, 4 °C) and 0.5 mL of a copper acetate–pyridine solution (50 g/L, pH 6.1) was added to 2.5 mL of recovered organic phase and vortexed for 30 s. Absorbance was measured at 715 nm in a spectrophotometer (SHIMADZU® UV-160). A calibration curve was constructed using oleic acid concentrations from 0 to 10 mM. A blank was prepared running a parallel assay with a biocatalyst previously deactivated with 0.6 mL of 6 M HCl. One unit of activity (IU) was defined as the amount of enzyme able to release 1 μmol of fatty acid per min at 45 °C and pH 8.0 under the above conditions. All assays were done in triplicate and the results are presented as mean ± standard deviation.

For both lipase assays, activity (IU) was referred to the dried fermented solids, expressed as dry matter (DM). For Lipozyme® RM IM the activity was expressed in units per gram of dry enzymatic commercial preparation, which includes the inert solid carrier and enzymatic protein.

2.7. Assay of synthetic lipase activity

Synthesis of ethyl-oleate was followed by measuring the residual free fatty acids using the protocol of Lowry–Tinsley [23], which has proved to be reliable by different authors [16,17,24]. Lipase mediated synthesis of ethyl-oleate was performed in 3 mL screw-capped glass vials using a molar ratio of oleic acid:ethanol of 1:5, in which 0.1 g biocatalyst was added to 2 mL 50 mM oleic acid solution in *n*-heptane. The reaction was started by addition of concentrated ethanol (99.9% purity) and incubated at 45 °C for 2 h. Capped glass vials were stirred in an orbital shaker at 150 rpm for 1 min every 5 min. The reaction was stopped by adding 0.5 mL 6 M HCl. Aliquots (0.3 mL) of the organic phase were diluted with 1.2 mL *n*-heptane followed by addition of 1 mL copper acetate–pyridine solution (50 g/L, pH 6.1) and were then vortexed for 30 s. Absorbance was measured at 715 nm using a spectrophotometer (SHIMADZU® UV-160). A standard curve was constructed using oleic acid. A blank was run under the assay conditions with the biocatalyst previously deactivated with 0.5 mL 6 M HCl. All assays were done in triplicate; the results are presented as mean ± standard deviation.

2.8. Lipase stability in organic solvents

The effect of organic solvents on lipase stability (including the stability of commercial enzyme Lipozyme® RM IM) was evaluated. The following organic solvents were selected and classified according to their values of Log *P* and dipole moment (in Debye units, D) respectively [25,26]: acetonitrile (–0.33, 3.2), acetone (–0.23, 2.88), ethyl acetate (0.68, 1.78), ethanol (–0.24, 1.69), *i*-propanol (0.28, 1.66), toluene (2.5, 0.36), *n*-hexane (3.5, 0) and *n*-decane (5.6, 0). For subsequent analysis, *i*-amyl alcohol (1.16, 1.8) and tetrahydrofuran (0.49, 1.75) were also included. All solvents were dried with molecular sieves (nominal pore diameter 4 Å) before use. Biocatalysts (0.15 g) were incubated with 1 mL solvent for 1 h at 25 °C. The solvent was then removed through a forced air current with a flow-rate of 22 L/min for 2 min. Residual lipase activity was measured

by hydrolysis of olive oil (see Section 2.6.2). The relative enzymatic activity (% REA) was reported. Biocatalyst not exposed to the organic solvent was used as reference. Duncan tests ($\alpha < 0.05$) were used to establish significant differences between treatments for each biocatalyst.

2.9. Effect of organic solvents and temperature on lipase stability

In order to determine the effect of temperature on the stability of the enzyme, 0.5 g biocatalyst was incubated at 30, 40 and 50 °C in 1.5 mL of various organic solvents with different polarity (non-polar = toluene; protic polar = *i*-propanol; aprotic polar = acetonitrile) for 1 h. The solvent was then removed through an air current with a flow of 22 L/min for 2 min. Lipase activity was measured as a function of the residual oleic acid concentration during the synthesis of ethyl-oleate at 45 °C in *n*-heptane. The relative enzymatic activity (% REA) was reported using a non-treated biocatalyst as a reference.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of two inert solid supports for growth and lipase production of *R. homothallicus* (strain 13a) cultured via solid-state fermentation (SSF)

Polyurethane foam (PUF) and expanded perlite were evaluated as inert solid supports for SSF. As Table 1 shows, no significant differences ($\alpha < 0.05$) were found for specific growth rate (μ) and lag phase between both supports. For both solid supports, maximum lipase activity (Table 1) and CO₂ production rate were observed at 20 h of culture (profiles not shown). Lipase production was higher (40%) in perlite than in PUF. Thus, SSF for lipase production was conducted using perlite as an inert solid support.

3.2. Preparation of naturally immobilized lipases from fermented solids (biocatalysts)

Table 2 shows specific growth rate (μ), lag time and lipase activity values obtained for each fungal strain after 20 h of culture at 45 °C. Among the different tested strains, significant differences ($\alpha < 0.05$) were found for μ and for lipase activity, while no significant differences in lag time were detected. Specific growth rates were between 0.4 and 0.5 h^{–1}. Strains 19 and 43a produced the highest values of lipase activity using pNPP (15.5 and 11.1 U/g DM, respectively) and olive oil (74.0 and 72.4 U/g DM, respectively). These activity values were similar to those obtained with a commercial enzyme from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® RM IM) (118.1 U/g DM, using olive oil). The ratio of enzymatic activity between both substrates (*R*) was calculated (Table 2). For all the assayed lipases, a preference toward natural substrates (triglycerides) was evident ($R > 1$). The differences in the *R*-values among *Rhizopus* strains suggested the presence of different lipases; this is in agreement with previous reports describing differences in N-terminal sequences of several lipases produced by *R. homothallicus* (13a), *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus delemar* [27,28].

It is worth noting that the lipase activities on olive oil that were obtained in this short process of 20 h were similar to or higher than those obtained by other workers using wild or mutant fungal strains with improved lipase production (Table 3). Another advantage of this SSF system is the use of an inert support (perlite) as a simple matrix for enzyme immobilization, avoiding the possibility of taking undesirable compounds into the biocatalysis process, which might occur with complex substrates. This would facilitate the product purification steps. To date there has been relatively little use of inert supports for the production of enzymes, although the polymeric resins Amberlite IRA-900 [35] and perlite [17] have

Table 1Fermentation parameters and lipase activity during solid-state cultures of *Rhizopus homothallicus* (strain 13a) with two different inert solid supports.

Inert support	μ_{CO_2} (h ⁻¹) ^b	Lag phase (h) ^b	Lipase activity (U g ⁻¹ dry matter) ^c pNPP		
			20 h	24 h	28 h
PUF ^a	0.32 ± 0.04	9.9 ± 2.0	4.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.1
Perlite	0.42 ± 0.06	10.8 ± 1.1	6.4 ± 0.1	2.2 ± 1.3	1.9 ± 0.8

^a PUF, polyurethane foam.^b No significant differences were found between inert supports (ANOVA test, $\alpha < 0.05$).^c Significant differences were found between inert supports (ANOVA test, $\alpha < 0.05$).**Table 2**

Fermentation parameters and lipase activity of seven fungal strains during solid-state cultures using expanded perlite as an inert support.

Strain	μ (h ⁻¹)	Lag phase (h)	Lipase activity (U g ⁻¹ dry matter) ^{a,b}					
			pNPP	Olive oil	R ^d			
9a	0.53 ± 0.020	A	11.0 ± 0.9	2.7 ± 0.6	D	36.7 ± 4.0	C	13.5
13a	0.38 ± 0.001	C	11.3 ± 1.4	8.4 ± 0.5	C	30.0 ± 1.8	C	3.5
13b	0.50 ± 0.003	B	9.1 ± 1.2	1.9 ± 0.7	D	22.5 ± 0.1	D	10.7
19	0.41 ± 0.006	C	8.5 ± 0.2	15.2 ± 1.6	A	74.0 ± 7.0	B	4.8
23a	0.41 ± 0.004	C	8.8 ± 0.8	n.d. ^c		3.2 ± 0.3	E	–
43a	0.40 ± 0.005	C	8.0 ± 0.5	11.1 ± 0.6	B	72.4 ± 5.7	B	6.4
56c	0.36 ± 0.034	D	8.1 ± 1.1	7.1 ± 0.9	C	16.8 ± 0.3	D	2.4
Lipozyme [®] RM IM						118.12 ± 1.0	A	–

ABCDE: The same letter indicates no significant difference according to Duncan's test ($\alpha < 0.05$).^a Lipase production corresponds to that obtained at 20 h of culture.^b Lipase activity (IU) of fermented dry matter, in units of activity per gram of dry matter (U/g DM).^c n.d.: not detected.^d R: ratio of lipase activity on olive oil/lipase activity on pNPP.**Table 3**

Lipase production by several fungal strains in SSF systems.

Microorganism	Type	Lipase activity (U g ⁻¹ dry matter) ^{a,b}	Time (h)	Solid substrate	Reference
<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Wild	80	12	Olive oil cake- Bagasse	[29]
<i>Penicillium restrictum</i>	Wild	30	24	Babassu cake	[30]
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Wild	30	36	Babassu cake	[31]
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Wild	26.4	n.r. ^c	Babassu cake	[32]
<i>Rhizopus oligosporus</i> TUV-31	Mutant	76.6	48	Almond meal	[33]
<i>Rhizopus oligosporus</i> ISUV-16	Mutant	81.2	48	Almond meal	[34]

^a Lipase activity was determined using olive oil as substrate.^b Lipase activity (IU) in units of activity per gram of dry matter (U/g DM).^c n.r.: not reported.

been used for lipase production by SSF. In the work by Martínez-Ruiz et al. [17], the fermented material (biocatalyst) was directly used to synthesize ethyl-oleate with high esterification rates and substrate conversion; this biocatalyst retained more than 80% of its catalytic activity after 7 months of storage at 4 °C.

3.3. Lipase stability and relative activity in organic solvents

In addition to activity, the stability of lipases in organic solvents is an important parameter for industrial applications. Therefore, the effect of several organic solvents on the stability of the lipase was determined, not only for the biocatalysts produced by each fungal strain but also for the commercially available enzyme Lipozyme[®] RM IM. The Log *P*-value is generally used to correlate solvent polarity with enzyme activity and stability in non-aqueous phases [36,37,38]. However, a correlation between lipase stability and Log *P*-value was not found in this work (Fig. 1). A similar lack of correlation was reported for lipases produced from *Acinetobacter* sp. SY-01 [39] and *Acinetobacter* sp. RAG-1 [40].

In order to establish a correlation between the type of solvent and the enzyme stability, the organic solvents were ordered according to their dipole moment and their functional groups [41] as follows: non-polar (*n*-decane, *n*-hexane, toluene), protic polar (*i*-propanol, ethanol), and aprotic polar (ethyl acetate, acetone, acetonitrile) (Fig. 2). In order to determine lipase stability, each

biocatalyst was incubated for 1 h in different organic solvents at 25 °C; then the residual hydrolytic activity was measured with olive oil as the substrate (see Section 2.6.2). The obtained results suggest that the activity values are influenced by several phenomena, including not only inhibition and activation, but also denaturation.

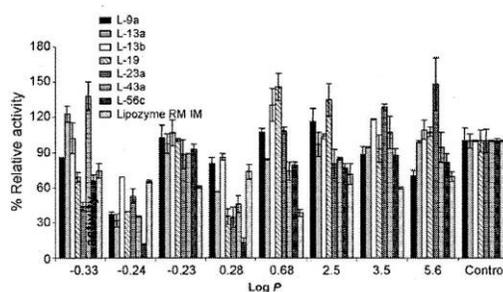


Fig. 1. The effect of organic solvents in function of their Log *P*-value on lipase activity. Lipases used in this study were produced by six strains of thermotolerant fungi and one strain of thermophilic fungus. The solvents and their Log *P*-values were: acetonitrile, -0.33; ethanol, -0.24; acetone, -0.23; *i*-propanol, 0.28; ethyl acetate, 0.68; toluene, 2.5; *n*-hexane, 3.5; *n*-decane, 5.6. The activity was measured as described in Section 2.6.2.

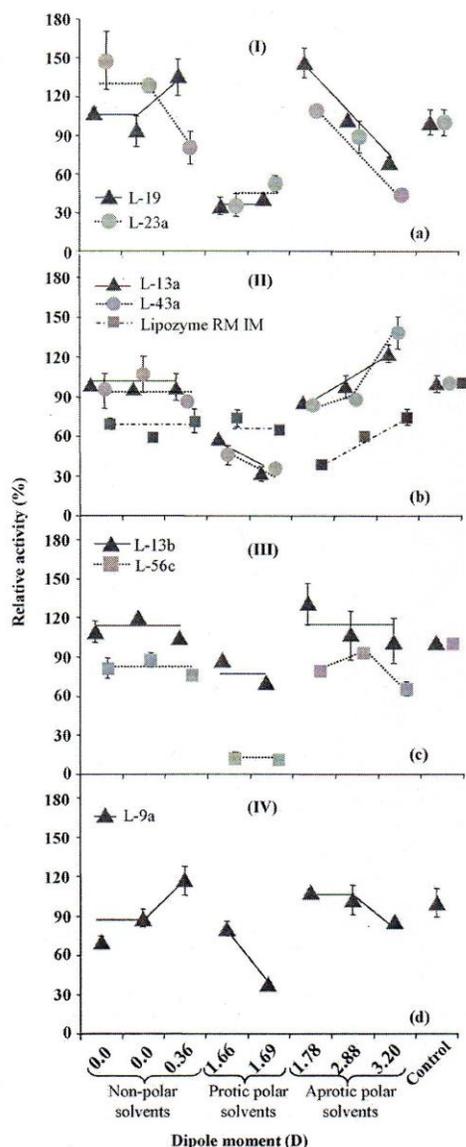


Fig. 2. Stability profiles of lipases after exposure (1 h) to different organic solvents. Lipases used in this study were produced by six strains of thermotolerant fungi and one strain of thermophilic fungus. L-19, L-23a (Profile I) (a); L-13a, Lipozyme® RM IM (Profile II) (b); L-13b, L-43a, L-56c (Profile III) (c); L-9a (Profile IV) (d). The solvents and their dipole moment values were: *n*-decane, 0.0; *n*-hexane, 0.0; toluene, 0.36; *i*-propanol, 1.66; ethanol, 1.69; ethyl acetate, 1.78; acetone, 2.88; acetonitrile, 3.2. The activity was measured as described in Section 2.6.2.

Some reports have tried to correlate enzyme function with properties related to the polarity of organic solvents, such as: dielectric constant (ϵ) [42], polarizability, hydrogen bond donor ability (α), hydrogen bond acceptor ability (β) [43], polarity index [44] and Log *P* [26,38,45]. Although the Log *P*-value has been commonly used as a quantitative measure of polarity, this property denotes

hydrophobicity that is related to polarity but is not synonymous with it [26]. Therefore, in this work the dipole moment was considered as a polarity parameter; this value depends on chemical and structural properties of the organic solvent, such as: number and type of chemical bonds, presence of delocated electron pairs, electronegativity of atoms, molecular size and symmetry, and electrostatic potential which determine the stabilization of neighbouring molecules [41]. In addition to this polarity parameter, the use of categories related to functional groups of the organic solvents (non-polar, protic polar, aprotic polar) allowed us to establish four different profiles of relative activity as shown in Fig. 2. Attempts to establish a correlation with either Log *P* or the dipole moment were not successful. This is in accordance with Valivety et al. [46], who stated that "there is probably no single parameter for solvent polarity that will predict the enzyme activity in organic media".

Lipase activity after incubation of the biocatalysts in non-polar solvents (toluene, *n*-hexane, *n*-decane) was from 70 to 148% compared to that of the control without solvent (100%). These biocatalysts could be used in systems with reaction media based on non-polar solvents. In similar reports for free and immobilized lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59, residual activities from 70 to 120% were reported after 24 h of incubation in cyclohexane, *n*-hexane and *n*-heptane at room temperature [47]; this behaviour was attributed to the fact that non-polar organic solvents do not strip off the water layer from the surface of enzyme. In contrast, Sulong et al. [48] found that the relative activity of the lipase, produced by the bacterium tolerant to organic solvents *Bacillus sphaericus* 205y, was as low as 40% after 30 min of incubation in toluene at 37 °C. These results show that it is not possible to establish a general rule on the behaviour of activity and stability in non-polar solvents.

Currently, suitable performance of enzymes in non-polar solvents has been established in different biocatalytic processes [3,26]. However, the availability of lipases that are active and stable in polar solvents would open new opportunities in biocatalysis with polar substrates. Incubation in the presence of protic polar solvents (*i*-propanol and ethanol) showed a negative effect in the biocatalysts assayed in this work; a relative activity value as low as 12% was obtained for the biocatalyst L-56 in the presence of protic polar solvents. Similarly, low relative activity values have been reported after 1 h of exposition in protic polar solvents for lipases from different organisms such as *Penicillium simplicissimum*, 33% in ethanol [49], *Penicillium aurantiogriseum*, less than 2% in methanol, ethanol and *i*-propanol at 29 °C [38] and *Bacillus megaterium*, 45% in ethanol at 28 °C [45]. In contrast to this behaviour, it is noteworthy that the lipases from biocatalysts L-9a and L-13b retained a hydrolytic relative activity higher than 80% in *i*-propanol. These results are comparable to those reported for lipases from *P. simplicissimum*, 79% after 1 h in propanol [49], *B. megaterium*, 97% after 1 h in *i*-propanol at 28 °C [45] and *B. sphaericus* 205y, 96% after 30 min at 37 °C in ethanol [48]. This high relative activity might be due to the moderate competence of alcohols for amide hydrogen bonds [50] in addition to the substitution of water with the hydroxyl groups of the alcohol [44].

Studies dealing with the effect of aprotic polar solvents (ethyl acetate, acetone, acetonitrile) showed that most of the biocatalysts assayed (L-9a, L-13a, L-13b, L-19, L-23a and L-43a) had high relative activities (80–146%) after 1 h of incubation at 25 °C (Fig. 1). Instability of lipases in aprotic polar solvents is frequently associated with the stripping of water from the protein surface [51], along with solvent penetration into the enzyme, leading to protein unfolding and subsequent denaturation [52]. There are only few reports showing the stability of lipases in aprotic polar solvents. A lipase produced by *Pseudomonas* sp. had relative activity values from 100 to 110% after 15 h at room temperature in acetone, tetrahydrofuran and ethyl acetate [53]. In addition, Wu et al. [54], using a lipase from

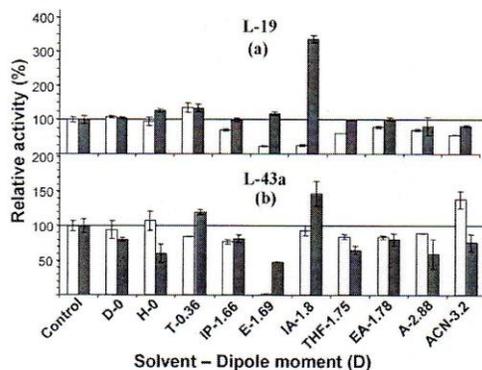


Fig. 3. Residual activity of lipases after exposure (1 h) to organic solvents, grouped by their dipole moment: (a) L-19 and (b) L-43a. Lipase activity was evaluated as described in Section 2.6.2 for (□) hydrolysis of olive oil and Section 2.7 for (■) synthesis of ethyl-oleate. The solvents and their dipole moment values were: *n*-decane, D-0; *n*-hexane, H-0; toluene, T-0.36; *i*-propanol, IP-1.66; ethanol, E-1.69; *i*-amyl alcohol, IA-1.8; tetrahydrofuran, THF-1.75; ethyl acetate, EA-1.78; acetone, A-2.88; acetonitrile, ACN-3.2.

Mucor javanicus, observed high stability and an increased activity after 2 h of incubation at 25 °C in acetonitrile (85%), ethyl acetate (168%) and acetone (246%).

3.4. Relative activity of lipases in both hydrolysis and synthesis reactions

Fig. 3 shows the relative activity of the lipases from biocatalysts L-19 and L-43a as a function of the dipole moment, in both hydrolysis and synthesis reactions. A relative activity over 80% was observed in non-polar solvents (*n*-decane, *n*-hexane and toluene) and higher than 70% in *i*-propanol. However, ethanol reduced hydrolysis activity (L-19 and L-43a) more than 80% and lowered synthesis activity (L-43a) by 50% (Fig. 3). This suggests that ethanol molecules might cause significant structural changes in the enzyme, as was observed for the *Penaeus penicillatus* acid phosphatase [55]. On the other hand, aprotic polar solvents (tetrahydrofuran, acetone, ethyl acetate and acetonitrile) did not affect the stability of L-19 for the synthesis of ethyl-oleate nor L-43a for hydrolysis of olive oil. These results suggest that the interaction between the aprotic polar solvents and the enzyme did not affect the hydration level or the conformation required for enzymatic activity [8,56].

An increase in lipase activity (synthesis and hydrolysis) after incubation in organic solvents was observed as follows: L-19 activity for synthesis increased 1.26, 1.18, 1.34 and 3.36 times in *n*-hexane, ethanol, toluene, and *i*-amyl alcohol, respectively; similarly, the rate of the hydrolysis reaction increased 1.35 times in toluene. For L-43a, activity increased 1.20 and 1.46 times in toluene and *i*-amyl alcohol, respectively (for the synthesis reaction) and 1.38 times in acetonitrile (for the hydrolysis reaction). As suggested by Wu et al. [54], the increase in enzymatic activity could be explained by the structural transition from the inactive “closed” form of lipase to the active “open” form, as a result of the treatment with organic solvents. These authors observed an enhanced activity (up to 193%) for the immobilized lipase of *M. javanicus* after treatment for 2 h at 25 °C with both protic and aprotic polar solvents (*i*-propanol, ethyl acetate and acetone). The same effect was reported for *P. aurantiogriseum* lipase and *B. megaterium* lipase after 1 h of incubation in *n*-heptane (non-polar solvent) with relative activities of 113 and 120%, respectively [38,45].

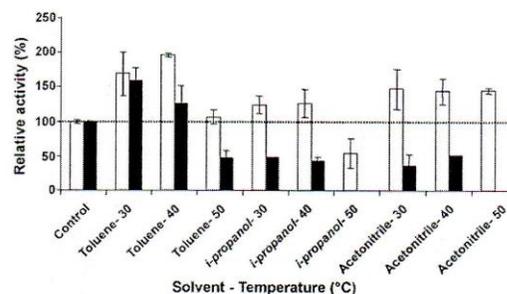


Fig. 4. Effect of organic solvent (toluene, *i*-propanol and acetonitrile) and temperature (30, 40 and 50 °C) on residual activity of (□) L-19 and (■) L-43a. Lipase activity was evaluated by synthesis of ethyl-oleate as described in Section 2.7.

Up to now, several lipase-based processes have been established using non-polar solvents [57]. Therefore, as showed above for the biocatalysts L-19 and L-43a, their stability and increased activity in polar solvents (*i*-propanol, ethanol, *i*-amyl alcohol, tetrahydrofuran, ethyl acetate, acetone, acetonitrile) will allow the development of reactions using polar substrates (e.g., amides, flavonoids, lactones, carbohydrates, hydroxycinnamic acids). In addition, polar solvents have technological advantages compared to non-polar solvents (e.g., lower toxicity, lower boiling points and lower costs). Finally, a further advantage of the system is that the direct use of fermented solids in the biocatalytic process improves process economics in relation to systems in which the biocatalyst must be extracted, purified and immobilized.

3.5. Effect of the temperature on lipase activity of biocatalysts incubated in different organic solvents

The effect of temperature and type of organic solvent on lipases stability was determined for biocatalysts L-19 and L-43a, which were incubated in toluene (non-polar), *i*-propanol (protic polar) and acetonitrile (aprotic polar) at 30, 40 and 50 °C. After 1 h of incubation, synthesis activity was evaluated (Fig. 4). Lipase activity of biocatalyst L-19 was higher (from 10 to 100%) than the control activity in most of the conditions tested; activity was only reduced (50%) after incubation in *i*-propanol at 50 °C. In contrast, lipase activity from biocatalyst L-43a was only increased after incubation in toluene at 30 and 40 °C. An important loss of activity was observed after incubation in *i*-propanol and acetonitrile at 30–50 °C, in fact lipases were totally inactivated at 50 °C. Secondary and tertiary structural changes have been reported for a *R. oryzae* lipase after treatment with *i*-propanol, which was accompanied by lipase activation [58].

4. Conclusions

Solid-state fermentation was used to produce lipases from six strains of thermotolerant fungi (*Rhizopus* sp.) and one strain of thermophilic fungus (*Rhizomucor* sp.) using perlite as an inert solid support. Biocatalysts L-19 and L-43a showed comparable lipase activities to the commercial enzyme preparation Lipozyme® RM IM (Novozymes); in both cases enzymatic activity was quantified per gram of dry matter. The dry fermented solids could be used as economical naturally immobilized biocatalysts in synthesis reactions.

In this work, organic solvents were classified according to both dipole moment and functional groups (non-polar, protic polar and aprotic polar), then effect of each organic solvent was evaluated on the activity and stability of the seven biocatalysts produced by SSF.

The dipole moment was chosen as polarity parameter and alternative to Log *P*. To our knowledge, this is the first report where the dipole moment of solvents and their functional groups are used to characterize lipase reactions in organic solvents. By using this approach, four relative activity profiles of lipases as a function of the solvent were obtained, suggesting structural differences among the seven assayed lipases. Biocatalysts L-9a, L-13a, L-13b, L-19, L-23a and L-43a showed high stability in several polar solvents (protic and aprotic). In addition, L-19 was thermostable in non-polar and polar solvents. Remarkably, incubation in polar organic solvents increased lipase activity for L-19 and L-43a. These results suggest that naturally immobilized biocatalysts have great potential in biotechnological processes. In particular, the produced biocatalysts show potential with polar solvents, which have technological advantages such as low toxicity, low boiling points, low costs and the possibility to use polar substrates for novel reactions. Further studies will reinforce these results, especially related to the kinetics of activity changes during incubation time under these various solvent/temperature regimes.

Acknowledgements

B. Hernández-Rodríguez acknowledges a scholarship from CONACyT. The authors thank Novozymes (Mexico) for their kind donation of lipase (Lipozyme® RM IM). The suggestions from Ph.D. Arely Prado and Ph.D. Octavio Loera are gratefully acknowledged.

References

- [1] U.T. Bornscheuer, *FEMS Microbiol. Rev.* 26 (2002) 73–81.
- [2] U.T. Bornscheuer, C. Bessler, R. Srinivas, S.H. Krishna, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 433–437.
- [3] A. Zaks, A.M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 3192–3196.
- [4] R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* 19 (2001) 627–662.
- [5] A. Zaks, A.M. Klivanov, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3194–3201.
- [6] G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 2226–2254.
- [7] A. Zaks, A.M. Klivanov, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 8017–8021.
- [8] W.F. Slotema, G. Sandoval, D. Guieysse, A.J.J. Straathof, J. Marty, *Biotechnol. Bioeng.* 82 (2003) 664–669.
- [9] S. Kumar, Ch. Tsai, R. Nussinov, *Protein Eng.* 13 (2000) 179–191.
- [10] G. Haki, S. Rakshit, *Bioreour. Technol.* 89 (2003) 17–34.
- [11] J. Palomo, R. Segura, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. Guisán, *Biomacromolecules* 5 (2002) 249–254.
- [12] L.A.I. de Azeredo, P.M. Gomes, G.L. Sant'Anna, L.R. Castilho, D.M.G. Freire, *Curr. Microbiol.* 54 (2007) 361–365.
- [13] L.R. Castilho, C.M.S. Polato, E.A. Baruaque, G.L. Sant'Anna, D.M.G. Freire, *Biochem. Eng. J.* 4 (2000) 239–247.
- [14] G. Viniegra-González, E. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S.J. Romero-Gomez, G. Díaz-Godínez, C. Augur, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 157–167.
- [15] V. Nagy, E.R. Tóke, L.C. Keong, G. Szatzker, D. Ibrahim, I.C. Omar, G. Szakács, L. Poppe, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 39 (2006) 141–148.
- [16] M.L.M. Fernandes, E.B. Saad, J.A. Meira, L.P. Ramos, D.A. Mitchell, N. Krieger, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 263 (2006) 8–13.
- [17] A. Martínez-Ruiz, H.S. García, G. Saucedo-Castañeda, E. Favela-Torres, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151 (2008) 393–401.
- [18] J. Córdova, S. Roussos, J. Baratti, J. Nungaray, O. Loera, *Micol. Apl. Int.* 15 (2003) 37–44.
- [19] J.A. Rodríguez, J.C. Mateos, J. Nungaray, V. González, T. Bhagnagar, S. Roussos, J. Cordova, J. Baratti, *Process Biochem.* 41 (2006) 2264–2269.
- [20] G. Saucedo-Castañeda, M.R. Trejo-Hernández, B.K. Lonsane, J.M. Navarro, S. Roussos, D. Dufour, M. Raimbault, *Process Biochem.* 29 (1994) 13–24.
- [21] G. Pencrea'h, J.C. Baratti, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 417–422.
- [22] D.Y. Kwon, J.S. Rhee, *JAOCs* 63 (1986) 89–92.
- [23] R.R. Lowry, I.J. Tinsley, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53 (1976) 470–472.
- [24] M.L.M. Fernandes, N. Krieger, A.O. Baron, P.P. Zamora, L.P. Ramos, D.A. Mitchell, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 30 (2004) 43–49.
- [25] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 81–87.
- [26] I.M. Smallwood, *Handbook of Organic Solvent Properties*, first ed., Arnold, London, 1996.
- [27] J.C. Mateos, J.A. Rodríguez, S. Roussos, J. Cordova, A. Abousalham, F. Carriere, J. Baratti, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 1042–1050.
- [28] A. Hiol, M.D. Jonzo, N. Rugani, D. Druet, L. Sarda, L.C. Comeau, *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2000) 421–430.
- [29] J. Córdova, M. Nemmaoui, M. Ismaili-Alaoui, A. Morin, S. Roussos, M. Raimbault, B. Benjilali, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 5 (1998) 75–78.
- [30] A. Gombert, A. Pinto, L. Castilho, D. Freire, *Process Biochem.* 35 (1999) 85–90.
- [31] M.L.E. Gutarra, M.G. Godoy, L.R. Castilho, D.M.G. Freire, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 313–318.
- [32] E.D.C. Cavalcanti, M.L.E. Gutarra, D.M.G. Freire, L.R. Castilho, G.L.S. Júnior, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 (2005) 79–84.
- [33] T. Iftikhar, A. Hussain, *Biotechnology* 1 (2002) 15–20.
- [34] U. Awan, K. Shafiq, S. Mirza, S. Ali, A. Rehman, I. ul-Haq, *Asian J. Plant Sci.* 12 (2003) 913–915.
- [35] P. Christen, N. Angeles, G. Corzo, A. Farres, S. Revah, *Biotechnol. Tech.* 9 (1995) 597–600.
- [36] U. Bornscheuer, R. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Germany, 1999.
- [37] L. Kanwar, P. Goswami, *Enzyme Microb. Technol.* 31 (2002) 727–735.
- [38] V.M. Lima, N. Krieger, D.A. Mitchell, J. Fontana, *Biochem. Eng. J.* 18 (2004) 65–71.
- [39] S. Han, J. Back, M. Yoon, P. Shin, C. Cheong, M. Sung, S. Hong, I. Chung, Y. Han, *Biochimie* 85 (2003) 501–510.
- [40] E. Snellman, E. Sullivan, R. Colwell, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 5771–5779.
- [41] L.G. Wade Jr., *Organic Chemistry*, fifth ed., Pearson Prentice Hall, Madrid, 2004.
- [42] R. Affleck, C.A. Haynes, D.S. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 5167–5170.
- [43] D. Nurok, R.M. Kleyale, B.B. Muhoberac, M.C. Frost, P. Hajdu, D.H. Robertson, S.V. Kamat, A.J. Russell, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 7 (1999) 273–282.
- [44] M.N. Gupta, R. Batra, R. Tyagi, A. Sharma, *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 284–288.
- [45] V.M. Lima, N. Krieger, D.A. Mitchell, J.C. Baratti, I. Filippis, J. Fontana, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 31 (2004) 53–61.
- [46] R.H. Valivety, G.A. Johnston, C.J. Suckling, P.J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 1137–1143.
- [47] R. Bancercz, G. Ginalska, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2007) 553–560.
- [48] M.R. Sulong, R.N.Z.R. Abd Rahman, A.B. Salleh, M. Basri, *Protein Expr. Purif.* 49 (2006) 190–195.
- [49] H. Sztajer, H. Liinsdorf, H. Erdmann, U. Menge, R. Schmid, *Biochim. Biophys. Acta* 1124 (1992) 253–261.
- [50] K.R. Babu, A. Moradian, D.J. Douglas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 317–328.
- [51] A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 15 (2001) 147–153.
- [52] P.P. Wangikar, P.C. Michels, D.S. Clark, J.S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 70–76.
- [53] M. Pogorevc, H. Stecher, K. Faber, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 857–860.
- [54] J.C. Wu, S.S. Lee, M.M.B. Mahmood, Y. Chow, M.M.R. Talukder, W.J. Choi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45 (2007) 108–112.
- [55] Q.X. Chen, R.Q. Zhang, P.Z. Yang, Y. Li, S.L. Chen, S. Li, Y. Yang, H.M. Zhou, *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999) 103–107.
- [56] L. Yang, J.S. Dordick, S. Garde, *Biophys. J.* 87 (2004) 812–821.
- [57] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 235–251.
- [58] M.M.R. Talukder, S. Tamalampudy, C.J. Li, L. Yanglin, J. Wu, A. Kondo, H. Fukuda, *Biochem. Eng. J.* 33 (2007) 60–65.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00111

Matrícula: 205181463

CARACTERIZACION BIOQUIMICA
DE LIPASAS PRODUCIDAS POR
HONGOS TERMOTOLERANTES EN
FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de diciembre del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DRA. MARIA DE LOS DOLORES REYES DUARTE
DR. RICARDO HERNANDEZ MARTINEZ
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO



BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ
RODRIGUEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS DOLORES REYES
DUARTE

VOCAL

DR. RICARDO HERNANDEZ MARTINEZ

SECRETARIA

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO