

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Caracterización Bioquímica de la actividad Lipolítica
de Pseudoalteromonas Atlantica Aislada de la Bahía de
Paracas**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Omar Anthony Lizano Chehin

Lima – Perú

2012

*“El hombre encuentra a Dios detrás de
cada puerta que la ciencia logra abrir.”*

Albert Einstein

**El presente trabajo de tesis está
dedicado a:**

Mis padres, Genaro y Ana, quienes son los que han hecho posible que cumpla con este objetivo, y por todo el apoyo brindado durante mi vida universitaria.

Mis hermanas, Diana y Cynthia, por todo el apoyo incondicional brindado cuando las necesité.

Al amor de mi vida, Vanessa, con quien tengo la dicha de compartir los mejores momentos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme brindado las fuerzas necesarias para poder concretar este paso fundamental en mi vida, tener una profesión.

A mi asesora, Dra. Amparo Zavaleta, por su amistad y confianza depositada en mi persona en todo momento.

Al equipo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular, por todo el apoyo brindado para el desarrollo de esta tesis.

A mis maestros de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por todos los conocimientos impartidos durante los 6 años de vida universitaria.

A mis familiares y verdaderos amigos, quiénes confiaron en mí en todo momento.

El presente trabajo de tesis fue financiado
parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación
de la UNMSM según RR N° 01652-R-09

RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar bioquímicamente la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2, aislada de la Bahía de Paracas (Ica), se procedió a cultivar la bacteria en medio LB (Luria-Bertani) a temperatura ambiente durante 24 horas. Para determinar la actividad lipolítica de la *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2, se utilizó agar SW 5 % con tributirina 1 % y se incubó a temperatura ambiente por 48 horas; la hidrólisis del sustrato se evidenció por la formación de un halo transparente. Así también, se cuantificó la actividad lipolítica utilizando como sustratos por un lado tween 80 y por otro, aceite de oliva al 1 %; los cuales no fueron degradados; esta respuesta evidenció que la enzima en estudio es una lipasa del grupo VI o esterasa. Por ese motivo, se utilizó como sustrato ρ -nitrofenol acetato en buffer fosfato 25 mM pH 7, el producto liberado se midió por espectrofotometría a 405 nm y se obtuvo una actividad enzimática de 79,32 $\mu\text{mol/mL}$ y una actividad específica de 661,00 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína en el extracto crudo. *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2 produce una lipasa del grupo VI o esterasa, la cual además presenta actividad óptima a 20 °C, pH 7 y concentración salina 5 %.

Palabras clave: *Pseudoalteromonas atlantica*, actividad lipolítica, esterasa, ρ -nitrofenol acetato.

ABSTRACT

In order to characterize biochemically the lipolytic activity of *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2, isolated from the Bay of Paracas (Ica), it was proceeded to grow the bacteria in LB medium (Luria-Bertani) at environment temperature during 24 hours. To determine lipolytic activity of *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2, SW 5 % agar with tributyrin 1 % was incubated at environment temperature for 48 hours, where substrate hydrolysis was evidenced by the formation of a transparent halo. Additionally, lipolytic activity was quantified using as substrates Tween 80 on one side and on the other, olive oil, 1%, which were not degraded, this response revealed that the enzyme under study is a lipase or esterase group VI. For that reason, was used as substrate ρ -nitrophenol acetate in 25 mM phosphate buffer pH 7, the released product was measured by spectrophotometry at 405 nm and was obtained 79,32 $\mu\text{mol/mL}$ as enzymatic activity, and 661,00 $\mu\text{mol/mg}$ protein as specific activity in the crude extract. *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2 produces a lipase group VI or esterase, which also has optimal activity at 20 °C, pH 7 and 5% salt concentration.

Keywords: *Pseudoalteromonas atlantica*, lipolytic activity, esterase, ρ -nitrophenol acetate

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1 LÍPIDOS	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Clasificación de los lípidos	5
2.1.3 Funciones generales de los lípidos	8
2.1.4 Importancia de los lípidos	8
2.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS	10
2.2.1 Características generales de las enzimas lipolíticas	11
2.2.2 Clasificación de las lipasas bacterianas	15
2.2.3 Reacciones catalizadas por enzimas lipolíticas de interés biotecnológico	20
2.2.4 Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas lipolíticas	23
2.2.5 Precedentes y métodos para la medición de las enzimas lipolíticas	25
2.3 <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	29
2.3.1 Descripción y significancia	29
2.3.2 Clasificación científica	31
2.3.3 Estructura genómica	32
2.3.4 Estructura celular y metabolismo	32
2.3.5 Ecología	33
2.3.6 Patología	34
2.3.7 Investigaciones actuales	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 CULTIVO DE <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	37
3.1.1 Reactivación de la cepa	37
3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	37

3.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA	38
3.3.1	Efecto de la temperatura	38
3.3.2	Efecto del pH	38
3.3.3	Efecto de la concentración de sales	38
3.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN EL EXTRACTO CRUDO	39
3.5	DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES	40
3.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA	41
IV.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	42
4.1	CULTIVO DE <i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	42
4.2	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	42
4.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA	43
4.3.1	Efecto de la temperatura	43
4.3.2	Efecto del pH	44
4.3.3	Efecto de la concentración de sales	44
4.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN EL EXTRACTO CRUDO	45
4.5	DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES	46
4.6	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA	47
V.	DISCUSIÓN	48
VI.	CONCLUSIONES	50

VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
IX. ANEXOS	62

I. INTRODUCCIÓN

Pseudoalteromonas atlantica es una bacteria marina, Gram negativa, aerobia, psicrófila; distribuida en los diferentes océanos. Este microorganismo produce una gran variedad de compuestos extracelulares biológicamente activos como exopolisacáridos, moléculas de señalización como homoserina y lactonas, proteasas y enzimas que hidrolizan agar, alginatos y carragenina.

Al grupo de enzimas lipolíticas pertenecen lipasas y esterases; las primeras tienen la capacidad de hidrolizar acil glicerol de cadena larga; mientras que las segundas hidrolizan ésteres con ácidos grasos de cadena corta. Este tipo de enzimas se han obtenido de diferentes orígenes; pero las de mayor interés comercial son las de fuentes microbianas. Así por ejemplo, las enzimas que presentan gran actividad lipolítica proceden de los géneros *Pseudomonas*, *Salinivibrio*, *Yersinia*, *Lactobacillus* y *Bacillus*.

En los últimos años, el interés por el estudio de las enzimas lipolíticas se ha incrementado debido a su uso en la formulación de detergentes, elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, eliminación de cera de la pulpa del papel, síntesis enantioselectiva de naproxeno e ibuprofeno, drogas esteroideas y nutracéuticas, etc. Además, son usadas como insumo de productos cosméticos y farmacéuticos; así como en procesos de síntesis química para la obtención de compuestos ópticamente puros, modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación. Es por ello que, la búsqueda de nuevas lipasas tiene gran interés prospectivo para el diseño de nuevos productos en las industrias: farmacéutica, alimentaria, química, cosmética, etc.

Es por ello que, las enzimas extracelulares de especies bacterianas de nichos ecológicos extremos son de interés por presentar mejores características de

estabilidad a variaciones de temperatura, pH y concentración salina. Sin embargo, las enzimas de cada especie bacteriana muestran características bioquímicas específicas y en muchos casos son cepas específicas.

Pseudoalteromonas atlantica PAR 2 es una bacteria que fue aislada a partir de aguas profundas de la Bahía de Paracas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica e identificada por características bacteriológicas y secuenciación completa de los genes ribosómicos 16S, esta cepa bacteriana tiene gran valor industrial por su origen psicrófilo.

En la actualidad, la industria biotecnológica internacional está en la búsqueda continua de nuevos catalizadores que generen productos en procesos limpios y sostenibles. En ese sentido, tiene especial interés la determinación de la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* por su origen psicrófilo; es decir, sus enzimas son activas a bajas temperaturas, a diferencia de las de origen mesófilo o termófilo que disminuyen su actividad a bajas temperaturas, requiriendo energía adicional para actuar.

Finalmente, cabe resaltar que este trabajo integra herramientas microbiológicas, bioquímicas y moleculares, cuyos resultados fortalecerán las líneas de investigación emergentes a nivel institucional.

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Demostrar la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica*.
- Determinar las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de lipasas de *Pseudoalteromonas atlantica*.
- Cuantificar la actividad lipolítica en el extracto crudo.

II. GENERALIDADES

2.1 LIPIDOS

2.1.1 Definición

Los lípidos son considerados como un grupo de biomoléculas heterogéneas, solubles en disolventes apolares y ligeramente polares, como hexano, benceno, cloroformo, éter o metanol, e insolubles o parcialmente solubles en agua (1).

En muchos lípidos, esta definición se aplica únicamente a una parte de la molécula, y en otros casos, la definición no es del todo satisfactoria, ya que pueden existir lípidos solubles en agua (como los gangliósidos, por ejemplo), y a la vez existen otras biomoléculas insolubles en agua y que no son lípidos (carbohidratos como la quitina y la celulosa, o las escleroproteínas).

Los lípidos pueden encontrarse unidos covalentemente con otras biomoléculas como en el caso de los glicolípidos (presentes en las membranas biológicas), las proteínas aciladas (unidas a algún ácido graso) o las proteínas preniladas (unidas a lípidos de tipo isoprenoide). También son numerosas las asociaciones no covalentes de los lípidos con otras biomoléculas, como en el caso de las lipoproteínas y de las estructuras de membrana. Por tanto, en ambientes acuosos tienden a asociarse mediante fuerzas no covalentes dando lugar a gotas oleosas en el caso de los lípidos hidrofóbicos, o dando lugar a monocapas, bicapas o micelas en el caso de los lípidos anfipáticos.

Por ese motivo, una característica básica de los lípidos, y de la que derivan sus principales propiedades biológicas es la hidrofobicidad. La baja solubilidad de los

lípidos se debe a que su estructura química es fundamentalmente hidrocarbonada (alifática, alicíclica o aromática), con gran cantidad de enlaces C-H y C-C.

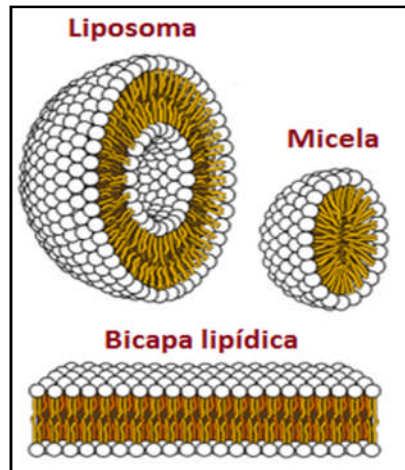


Figura 1: Fosfolípidos organizados en liposomas, micelas y bicapa lipídica.

La naturaleza de estos enlaces es 100 % covalente y su momento dipolar es mínimo. El agua, al ser una molécula muy polar, con gran facilidad para formar puentes de hidrógeno, no es capaz de interactuar con estas moléculas. En presencia de moléculas lipídicas, el agua adopta en torno a ellas una estructura muy ordenada que maximiza las interacciones entre las propias moléculas de agua, forzando a la molécula hidrofóbica al interior de una estructura en forma de jaula, que también reduce la movilidad del lípido.

Todo esto supone una configuración de baja entropía, que resulta energéticamente desfavorable. Esta disminución de entropía es mínima si las moléculas lipídicas se agregan entre sí, e interactúan mediante fuerzas de corto alcance, como las fuerzas de Van der Waals. Este fenómeno recibe el nombre de efecto hidrofóbico.

Estas moléculas se encuentran en todos los seres vivos, en los que llevan a cabo funciones biológicas muy diversas debido a su elevada heterogeneidad química. Así, intervienen en la formación de las membranas biológicas, en el

almacenamiento de energía, son aislantes, y actúan como moléculas mensajeras, vitaminas, pigmentos, transportadores de electrones, cofactores enzimáticos y detergentes, entre otras funciones.

2.1.2 Clasificación de los lípidos

2.1.2.1 Clasificación en función a su solubilidad

De acuerdo a la clasificación de Small (1968), se distinguen dos grupos de lípidos en función de su comportamiento en un medio acuoso (1):

a) Lípidos apolares (hidrocarburos):

Son totalmente insolubles en agua y no forman monocapas. No existen compuestos de este tipo que sean sustratos de las lipasas.

b) Lípidos polares:

Se subdividen en tres clases:

- **Clase I:** Incluye a aquellos lípidos que no se hinchan en contacto con el agua y forman monocapas estables, como por ejemplo los diacil- y triacilgliceroles de cadena larga, las vitaminas A, K, y E y numerosos esteroides.
- **Clase II:** Incluye a lípidos como los fosfolípidos, monoacilgliceroles y ácidos grasos que se extienden sobre la superficie del agua formando monocapas. No obstante, si se hidratan se hinchan y forman fases liotrópicas bien definidas (cristales líquidos) tales como los liposomas.

- **Clase III:** Está conformada por fosfolípidos, triacilgliceroles de cadena corta, sales biliares y ésteres carboxílicos del *p*-nitrofenol, son parcialmente solubles en agua, formando monocapas inestables y, por encima de su concentración micelar crítica (CMC), micelas.

2.1.2.2 Clasificación según su reacción de saponificación

La heterogeneidad estructural de los lípidos dificulta cualquier clasificación sistemática. El componente lipídico de una muestra biológica puede ser extraído con disolventes orgánicos. Los lípidos pueden ser entonces sometidos a un criterio empírico básico para su clasificación, que es la reacción de saponificación.

La saponificación consiste en la hidrólisis alcalina de la preparación lipídica (con KOH o NaOH). Los lípidos derivados de ácidos grasos (ácidos monocarboxílicos de cadena larga) dan lugar a sales alcalinas (jabones) y alcohol, que son fácilmente extraíbles en medio acuoso. No todos los lípidos presentes en una muestra biológica dan lugar a la reacción de saponificación.

Se distinguen por tanto dos tipos de lípidos:

a) Lípidos saponificables:

Los lípidos saponificables agrupan a los derivados por esterificación u otras modificaciones de ácidos grasos, y se sintetizan en los organismos a partir de la aposición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono. En este grupo se incluyen:

- Los ácidos grasos y sus derivados
- Los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos)
- Los lípidos neutros (acilgliceroles y ceras)
- Los lípidos anfipáticos (glicerolípidos y esfingolípidos)

b) Lípidos insaponificables

Los lípidos insaponificables son derivados por aposición de varias unidades isoprénicas, y se sintetizan a partir de una unidad básica de 5 átomos de carbono: el isopreno.

En este grupo de lípidos se incluyen:

- Esteroides (esteroles, sales y ácidos biliares, hormonas esteroideas, etc.)
- Terpenos (retinoides, carotenoides, tocoferoles, naftoquinonas, dolicoles, etc.)

Existen otros lípidos insaponificables que no están relacionados estructuralmente con el isopreno, y son:

- Hidrocarburos
- Lípidos pirrólicos

2.1.2.3 Clasificación según su estructura molecular

Los lípidos se pueden clasificar según su estructura en:

a) Lípidos simples:

Son los que contienen uno o dos tipos de moléculas diferentes, e incluyen entre otros a los hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y ácidos grasos, eicosanoides, polihidroxicanoatos, cutinas, suberinas, cianolípidos, acilgliceroles (o acilglicéridos), ceras, ceramidas, lipoaminoácidos y lipopéptidos, lípidos fenólicos, terpenos, alcaloides isoprénicos, quinonas lipídicas, alcoholes vitamínicos y esteroides.

b) Lípidos complejos:

Son aquellos que contienen glúcidos en su estructura, y que están formados por tres o más tipos de moléculas diferentes. Incluyen a gliceroglicolípidos,

glicerofosfolípidos, esfingomielinas, gangliósidos, cerebrósidos, lipoaminoácidos glicosídicos, acilglicósidos, lipopolisacáridos, proteolípidos, entre otros.

2.1.3 Funciones generales de los lípidos

- **Estructural:** Son componentes estructurales fundamentales de las membranas celulares.
- **Energética:** Al ser moléculas poco oxidadas sirven de reserva energética pues proporcionan una gran cantidad de energía; la oxidación de un gramo de grasa libera 9,4 Kcal, más del doble que la que se consigue con 1 gramo de glúcido o de proteína (4,1 Kcal).
- **Protectora:** Las ceras impermeabilizan las paredes celulares de los vegetales y de las bacterias y tienen también funciones protectoras en los insectos y en los vertebrados.
- **Transportadora:** Sirven de transportadores de sustancias en los medios orgánicos.
- **Reguladora del metabolismo:** Contribuyen al normal funcionamiento del organismo. Desempeñan esta función las vitaminas A, D, E y K. Las hormonas sexuales y las de la corteza suprarrenal también son lípidos.
- **Reguladora de la temperatura:** También sirven para regular la temperatura. Por ejemplo, las capas de grasa de los mamíferos acuáticos de los mares de aguas muy frías.

2.1.4 Importancia de los lípidos

Las vitaminas A, D, E y K son liposolubles, lo que significa que estas solo pueden ser digeridas, absorbidas y transportadas en conjunto con las grasas. Las grasas

son fuentes de ácidos grasos esenciales, un requerimiento dietario importante. Las grasas juegan un papel vital en el mantenimiento de una piel y cabellos saludables, en el aislamiento de los órganos corporales contra el shock, en el mantenimiento de la temperatura corporal y promoviendo la función celular saludable. Además, éstos sirven como reserva energética para el organismo. Las grasas son degradadas en el organismo para liberar glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol puede ser convertido por el hígado y entonces ser usado como fuente energética.

El contenido de grasas de los alimentos puede ser analizado por extracción. El método exacto varía según el tipo de grasa a ser analizada, por ejemplo, las grasas poliinsaturadas y monoinsaturadas son analizadas de forma muy diferente.

Las grasas también sirven como un buffer muy útil hacia una gran cantidad de enfermedades. Cuando una sustancia particular sea química o biótica, alcanza niveles no seguros en el torrente sanguíneo, el organismo puede efectivamente diluir (o al menos mantener en equilibrio) las sustancias dañinas almacenándolas en nuevo tejido adiposo. Esto ayuda a proteger órganos vitales, hasta que la sustancia dañina pueda ser metabolizada y/o retirada de la sangre a través de la excreción, orina, sangramiento accidental o intencional, excreción de sebo y crecimiento del pelo.

Aunque es prácticamente imposible remover las grasas completamente de la dieta, sería equivocado hacerlo. Algunos ácidos grasos son nutrientes esenciales, significando que no pueden ser producidos en el organismo a partir de otros componentes y por lo tanto necesitan ser consumidos en pequeñas cantidades. Todas las otras grasas requeridas por el organismo no son esenciales y pueden ser producidas en el organismo a partir de otros componentes.

2.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas siempre que sea termodinámicamente posible, por lo cual se les denomina biocatalizadores. Casi todos los procesos químicos celulares utilizan enzimas o biocatalizadores. Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación para una reacción, acelerándose substancialmente la velocidad de la reacción. Las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas, siendo su actividad afectada por agentes ambientales como: temperatura, pH, presión y/o agentes operacionales como la aireación.

Por otro lado, la presencia de inhibidores que disminuyen la actividad enzimática, obliga a trabajar habitualmente a concentraciones de sustratos y productos bajos, lo que muchas veces provoca un encarecimiento de la etapa de purificación del producto de interés. Esto, asociado a su elevado costo y su poca estabilidad en medios y condiciones alejadas de las fisiológicamente habituales, lleva a continuos estudios para la optimización de procesos biocatalíticos (1).

En los últimos años, la utilización de biocatalizadores ha aumentado considerablemente al presentar importantes ventajas respecto a los procesos químicos convencionales. Son selectivas y específicas, presentan condiciones de trabajo de fácil manejo (temperatura y presión, ambiental o cercana a ellas en la mayoría de los casos, pH de fácil regulación), evitan la formación de productos secundarios típicos de procesos químicos, consiguiendo la reducción de pasos de purificación del producto deseado y la recuperación del biocatalizador, y generan menos residuos, por ejemplo, no suelen necesitar cantidades importantes de

solventes orgánicos. Por todos estos motivos, actualmente, las enzimas son usadas comercialmente en un sinnúmero de aplicaciones (1).

2.2.1 Características generales de las enzimas lipolíticas

Una de las aplicaciones más comunes de la biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Entre estas enzimas se encuentran las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC. 3.1.1.3), que pertenecen a un grupo de enzimas hidrolíticas, cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como monoglicéridos y diglicéridos.

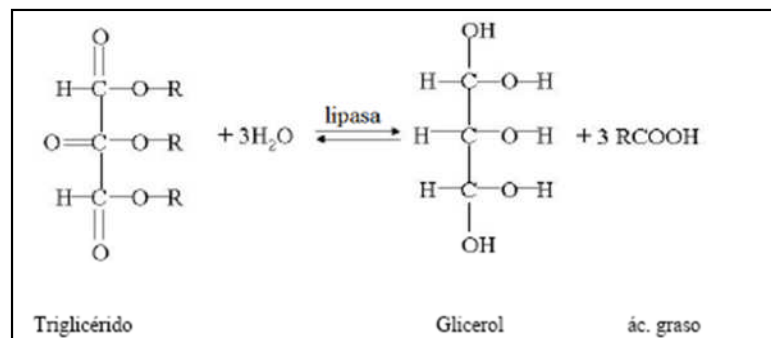


Figura 2: Lipasas hidrolizando un triglicérido, en donde R son ácidos grasos saturados o insaturados.

En la naturaleza, las lipasas actúan en la interfase orgánico-acuosa y su modelo cinético normalmente no se ajusta a las clásicas reacciones del tipo Michaelis-Menten, que por definición, solo es válido para reacciones en fase homogénea (2). De hecho, las reacciones lipolíticas se producen en la interfase lípido-agua en la que los sustratos lipolíticos por lo general forman un equilibrio entre los estados monomérico, micelar y emulsionado (3).

En los últimos años se han descrito dos criterios para clasificar a una enzima lipolítica como una "verdadera" lipasa (EC 3.1.1.3):

(a) Esta debe ser activada por la presencia de una interface; es decir, su actividad debe aumentar considerablemente tan pronto como el sustrato de triglicéridos forme una emulsión. Este fenómeno fue denominado "activación interfacial" (4).

(b) Esta debe contener una "tapa", que es un bucle de superficie de la proteína que cubre el sitio activo de la enzima y se aleja del contacto con la interface (5 - 7). Sin embargo, estos criterios son inadecuados para clasificar enzimas conteniendo una tapa, que no muestran activación interfacial (8).

Por lo tanto, las lipasas son definidas simplemente como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis o síntesis de cadenas largas de acilgliceroles (9). Si bien es cierto, no existe una definición estricta para el término "cadena larga", se pueden considerar como tal a glicerolesteres con una cadena acilo de 10 átomos de carbono. Mientras que la hidrólisis de glicerolesteres con una longitud de cadena acilo menor a 10 átomos de carbono con tributirilglicerol (tributirina) como sustrato estándar, generalmente indica la presencia de una esterasa (10). Cabe destacar que la mayoría de las lipasas son perfectamente capaces de hidrolizar estos sustratos de esterasa.

Los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles, necesitando la lipasa de una interfase orgánica-acuosa para su activación. Esta activación normalmente se produce mediante un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase orgánica-acuosa, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interfase, con la formación del complejo enzima-sustrato y posterior liberación de los productos a la fase acuosa y regeneración de la enzima (11).

En el caso de la activación esterásica la situación es completamente diferente, puesto que las esterases catalizan hidrólisis de ésteres solubles, trabajando sin

interfase y pudiendo describirse su cinética mediante modelos de Michaelis-Menten. En este punto es necesario señalar que, la mayoría de lipasas son también esterasas; sin embargo, no suelen catalizar reacciones con sustratos insolubles, ya que actúan sobre ésteres solubles en agua, precisamente por la necesidad de trabajar en la interfase, mostrando además dependencia en cuanto a la concentración de sustrato, tipo Michaelis-Menten (8).

Debido a la baja solubilidad de sus sustratos, las enzimas lipolíticas han de ser capaces de interactuar con la interfase de sus sustratos agregados. Así, la mayoría se caracterizan por ser activas por interfase; en otras palabras, una vez que se adsorben a una interfase desarrollan una actividad muy superior a la que muestran en la fase acuosa, fenómeno que se conoce como activación interfacial, tal como se observa en la figura 3.

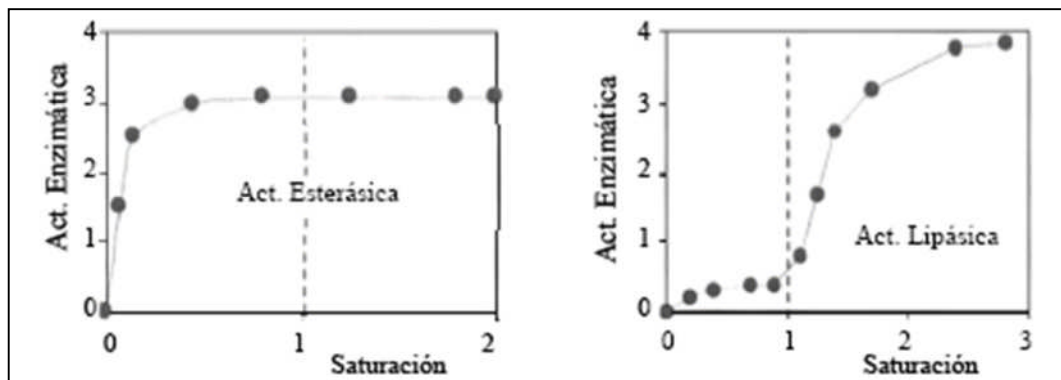


Figura 3: Actividades de las esterasas y las lipasas

El fenómeno de activación interfacial de las lipasas, se ha observado por Holwerda y colaboradores en el año 1936 y por Schonheyder y colaboradores en el año 1945, en ambos casos trabajando con la lipasa pancreática porcina.

Sarda y Desnuelle, en el año 1958 (4), demostraron cuantitativamente que la lipasa pancreática exhibía muy poca actividad cuando el sustrato, la triacetina

(triacilglicerol constituido por ácidos grasos de cadena corta), estaba perfectamente solubilizado. Sin embargo, cuando se utilizaban concentraciones de triacetina por encima de su límite de solubilidad se formaban partículas emulsionadas que, sorprendentemente, eran hidrolizadas por la lipasa de una forma más eficiente (4). Este fenómeno de catálisis de reacción heterogénea es único de las lipasas e involucra una activación interfacial; es decir, un incremento en la actividad de la enzima cuando la solubilidad del sustrato se excede y aparece una interfase orgánica-acuosa.

Se plantearon dos hipótesis, conocidas con el nombre de modelo de la enzima y modelo del sustrato. El modelo de la enzima fue propuesto por Desnuelle y colaboradores en 1960, suponiendo que la activación interfacial podría responder a un cambio conformacional sufrido por la lipasa. Esta reacción no se puede describir mediante una reacción Michaelis-Menten, ya que el proceso de hidrólisis tiene diversas etapas (2).

Por lo que respecta al modelo sustrato, la activación se explicaría por la modificación del sustrato lipídico en la interfase, aumento de la concentración local del sustrato en la vecindad del centro activo, mejor orientación y conformación de los lípidos empaquetados en la interfase con respecto a la geometría del centro activo de la enzima o a la disminución del grado de hidratación del sustrato (12, 13).

Desde principios de la década de los 90, las lipasas han estimulado grandes expectativas por sus diversas aplicaciones en la resolución de mezclas racémicas de compuestos quirales de interés para la industria farmacéutica (14), reacciones de inter y transesterificación (3), y de síntesis de productos enantioméricos puros

(15, 16); así como, en la síntesis de compuestos de interés en la industria de perfumería y fragancias entre otros (17).

Por lo que respecta a la especificidad de las lipasas, está directamente relacionada con el microorganismo productor de las mismas. De acuerdo con esto, existen lipasas no específicas; es decir, aquéllas que hidrolizan el triglicérido en cualquiera de sus posiciones, obteniéndose como productos intermedios, diglicéridos y monoglicéridos. A este grupo pertenece la lipasa de *Candida rugosa* y *Candida curvata*.

Por lo que se refiere a lipasas específicas dicha especificidad puede ser de dos tipos:

1. **Posicional:** Cuando se hidrolizan preferentemente ciertas posiciones del triglicérido, normalmente las posiciones 1 y 3 que son las más accesibles. Pertenecen a este tipo de lipasas las producidas por *Yarrowia lipolytica*, *Candida deformans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus* y *Rhizopus delemar* (18, 19).
2. **De ácido graso:** Cuando se cataliza la hidrólisis de un determinado tipo de ácido graso particular de un triglicérido. Ejemplos de este tipo son las lipasas de *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* y *Geotrichum candidum* (20, 21).

2.2.2 Clasificación de las lipasas bacterianas

Una búsqueda de bancos de datos disponibles reveló 217 entradas de enzimas lipolíticas de bacterias (Búsqueda completada en noviembre de 1998). Muchas de las entradas resultaron ser redundantes, y por último, 47 diferentes lipasas fueron identificadas y agrupadas en seis familias basadas en la homología de secuencia de aminoácidos (Tabla 1) (3).

Tabla 1: Clasificación de lipasas según Jaeger (3).

FAMILIA	SUB FAMILIA	ESPECIE PRODUCTORA DE ENZIMA	Nº ACCESO	S % (b)	PROPIEDADES
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosaa</i>	D50587	100	Lipasas verdaderas
		<i>Pseudomonas fluorescens C9</i>	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	
	2	<i>Burkholderia glumaea</i>	X70354	35	
		<i>Chromobacterium viscosuma</i>	Q05489	35	
		<i>Burkholderia cepaciaa</i>	M58494	33	
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	
	3	<i>Pseudomonas fluorescens SIKW1</i>	D11455	14	
		<i>Serratia marcescens</i>	D13253	15	
	4	<i>Bacillus subtilis</i>	M74010	16	
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	U78785	15	Fosfolipasa
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	
6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14		
	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	U80063	14		
II		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AF005091	100	Esterasa ligada
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	P10480	31	Aciltransferasa
		<i>Salmonella typhimurium</i>	AF047014	17	Esterasa ligada
		<i>Photorhabdus luminescens</i>	P40601	17	
		<i>Streptomyces scabiesa</i>	M57297	15	

FAMILIA	SUB FAMILIA	ESPECIE PRODUCTORA DE ENZIMA	Nº ACCESO	S % (b)	PROPIEDADES
III		<i>Streptomyces exfoliatus</i> (a)	M86351	100	Lipasa extracelular
		<i>Streptomyces albus</i>	U03114	82	
		<i>Moraxella</i> sp.	X53053	33	Lipasa 1
IV		<i>Moraxella</i> sp.	X53868	100	Lipasa 2
		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AE000985	28	Carboxilesterasa
		<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	X62835	25	
		<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	AF034088	24	
		<i>Alcaligenes eutrophus</i>	L36817	24	
		<i>Escherichia coli</i>	AE000153	20	Esterasa
V		<i>Moraxella</i> sp.	X53869	100	Lipasa 3
		<i>Psychrobacter immobilis</i>	X67712	88	
		<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	34	PHAdepolimerasa
		<i>Haemophilus influenzae</i>	U32704	34	Esterasa putativa
		<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AF071233	25	Esterasa
		<i>Acetobacter pasteurianus</i>	AB013096	15	Esterasa
VI		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (a)	S79600	100	Esterasas
		<i>Synechocystis</i> sp.	D90904	24	
		<i>Spirulina platensis</i>	S70419	22	
		<i>Rickettsia prowazekii</i>	Y11778	16	
		<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE001287	15	

(a) Enzimas lipolíticas con estructura tridimensional conocida.

(b) Similitudes (S) de secuencias de aminoácidos fueron determinadas con el programa Megalign (DNASStar), con el primer miembro de cada familia establecido arbitrariamente al 100%.

La **Familia I**, cuenta con un total de 22 miembros divididos en subgrupos en 6 subfamilias. Subfamilias I.1 y I.2 extienden lo descrito anteriormente, lipasas de *Pseudomonas* grupo I y II codificadas en un operón junto con sus acompañantes intramoleculares afines, que han sido designados Lif (lipasa específica foldasas) (11). Estas lipasas son secretadas por la vía de tipo II, mientras que los que pertenecen a la subfamilia I.3 utilizan la vía de secreción de tipo I. Las lipasas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*, agrupadas en la subfamilia I.4, son las lipasas más pequeñas conocidas, con un peso molecular de 19,6 kDa.

Así también, parecen ser muy adecuadas para aplicaciones biotecnológicas la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* perteneciente a la subfamilia I.5 (22). Lipasas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus hyicus* pertenecen a la lipasas mejor caracterizadas, procedentes de bacterias Gram-positivas (23).

La **Familia II** se ha descrito antes, como una nueva familia de enzimas lipolíticas con funciones desconocidas (24).

Recientemente se agregó a esta familia, una esterasa localizada en la membrana externa de la *P. aeruginosa* (3). Esta enzima es un autotransportador perteneciente a una familia previamente identificada como factor de virulencia bacteriana (25).

Determinación de la estructura tridimensional de la enzima de *Streptomyces scabies* indicó que el pliegue terciario de esterasas pertenecientes a esta familia es diferente de los pliegues α/β hidrolasa, encontrados en la mayoría de las lipasas.

Los miembros de la **Familia III** contienen lipasas extracelulares de *Streptomyces* sp. y de cepas psicrófilas de *Moraxella* sp.

Los miembros de la **Familia IV** pertenecen al grupo de las lipasas adaptadas al frío, exhibiendo similitud con las lipasas sensibles a las hormonas de los mamíferos (26). Estas contienen un sitio activo de residuo de serina en una región pentapéptido GDSAG, el cual se encuentra cerca del extremo amino de la proteína, y, además, estas lipasas tienen otra región HGGG, estrictamente conservada y de función desconocida, ubicada inmediatamente arriba del sitio activo de la región pentapéptido.

Es interesante señalar que las familias IV y V contienen lipasas que pertenecen tanto a bacterias psicrófilas (*Moraxella sp.*, *Pseudomonas sp.* B11-1, y *P. immobilis*) como a bacterias termófilas (*Archaeoglobus fulgidus* y *Sulfolobus acidocaldarius*) (3).

Los miembros de la **Familia V** muestran similitudes estructurales con dehalogenasas, haloperoxidasas y epóxido hidrolasas presumiblemente exhibiendo el pliegue α/β hidrolasa como una característica de estructura terciaria (3).

La **Familia VI**, esterases que en parte han sido identificados a partir de secuencias del genoma (*Synechocystis sp.*, *Chlamydia trachomatis*). Estas esterases son pequeñas proteínas supuestamente situadas en el citoplasma bacteriano con similitud a las lisofosfolipasas de mamíferos. La determinación y comparación de la actividad específica y las especificidades de sustrato de diferentes lipasas es absolutamente necesario para investigar la función fisiológica de las lipasas, así como para juzgar su utilidad en aplicaciones biotecnológicas (3).

Sin embargo, existen serias dudas en cuanto a los resultados publicados por diferentes laboratorios. Como se mencionó anteriormente, no hay sustratos

estándar o un sistema de ensayo disponible para determinar las actividades específicas de la lipasa o para distinguir las lipasas de esterases. Por esta razón, un estudio reciente que compara la actividad enzimática de 11 lipasas bacterianas obtenidas tanto de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es muy importante (27).

Todas las lipasas analizadas mostraron una elevada actividad hacia la cadena corta del triglicérido tributirilglicerol y la cadena larga del trioctanoilglicerol, con las lipasas de *P. aeruginosa* y *Proteus vulgaris*, siendo las más activas. Fosfolípidos como 1,2-dioctanoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina fueron sustratos de baja afinidad para lipasas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Arthrobacter* sp., *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, y *P. vulgaris* o parcialmente hidrolizables para lipasas de *B. thermocatenuatus* y *S. marcescens*. La única excepción fue la lipasa de *S. hyicus*, la cual hidrolizó fosfolípidos rápidamente con alta actividad específica (27).

En resumen, es obvio que muchos genes de lipasa se están encontrando por accidente y las proteínas correspondientes son desconocidas.

Nuevos microorganismos productores de lipasa se han descrito (28 - 30), pero faltan estudios de los genes y proteínas afines de lipasas.

2.2.3 Reacciones catalizadas por enzimas lipolíticas de interés biotecnológico

El interés de las lipasas es consecuencia de su acción específica sobre unos enlaces químicos determinados. Su reacción natural es la hidrólisis del enlace éster. Esto permite una amplia serie de aplicaciones como la resolución de compuestos quirales y la obtención con un alto rendimiento de ácidos grasos de

elevada pureza a partir de aceites y grasas. Además, las lipasas también catalizan otras reacciones no necesariamente lipolíticas, lo que hace que estas enzimas tengan una amplia utilización en reacciones muy diversas.

Otras aplicaciones muy interesantes vienen dadas por la capacidad de estas enzimas de catalizar la reacción inversa, lo que permite la síntesis de ésteres, la transesterificación y la interesterificación (11).

En estos últimos casos citados, la concentración del agua en el medio será un parámetro clave para desplazar el equilibrio hacia la síntesis de los productos de interés, siendo muy comunes los sistemas de eliminación continua del agua formada durante la reacción (31).

La transesterificación se define como una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster, y se distinguen dos tipos de transesterificaciones, glicerólisis y alcoholólisis, según sea el glicerol o un alcohol el acil receptor. En las figuras 4 y 5 se puede observar el mecanismo de la transesterificación.

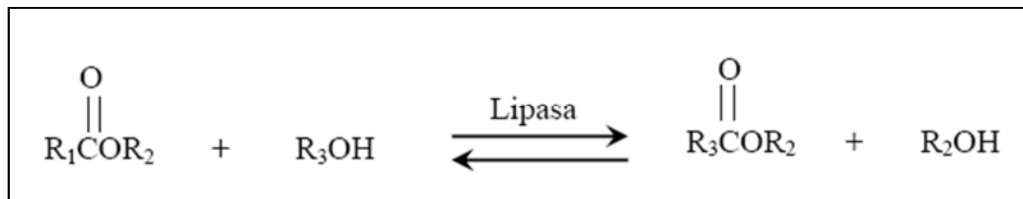


Figura 4: Esquema de transfesterificación del tipo alcoholólisis

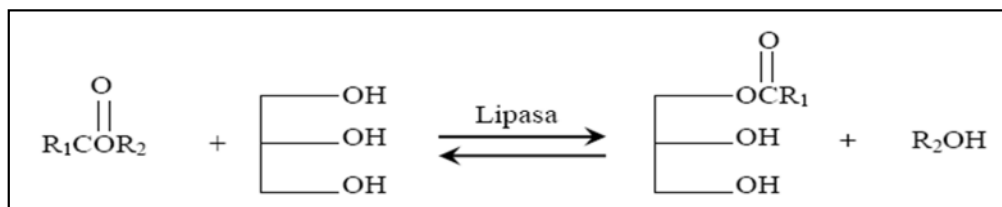


Figura 5: Esquema de transesterificación del tipo glicerólisis

Por otro lado, la interesterificación es un proceso útil para cambiar la composición de ácidos grasos en un enlace éster, en el cual el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso (acidólisis) o entre dos ésteres.

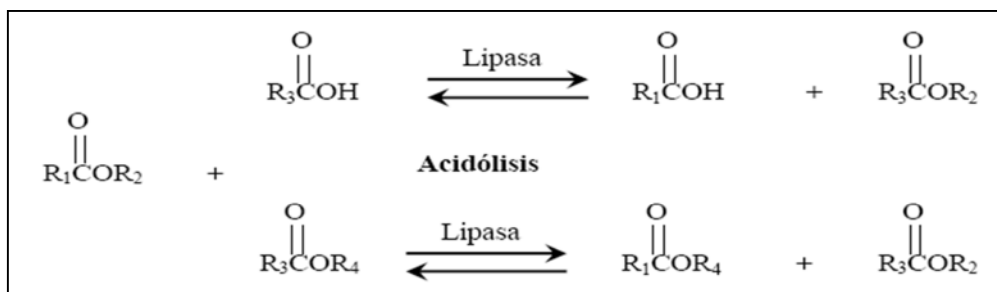


Figura 6: Esquema de interesterificación

Así también, muchos de los estudios cinéticos enzimáticos en los que intervienen lipasas se realizan con ésteres sintéticos de cadena corta y media (ésteres carboxílicos del *p*-nitrofenol, triacetina, tripropionina, tributirina). En medio acuoso, estos ésteres pueden encontrarse como monómeros y a medida que aumenta la concentración del sustrato, pueden organizarse en micelas, monocapas o emulsiones.

Estas lipasas pueden hidrolizar el sustrato en cualquiera de los estados, lo que da idea de la complejidad de estos sistemas y la dificultad para realizar análisis cinéticos. Generalmente para caracterizar las lipasas se utilizan triglicéridos y *p*-nitrofenoles, cuya velocidad de hidrólisis permitirá cuantificar la actividad lipásica y esterásica respectivamente de la enzima en estudio. Así como los triglicéridos son acilgliceroles, un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxilo por tres ácidos grasos saturados o insaturados. Los *p*-nitrofenoles son compuestos nitrofenólicos con un ácido graso en la posición *para* con unión éster entre el ácido graso y el nitrofenol (1).

2.2.4 Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas lipolíticas

El interés biotecnológico por las lipasas se debe a su especificidad por enlaces químicos determinados y su alta selectividad y/o estereoselectividad (32).

Las aplicaciones biotecnológicas clásicas con interés industrial de las lipasas están íntimamente ligadas a los distintos tipos de reacciones que son capaces de llevar a cabo, así pues, se tienen distintas posibilidades (33, 34).

a) Reacciones de hidrólisis

- Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica.
- Producción de aromas y sabores para la industria alimentaria.
- Inclusión de detergentes para la eliminación de manchas de grasas.
- Finalidades analíticas para la determinación de la estructura de triglicéridos.
- Resolución de mezclas quirales.

b) Reacciones de síntesis

- Síntesis de triglicéridos.
- Síntesis de precursores de péptidos.
- Producción de esteroides para la industria farmacéutica.
- Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica.
- Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes.
- Síntesis de ésteres glucídicos para la industria cosmética.

c) Reacciones de interesterificación

- Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos.
- Eliminación de ácidos grasos responsables de causar la inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas.

d) Reacciones de transesterificación

- Preparación de compuestos enantioméricamente puros.
- Transesterificaciones enantioselectivas dobles.

Actualmente, el estudio de las lipasas se encamina a una serie de aplicaciones de química fina de interés fundamentalmente farmacéutico, básicamente en el campo de la resolución de compuestos quirales, ya que en las normativas de legislación se tiende a exigir productos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas, esto está provocando un gran esfuerzo de investigación en el campo de las lipasas como biocatalizadores enantioméricamente activos.

Algunos de los trabajos en los que se está haciendo hincapié (33,34) son:

- Preparación de cicloalcanoles enantioméricamente puros como intermediarios de reacciones de interés farmacológico.
- Síntesis enantioselectiva de α -amino- β -hidroxiácidos como productos para elucidar estructuras tridimensionales de proteínas y péptidos.
- Preparación de análogos de hormonas enantioméricamente puros.
- Preparación de enantiómeros puros del ácido 2-aril-propiónico, como ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno entre otros, de utilidad farmacológica como antiinflamatorios.
- Síntesis altamente diastereoselectiva de β -lactonas como intermediarios para la producción de compuestos quirales.
- Producción de agentes antipsicóticos como derivados de butirofenonas enantioméricamente puros.
- Síntesis de piranonas ópticamente puras, útiles en ciertas reacciones quirales como adiciones cíclicas.
- Resolución cinética de alcoholes secundarios.

- Preparación de quinonas diterpenoides útiles en el tratamiento de artritis.
- Producción de biosurfactantes como ácido araquidónico de aplicación en la industria de alimentación, cosmética y farmacéutica.
- Preparación de etanolaminas ópticamente activas de interés fisiológico en medicina.

Hoy en día, existe la necesidad de producir lipasas bien caracterizadas en base a su bioquímica y sistemas de almacenamiento adecuados, también en base a su purificación e inmovilización para poder ponerlas en contacto con los sustratos de interés para las diferentes reacciones.

2.2.5 Precedentes y métodos para la medición de las enzimas lipolíticas

Existen muchos métodos con los que se puede determinar si una enzima presenta actividad lipolítica, a continuación se detallan los métodos más utilizados para realizar esta determinación.

2.2.5.1 Métodos de detección en placas

Método 1

Se siembra 10 μ l de inóculo bacteriano en agar LB (Luria-Bertani) (Anexo 1) conteniendo por separado aceites (palma, oliva, etc.) al 1 % (p/v) a temperatura óptima determinada previamente. Se incuba durante 24 a 96 horas. La formación de un halo de hidrólisis añadiendo a la placa una solución de sulfato de cobre indica actividad lipolítica (35).

Método 2

Se siembra 10 μ l de inóculo bacteriano en placas de agar conteniendo 0.5 % de tributirina emulsificada con 0.2 % de tritón X-100 e incubar durante 24 h a 37 °C. La aparición de un halo transparente indica actividad lipolítica (36).

Método 3

Se añade 10 μ l de inóculo bacteriano en pocillos de 4 mm de diámetro cortados en geles de agarosa 1 % en buffer fosfato salino conteniendo 1 % de L- α -Lecitina. La lectura se hace después de la incubación a 37 °C durante 48 h. La aparición de un halo transparente indica actividad lipolítica (37).

Método 4

Se siembra por triplicado en agar aceite de palma al 1 % (p/v) a 30 °C durante 24 horas. El crecimiento y formación de un halo de hidrólisis indica actividad lipolítica (35, 38).

Método 5

Se siembra una cantidad de inóculo en un medio de cultivo sólido suplementado con tween 80 al 1 %, se incuba por 48 horas a 37 °C (39). Se incubó por 7 días a 35 - 37 °C. Zonas claras alrededor de la colonia demostrarán la producción de lipasa (40).

Método 6

Se siembra 5 μ l de inóculo bacteriano en placas de agar mantequilla con resarsurina, e incubarlas a 37 °C durante 24 h. La aparición de colonias de color rosa indica actividad lipolítica (41).

Método 7

La determinación se realiza a partir de un cultivo de las cepas en caldo TSBYE, incubándose a 37 °C con agitación a 150 rpm. Se inocula aproximadamente 10 µl de cada cultivo en placas de agar tributirina y se incuba a 37 °C durante 2 a 4 días. Las cepas con actividad lipolítica presentan un halo transparente alrededor de su crecimiento debido a la presencia de lipasas que hidrolizan el gliceril tributirato del medio. Se mide en milímetros los diámetros de los halos que aparecieron alrededor de las gotas de cultivo depositadas (42).

Método 8

Se siembra 10 µl en agar rodamina B 0.001 %, el cual es sensible y específico para detectar la actividad lipolítica en bacterias. Luego se mide el tamaño de los halos de color anaranjado alrededor de las colonias, los cuales se observan con radiación UV a 350 nm (43, 44).

2.2.5.2 Espectrofotometría y fluorometría

Los sustratos cromogénicos, derivados del *p*-nitrofenol (45) o ésteres de resorufina o fluorescentes como los análogos de acilglicéridos que contienen fluoróforos como la 4-metilumbeliferona (MUF) (46), los cuales permiten la detección espectroscópica y fluorométrica de la actividad de la lipasa, también es posible utilizar los triacilglicéridos que tienen un grupo alquilo sustituido por un grupo pirenilo fluorescentes a 450 nm. Sin embargo, los sustratos comúnmente usados son los *p*-nitrofenil ester (47, 48).

En ese sentido, la actividad enzimática se cuantifica por medición del incremento de la absorbancia a 450 nm del producto de la liberación del *p*-nitrofenol como

resultado de la hidrólisis del éster *p*-nitrofenilo (de palmitato, de acetato, etc.), producida por la lipasa del extracto crudo enzimático (49).

Definiéndose como unidad internacional (UI) a la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 micromol (μmol) de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NFA) por minuto bajo las condiciones de la prueba (50).

2.2.5.3 Métodos titrimétricos

Está basado en la liberación de un ácido graso en la reacción lipolítica, se debe medir el pH durante todo el curso de la reacción regulándolo con NaOH, cuyo volumen se supervisa en función del tiempo. Lo cual nos da una relación lineal entre la concentración de lipasa y la de sustrato expresado en mol/superficie (51).

2.2.5.4 Métodos tensiométricos

Las lipasas actúan en la interfase entre el sustrato hidrofóbico y la fase hidrofílica acuosa. Cuando el sustrato es hidrolizado sale de la interfase, de tal modo que disminuye la densidad de la tensión superficial. Este principio es la base para la medición de la tensión superficial en capas monomoleculares, un método altamente sensible, ya que pequeñas cantidades de lípido es necesario para la medida cinética (52).

2.2.5.5 Ensayos cromatográficos

Para la detección de moléculas como los ácidos grasos, el β -naftol o el *p*-nitrofenol que son liberados por las lipasas al hidrolizar los acilglicéridos o sus correspondientes análogos por medio del HPLC (52).

2.2.5.6 Otros ensayos / métodos

Ensayos conductimétricos, turbidimétricos, resonancia magnética nuclear, microscopía de fuerzas atómicas, cristalografía, etc.

Métodos radiométricos que utilizan sustratos marcados radiactivamente (53).

2.3 *Pseudoalteromonas atlantica*

2.3.1 Descripción y significancia

Pseudoalteromonas atlantica fue aislada por primera vez en asociación con algas marinas y fue denominada *Pseudomonas atlantica* (54), ahora ha sido asignada a un nuevo género, *Pseudoalteromonas*, junto a un número de especies de *Alteromonas*, basados en la secuenciación de genes 16S de ARNr (55).

Estas bacterias tienen forma de bastón, son móviles, gram negativas y se encuentran en los océanos de todo el mundo como en biopelículas adheridas a las superficies. La bacteria posee su motilidad a través de un flagelo polar único, que ayuda a empujarla de un lado a otro entre las superficies sólidas y el mar abierto en busca de fuentes de alimentos. Las células bacterianas generalmente se encuentran solas o en parejas. Obtienen energía a través de mecanismos quimioorganotróficas (54).

La *P. atlantica* es considerada psicrófila, esto pone un límite a su crecimiento, ya que la mayoría de psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5 °C, aunque su rango de temperaturas de crecimiento puede ir desde los 20 °C hasta menos de 0 °C (56).

Las variaciones de temperaturas, pH y salinidad del medio ambiente en el que se encuentren estos organismos son de decisiva importancia para su crecimiento. El

régimen de salinidad del hielo marino varía durante el proceso de formación, así como el pH debido a la actividad biológica o la precipitación de carbonatos (57, 58). Los psicrófilos han desarrollado mecanismos de adaptación para realizar sus funciones metabólicas a bajas temperaturas incorporando características únicas en sus proteínas y membranas. Comparando con las proteínas de los mesófilos, las proteínas de los psicrófilos muestran una disminución en interacciones iónicas y enlaces del hidrógeno, poseen menos grupos hidrofóbicos y más grupos cargados en su superficie. Debido a estas modificaciones, a bajas temperaturas, las proteínas de la *P. atlantica* pierden rigidez y ganan flexibilidad estructural para la realización de sus funciones catalíticas. Así también, las membranas de la *P. atlantica* contiene una mayor proporción de ácidos grasos no saturados, por lo que su fluidez y capacidad de transportar los nutrimentos se mantienen bajo condiciones muy frías (59-63).

También es una bacteria que forma una biopelícula, la cual es importante para la biorremediación. Como muchas de las especies de *Pseudoalteromonas*, la *P. atlantica* es encontrada en asociación con huéspedes eucarióticos marinos (algas, cangrejos) (54, 64); en columnas de agua (65, 66) y produciendo una variedad de componentes extracelulares biológicamente activos (67). Estos compuestos a menudo influyen en la sucesión de comunidades marinas; como por ejemplo, muchas especies de *Pseudoalteromonas* producen antibacterianos, antifúngicos, antivirales y/o moléculas algicidas, mientras que otras producen componentes como polisacáridos extracelulares que facilitan el asentamiento de tónicas y ostras de larvas (67). También es una bacteria que descompone el agar, ya que produce agarasa que es ampliamente utilizado y además, las cepas de *Pseudoalteromonas atlantica* son consideradas como una fuente industrial de agarasas (54, 68).

En muestras pelágicas del Mar del Norte y en cultivos de lotes mixtos, la *P. atlantica* muestra un corto retraso de crecimiento sobre la adición de sustratos de crecimiento (<12 horas); esto predomina en cultivos hasta 48 horas aproximadamente cuando otra bacteria sobrepasa a la *P. atlantica* en total de masa celular por mL de cultivo (66). Estas propiedades de la *P. atlantica* sugieren que es el colonizador pionero en diferentes hábitat marinos y es por eso que despierta un gran interés en entender su potencial en el reciclaje de elementos, materiales de producción, etc.; los cuales serían revelados por la secuenciación del genoma.

2.3.2 Clasificación científica

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Proteobacteria Gamma
Orden	: Alteromonadales
Familia	: Pseudoalteromonadaceae
Género	: Pseudoalteromonas
Especies	: <i>P. agarivorans</i> , <i>P. antarctica</i> , <i>P. atlantica</i> , <i>P. aurantia</i> , <i>P. bacteriolítica</i> , <i>P. carrageenovora</i> , <i>P. citrea</i> , <i>P. denitrificans</i> , <i>P. distincta</i> , <i>P. elyakovii</i> , <i>P. espejiana</i> , <i>P. flavipulchra</i> , <i>P. haloplanktis</i> , <i>P. haloplanktis tetraodonis</i> , <i>P. issachenkonii</i> , <i>P. luteoviolacea</i> , <i>P. maricaloris</i> , <i>P. mariniglutinosa</i> , <i>P. paragorgicola</i> , <i>P. peptidolytica</i> , <i>P. phenolica</i> , <i>P. piscicida</i> , <i>P. prydzensis</i> , <i>P. rubra</i> , <i>P. ruthenica</i> , <i>P. sagamiensis</i> , <i>P. tetraodonis</i> , <i>P. translucida</i> , <i>P. tunicata</i> , <i>P. ulvae</i> y <i>P. undina</i> .

2.3.3 Estructura genómica

El tamaño del genoma de *P. atlantica* es de 5187007 megabases, y su contenido en GC es de 45 %. Su cromosoma es de forma circular y no tiene ningún tipo de plásmidos conocido.

El genoma de *P. atlantica* fue secuenciado por su producción de polisacáridos extracelulares durante la formación del biopelícula que muestran potencial en reciclaje, desintoxicación, y en producción de materiales (67).

2.3.4 Estructura celular y metabolismo

Entre los componentes extracelulares identificados en *P. atlantica* se incluyen enzimas que hidrolizan agar, alginatos, y carragenina (68), polisacáridos extracelulares (EPS) (65, 69), moléculas de señalización (homoserin lactonas) y proteasas (70).

En estudios realizados en la bahía de San Diego y en mar abierto frente a las costas de California, New Jersey y Florida, *P. atlantica* demostró ser una bacteria formadora de una biopelícula primaria y productor de grandes cantidades de EPS. Tras la formación del biopelículas por *P. atlantica*, los filamentos de la bacteria tienen una capacidad de utilización de nutrientes más limitada ligados a la superficie, y estos organismos son seguidos por diatomeas, microalgas y protozoos sésiles (65). Estos resultados indican que la *P. atlantica* coloniza superficies sólidas rápidamente, utilizando sustratos que son procesados para ser recibidos por sus agarasas secretadas, proteasas, etc.; y luego forman una biopelícula en el que los EPS concentran nutrientes y proveen sustratos para otros microorganismos marinos.

Otra posibilidad interesante de esta bacteria es que tiene la capacidad de cambiar polisacáridos extracelulares de adhesina dentro y fuera. El intercambio dentro y fuera es fundamental para el ciclo de vida de las bacterias debido a su necesidad de emigrar del océano abierto a la superficie sólida. Las adhesinas desaparecen cuando la bacteria necesita perder sus inserciones en una superficie sólida y viajar por el océano (65). Una vez que una superficie favorable se encuentra, la bacteria necesita de la adhesina para la inserción, después se empieza a formar la biopelícula.

P. atlantica es incapaz de utilizar DL-malato, D-sorbitol, o m-hidroxibenzoato para el metabolismo catabólico. Es capaz de hidrólisis de gelatina. La gelatina es una proteína que contiene aminoácidos esenciales y procede de la hidrólisis del colágeno de origen natural. Esta bacteria descompone el polímero de gelatina en aminoácidos individuales para formar nutrientes.

2.3.5 Ecología

La producción de los polisacáridos extracelulares de la *P. atlantica* en su biopelícula es utilizada generalmente en biorremediación. La biopelícula de la *P. atlantica* ha sido demostrado que absorbe de 20 – 40 % de trazas de metal de plomo a una concentración de 6 - 10 moles/litro en medio de crecimiento, en especial en estudios con biorreactores (71), y es así que podría jugar un rol en controlar la concentración de metales tóxicos en el medio acuático.

La bacteria tiene una inusual habilidad para regular su producción de EPS. La producción de EPS es controlada por un inusual sistema de recombinación de ADN participando la inserción reversible del elemento móvil IS492 en un lugar específico;

la fase de expresión variable del EPS aparece para responder las condiciones medioambientales (72, 73); por tal motivo, la bacteria puede regular su producción de EPS en términos de las condiciones del medioambiente presente.

2.3.6 Patología

La *P. atlantica* se ha demostrado que causa enfermedad infecciosa en el caparazón de cangrejos comestibles. Esta bacteria ha sido aislada de lesiones de cangrejos con enfermedad del caparazón, la cual es caracterizada por la progresiva degradación del caparazón, conduciendo a menudo a una infección de la hemolinfa y puede ser causada por *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Vibrio* u otros organismos marinos. Además de producir enzimas extracelulares que atacan el caparazón, la *P. atlantica* produce un lipopolisacárido, el que ha demostrado ser un factor de virulencia potencial en la enfermedad del caparazón (64). Así también, los estudios demuestran que los productos extracelulares de *P. atlantica* causan la muerte rápidamente cuando son inyectados en cangrejos sanos.

No hay estudios que demuestren que la *P. atlantica* es de algún modo perjudicial para los seres humanos.

2.3.7 Investigaciones actuales

Una investigación reciente mostró que los EPS de *P. atlantica* conducen a la muerte de cangrejos comestibles, *Cancer pagurus*. Los EPS son causa de la rápida disminución de hemocitos circulantes (64). Las células de la sangre comienzan a aglutinarse. Los cangrejos enfermos presentan síntomas como parálisis de las extremidades, retracción tallo óptico, y marcada disminución o falta de sensibilidad antenal (64). Estos síntomas sugieren un ataque del sistema nervioso. El EPS no se inactiva con tratamientos de alta temperatura o con digestión de la proteinasa K.

El lipopolisacárido (LPS) de *P. atlantica* fue estudiado como un posible candidato para el principal factor de virulencia. Este LPS se inyectó en cangrejos sanos y demostró causar los mismos síntomas y finalmente la muerte en un promedio de 90 minutos (64). Sin embargo, con la inyección del LPS no se observó disminución de hematocitos. En lugar de aglutinación, los hematocitos se desgranulan y finalmente se lisan (64). Los resultados muestran que el LPS de *P. atlantica* es el principal factor de virulencia del cangrejo comestible.

En otra investigación realizada recientemente en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Georgia por Higgins, Carpenter y Karls en *P. atlantica*, encontraron que la incisión de los elementos móviles (transporte) IS492 en el cromosoma de *P. atlantica*, regula la activación o desactivación para producción de EPS (74). Así también, la eliminación del IS492 convierte la producción de EPS de inactivo a activo. Este descubrimiento no es tan sorprendente debido al hecho de que en la mayoría de los organismos, los reordenamientos de ADN, como deleciones, inserciones, e inversiones controlan la expresión del ADN. La escisión del transposón IS492 es realizado por la enzima transposasa, cuyo gen se denomina Moov (74). La frecuencia de la escisión transposasa-dependientes es muy alta y está regulada por el nivel de Moov. Cuando el nivel de Moov o, en otras palabras, la expresión de transposasa es alta, la transposasa alcanza un umbral crítico requerido para la escisión del transposón IS492. En resumen, cuando una célula detecta una señal para producir más EPS, el nivel de Moov aumenta, e incrementa la expresión externa del transposón, el cual permite la escisión de la IS492 y vuelve a producirse EPS inactivo a activo, una vez que alcanza una concentración crítica (74).

Una investigación reciente final se centra en la posible contribución de *P. atlantica* en la biorremediación. El efecto de *P. atlantica* en la aleación de aluminio fue estudiado por un equipo de investigación de la Universidad de Rhode Island. El estudio comprendió un control, aleación de aluminio en medio sin *P. atlantica*, y una muestra de aleación de aluminio con la bacteria (75).

Los resultados del análisis sugirieron que, la presencia de la bacteria redujo la resistencia de transferencia de carga de aleación de aluminio, lo que significa que la corrosión se incrementa (75). Este resultado sugiere que puede atribuirse a la capacidad de la bacteria para formar una biopelícula conteniendo polímeros ácidos en la superficie de la aleación de metal. Los polímeros ácidos mantendrían un ambiente corrosivo sobre la superficie y causarían el aumento de la velocidad de corrosión (75).

Pseudoalteromonas atlantica T6c (ATCC BAA-1087) fue aislada de una biopelícula en la Bahía de San Diego en California. La secuenciación del genoma de este organismo proporcionará información sobre la producción y regulación de los compuestos que intervienen en la formación de la biopelícula, la degradación de concha, y la virulencia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVO DE *Pseudoalteromonas atlantica*

Pseudoalteromonas atlantica PAR 2 procede del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y fue aislada de aguas profundas de la bahía de Paracas.

Se utilizó como cepa tipo a *P. atlantica* CECT579, la cual fue donada por la Colección Española de Cultivos Tipo.

3.1.1 Reactivación de la cepa

La bacteria se sembró en un tubo estéril conteniendo 2 mL de medio LB (Luria-Bertani) (Anexo 1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se agregó 1 mL del inóculo a 100 mL de medio LB y se incubó a la temperatura antes mencionada, con agitación de 150 rpm por 24 horas.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Para determinar la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* aislada, se realizó la prueba de actividad lipolítica sobre agar tributirina según el método propuesto por Anderson en 1939 (76). Se cultivó la bacteria en agar SW 5 %, conteniendo tributirina (Anexo 1), se emulsificó la tributirina al 1 % (Aldrich) con tritón al 0,1 % (Merck), siendo ambos esterilizados por separado.

Se incubó la bacteria a temperatura ambiente por 48 horas. La formación de halos translúcidos alrededor de las colonias, se reportó como positivo (77, 78), los diámetros de hidrólisis se midieron con un vernier (42).

Del mismo modo, se utilizó el mismo medio base conteniendo por un lado tween 80 y por otro, aceite de oliva al 1 %.

3.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA

3.3.1 Efecto de la temperatura

Para determinar la temperatura óptima de producción de enzimas lipolíticas de *Pseudoalteromonas atlantica*, se sembró la bacteria en agar SW 5 %, conteniendo tributirina 1 % (Anexo 1).

La prueba se realizó por duplicado a 4, 20, 37 y 45 °C. A las 72 horas, se realizó la lectura de los halos de hidrólisis.

3.3.2 Efecto del pH

Para determinar el pH óptimo de producción de enzimas lipolíticas de *Pseudoalteromonas atlantica*, se sembró la bacteria en agar SW 5 %, conteniendo tributirina 1 % (Anexo 1).

Los medios de cultivo se ajustaron con NaOH 1 N y HCl 1 N a pH 5, 7, 8 y 9, se incubó a 20 °C. A las 72 horas, se realizó la lectura de los halos de hidrólisis.

3.3.3 Efecto de la concentración de sales

Para determinar la concentración de sales óptima en la producción de enzimas lipolíticas de *Pseudoalteromonas atlantica*, se sembró la bacteria en agar tributirina 1 % conteniendo diferentes concentraciones de SW, estas fueron 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; hasta 20,0 %, se incubó a 20 °C. A las 72 horas, se realizó la lectura de los halos de hidrólisis.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN EL EXTRACTO CRUDO

Inicialmente, se realizó un pre inóculo de *Pseudoalteromonas atlantica* en medio líquido conteniendo SW 5 % y extracto de levadura 0,5 %; se incubó a 20 °C por 24 horas. Luego, se inoculó 1 mL del cultivo en 50 mL de medio líquido SW 5 %, conteniendo tributirina al 1 % (Aldrich), tritón al 0,1 % (Merck) y extracto de levadura 0,2 % (Anexo 1); se incubó a 20 °C por 24 horas.

Después, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación a 10000 rpm por 10 min, el sobrenadante se filtró en membrana 0.22 µm. Al filtrado se denominó extracto crudo, el cual se conservó en refrigeración para realizar las pruebas relacionadas con la actividad lipolítica.

Para cuantificar la actividad enzimática se utilizó como sustrato cromogénico el *p*-nitrofenil acetato (*p*-NFA) 50 mM disuelto en acetona (49). La mezcla de reacción para medir la actividad enzimática contenía 1 mL de sustrato cromogénico diluido en 5 mL de solución de buffer fosfato a una concentración de 25 mM pH 7, goma arábica 0,0125 g y tritón X-100 0,1 mL; a la mezcla se añadió buffer fosfato hasta 10 mL.

En un tubo de ensayo se adicionaron 250 µL del extracto crudo, a continuación se adicionaron 1750 µL de mezcla de reacción, se homogenizó en el vórtex por 30 segundos, luego se incubó a 20 °C por 15 min; finalmente, se leyó en el espectrofotómetro a 405 nm, utilizándose como blanco la mezcla de reacción sin el extracto crudo.

La determinación de la actividad lipolítica se determinó en base a la cuantificación del *p*-nitrofenol liberado por la acción de las esterasas. Se define como unidad internacional (UI) a la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 micromol de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NFA) por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente (50).

La curva de calibración se realizó usando concentraciones de 10 a 160 $\mu\text{mol/mL}$ de *p*-nitrofenol en buffer fosfato a una concentración de 25 mM, pH 7 (Anexo 3) (79, 80).

3.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford, el cual se basa en emplear un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico (Coomasie Blue G-250) y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes, tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol.

En un tubo se añadió 1 mL del reactivo de Bradford y 20 μL de extracto crudo, se incubó a 20 °C por 20 min. Se agitó y a continuación se procedió con la lectura de la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

La curva de calibración se realizó usando concentraciones de 6,25 a 50,00 $\mu\text{g/mL}$ de BSA a partir de una solución stock de 1 mg/mL (Anexo 4).

3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

La actividad específica de la enzima lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* se determinó expresando la actividad en micromoles (μmol), por miligramo (mg) de proteína.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad lipolítica } (\mu\text{mol/mL})}{\text{Concentración de proteínas totales (mg/mL)}}$$

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1 CULTIVO DE *Pseudoalteromonas atlantica*

Los métodos tradicionales para reactivación de cepas sugieren la utilización de medio LB (Luria-Bertani) a temperatura ambiente y agitación a 150 rpm por 24 horas. En ese sentido, se optó por este método para lograr una reactivación de la cepa previa al análisis de la actividad lipolítica de la enzima.

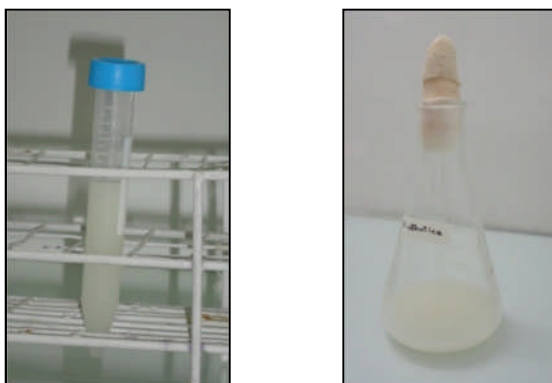


Figura 7: Cultivo de *Pseudoalteromonas atlántica* PAR 2 a temperatura ambiente

4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Las cepas presentaron un halo transparente alrededor de su crecimiento debido a la presencia de lipasas que hidrolizan el gliceril tributirato (tributirina) del medio.

Finalmente, con la ayuda de un vernier se midió los diámetros de los halos que aparecieron alrededor de la colonia (Figura 8). En la Figura 8 A, se observa un halo de la cepa de referencia *P. atlantica* CECT579 de 1.2 cm de diámetro, la cual presenta actividad agarolítica; así mismo, en la Figura 8 B, correspondiente a la cepa en estudio el diámetro del halo fue de 1.1 cm; por lo que también se observa actividad agarolítica. Sin embargo, cuando se cultivó en medios sólidos conteniendo

por un lado tween 80 y por otro, aceite de oliva, no se detectó ningún halo de hidrólisis.

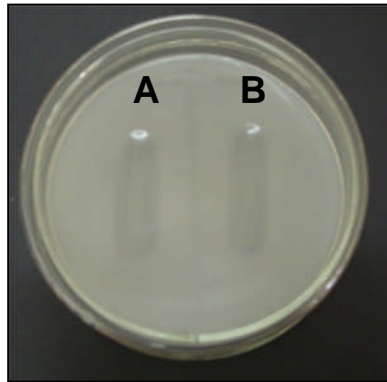


Figura 8: *P. atlantica* en Agar SW 5 % suplementado con tributirina
A, CECT 579; B, PAR 2

4.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA LIPOLÍTICA

4.3.1 Efecto de la temperatura

La temperatura óptima de crecimiento de la bacteria fue 20 °C, del mismo modo se incrementó la producción de las enzimas lipolíticas (Anexo 2).

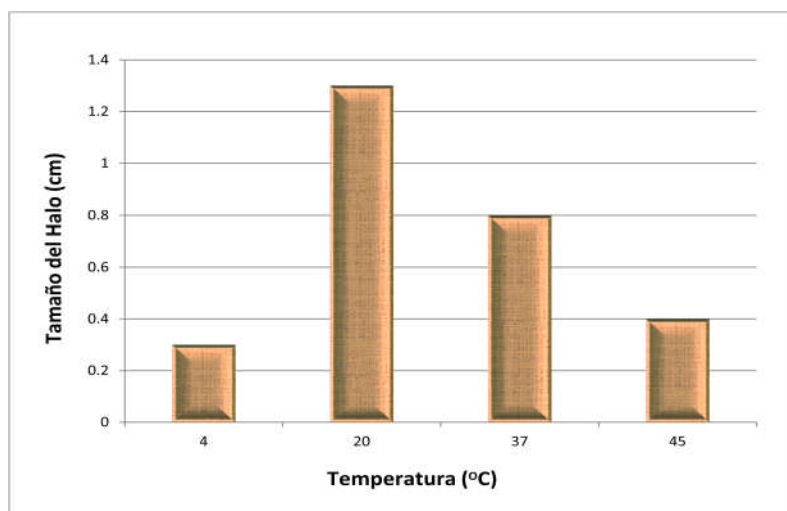


Figura 9: Efecto de la temperatura en la producción de enzimas lipolíticas de *P. atlantica*.

4.3.2 Efecto del pH

El pH óptimo de crecimiento y producción de enzimas en medio sólido fue de 7; sin embargo, crece entre pH 5 y 9 (Anexo 2).

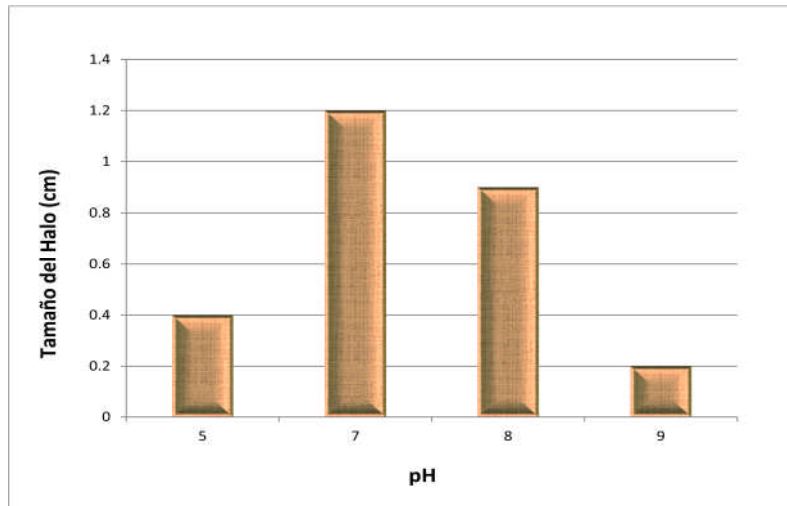


Figura 10: Efecto del pH en la producción de enzimas lipolíticas de *P. atlantica*.

4.3.3 Efecto de la concentración de sales

La concentración de sales óptima para el crecimiento y producción fue de 5 % y el rango de tolerancia salina fue de 2,5 a 15 % (p/v) de sales (Anexo 2).

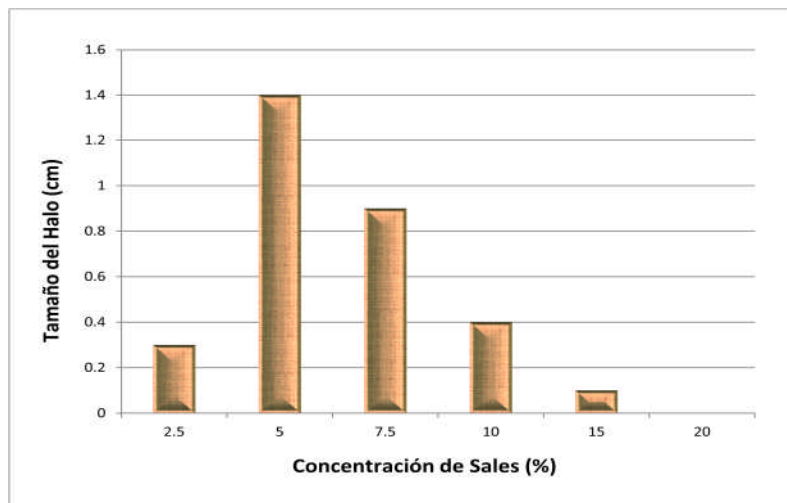


Figura 11: Efecto de la concentración de sales en la producción de enzimas lipolíticas de *P. atlantica*.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN EL EXTRACTO CRUDO

En el extracto crudo se determinó la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica*, la cual mostró los siguientes resultados:

MUESTRA ANALIZADA	Absorbancia 405 nm (Y)	
	M1	M2
p-NF	0,116	0,122

En el sobrenadante del cultivo de extracto crudo de *Pseudoalteromonas atlantica* se determinó la actividad de la enzima lipolítica, la cual fue proporcional a la liberación de p-NF; para lo cual se obtiene la ecuación lineal a partir de la curva de calibración: (Anexo 3)

$$Y = 0,0061X - 0,002$$

Donde:

X representa concentración de p-NF ($\mu\text{mol/mL}$)

Y representa la absorbancia

Se deduce que:

M1		M2	
Y	X	Y	X
0,116	19,340	0,122	20,320

Considerando 1 mL de MP: **79,32 $\mu\text{mol} / \text{mL}$ de extracto crudo**

4.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES

En la determinación de proteínas totales del extracto crudo se obtuvieron las siguientes lecturas:

MUESTRA ANALIZADA	Absorbancia 595 nm (Y)	
	M1	M2
Extracto enzimático de <i>P. atlantica</i>	0,100	0,120

Se determinó la concentración de proteínas totales; para lo cual se consideró la ecuación lineal obtenida de la curva de calibración: (Anexo 4)

$$Y = 0,0165X + 0,0708$$

Donde:

X representa concentración de proteínas totales ($\mu\text{g/mL}$)

Y representa la absorbancia

Se deduce que:

M1		M2	
Y	X	Y	X
0,100	1,769	0,120	2,982

Considerando 1 mL de MP: **118,775 μg Proteína / mL de extracto crudo**

4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Por fórmula:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad lipolítica } (\mu\text{mol/mL})}{\text{Concentración de proteínas totales (mg/mL)}}$$

Considerando los datos hallados previamente, tenemos que:

PARÁMETRO DETERMINADO	PROMEDIO M1 & M2
ACTIVIDAD LIPOLÍTICA ($\mu\text{mol} / \text{mL}$)	79,32
PROTEÍNAS TOTALES (mg / mL)	0,12
ACTIVIDAD ESPECÍFICA ($\mu\text{mol} / \text{mg}$)	661,00

V. DISCUSIÓN

Pseudoalteromonas atlantica PAR 2 fue seleccionada a partir de doce cepas bacterianas aisladas de aguas profundas de la Bahía de Paracas, por presentar un perfil lipolítico aún no descrito.

En base a las referencias sobre actividad lipolítica, se determinó que *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2 produce enzimas lipolíticas del grupo VI; dentro de esta familia se incluyen falsas lipasas denominadas estererasas, las cuales presentan la capacidad de hidrolizar ésteres y triacilglicéridos de cadena corta; tal es el caso de *P. atlantica* PAR 2 que hidroliza tributirina pero no tween 80 o aceite de oliva.

Por otro lado, se estudiaron las condiciones óptimas de crecimiento y producción de las enzimas lipolíticas. En la Figura 9 se observa que la bacteria produce mayor concentración de enzima y mayor actividad enzimática a 20 °C, estas características concuerdan con enzimas agarolíticas y estererasas aisladas a partir de estudios de metagenomas y descritos por Xu y col., 2010 (81). Las enzimas actúan de acuerdo a las características específicas del organismo al que pertenecen y al nicho ecológico de donde proceden.

De igual forma, en la Figura 10 se observa que el pH de crecimiento y producción de enzimas lipolíticas de *P. atlantica* PAR 2 fue 7; esto debido a que las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos -COOH; amino -NH₂; tiol -SH; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra; que permiten estabilizar a las proteínas secretadas en el medio de cultivo. La variación en el pH puede disminuir la actividad enzimática por desnaturalización de la estructura proteica rompiendo enlaces iónicos y puentes de hidrógeno. Por lo tanto, se infiere que el pH óptimo para la actividad de enzimas lipolíticas como las estererasas es de

7, resultado que coincide con lo descrito por Vera y col., 1998 (82), para enzimas agarolíticas de *Pseudoalteromonas sp.*

Así también, se muestra en la Figura 11 que la producción de la enzima lipolítica varió con la concentración de sales; siendo el óptimo al 5 % (p/v). Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de sales, la actividad disminuye.

Por otro lado, se utilizó el *p*-nitrofenil acetato, por ser un sustrato cromogénico específico para esterases, que actúan sobre un éster de cadena corta, considerando que la enzima lipolítica no hidrolizó tween 80 y aceite de oliva; estos resultados confirman que la actividad lipolítica de *P. atlantica* se debe a una esterasa, falsa lipasa, que actúan sobre sustratos de cadena corta según lo descrito por Prim y col., 2006 (83).

Finalmente, la actividad específica de la esterasa producida por *P. atlantica* PAR 2 en el extracto crudo fue de 661,00 μ moles/mg de proteína, lo cual indica que la enzima tiene una alta actividad enzimática, similar a la obtenida de esterases de *Bacillus subtilis*, descrito por Kaiser y col., 2006 (84).

VI. CONCLUSIONES

La caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* PAR 2 aislada de la bahía de Paracas nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. *Pseudoalteromonas atlantica* presenta actividad lipolítica en agar tributirina 1 %.
2. Las condiciones óptimas de crecimiento y producción de enzimas lipolíticas de *Pseudoalteromonas atlantica* fueron las siguientes: 20 °C, pH 7 y concentración salina 5 %.
3. La actividad enzimática y específica de las enzimas lipolíticas de *Pseudoalteromonas atlantica* en el extracto crudo fueron 79,32 $\mu\text{mol/mL}$ y 661,00 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- a. Determinar los inductores para incrementar la producción de la esterasa de *Pseudoalteromonas atlantica*.
- b. Determinar las variables cinéticas de la esterasa y el rango de sustratos de cadena corta.
- c. Determinar los genes y el clonaje de los mismos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alarcón M. Producción de la lipasa Lip2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: Caracterización y aplicación en reacciones de síntesis. Tesis para optar el grado de Doctor en Biotecnología. 2008. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona – España.
2. Verger R, Rivière C, Moreau H, Gargouri Y, Rogalska E, et al. Enzyme Kinetics of Lipolysis. In *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. Gbf Monographs. 1990; 16: 105-116.
3. Jaeger K, Dijkstra B, Reetz M. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Microbiol.* 1999; 53: 315–51.
4. Sarda L, Desnuelle P. Action of pancreatic lipase on emulsified esters. *Biochim Biophys.* 1958; 30: 513-521.
5. Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson DM, et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* 1991; 351: 491-94.
6. Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM, Derewenda ZS. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry.* 1992; 31: 1532–41.
7. Van Tilbeurgh H, Egloff MP, Martinez C, Rugani N, Verger R, et al. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* 1993; 362: 814–20.
8. Verger R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 1997; 15: 32-38.

9. Ferrato F, Carriere F, Sarda L, Verger R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. 1997; 327–47.
10. Jensen RG. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*. 1983; 18: 650–57.
11. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994; 15: 29-63.
12. Muderhwa J, Brockman H. Lateral lipid distribution is a major regulator of lipase activity. Implications for lipid-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 24184-92.
13. Smaby J, Muderhwa J, Brockman H. Is lateral phase separation required for fatty acid to stimulate lipases in a phosphatidylcholine interface?. *Biochemistry*. 1994; 33: 1915-22.
14. Skupin R, Cooper T, Frohlich R, Prigge J, Haufe G. Lipase-catalyzed resolution of both enantiomers of Ornidazole and some analogues. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1997; 8(14): 2453-64.
15. Gil N, Bosch M, Guerrero A. Chemoenzymatic Synthesis of (R)-(+)- α -(4-Fluorophenyl)-4(2-pyrimidinyl)-1-piperaziebutanol and (R)-(+)- α -(4-Fluorophenyl)-4-methyl-1-piperaziebutanol as Potencial Antipsychotic Agents. *Tetrahedron*. 1997; 53(44): 15115-22.
16. Lee SH, Park O, Uh H. A chemoenzymatic approach to the synthesis of enantiomerically pure (S)-3-hydroxy-gamma-butyrolactone. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 1.
17. Dandavate V, Madamwar D. Reusability of surfactant-coated *Candida rugosa* lipase immobilized in gelatin microemulsion-based organogels for ethyl isovalerate synthesis. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(4): 735-41.

18. Macrae AR. Microbial enzymes and technology. Ed. Fogarty, W. M. Applied Science. 1983; 225-50.
19. Macrae AR, Hammond R. Present and future applications so lipases. Biotech. Gen. Engin. 1985; 3: 193-217.
20. Borgstrom B, Brocman H. Lipases. Elsevier Science Publisher B. V. 1984.
21. Sidebottom C, Charton E, Dunn P, Mycock G, Davies C, et al. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. Eur. J. Biochem. 1991; 202: 485-91.
22. Schmidt-Dannert C, Rua ML, Wahl S, Schmid RD. *Bacillus thermocatenuatus* lipase: a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. Biochem. Soc. Trans. 1997; 25: 178–82.
23. Simons J-WFA, Boots J-WP, Kats MP, Slotboom AJ, et al. Dissecting the catalytic mechanism of staphylococcal lipases: chain length selectivity, interfacial activation and cofactor dependence. Biochemistry. 1997; 36: 14539–50.
24. Upton C, Buckley JT. A new family of lipolytic enzymes. Trends Biochem. Sci. 1995; 20: 178–79.
25. Loveless BJ, Saier JMH. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. Mol. Membr. Biol. 1997; 14: 113-23.
26. Langin D, Laurell H, Holst LS, Belfrage P, Holm C. Gene organization and primary structure of human hormonesensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase from *Moraxella* TA144, an Antarctic bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 4897–901.
27. Simons J-WFA, Van Kampen MD, Riel S, Gotz F, et al. Cloning, purification and characterization of the lipase *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 1998; 253: 675–83.

28. Berger JL, Lee BH, Lacroix C. Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995; 44: 81–7.
29. Jarvis GM, Thiele JH. Qualitative Rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 1997; 29: 41-7.
30. Svetlitsnyi V, Rainey F, Wiegel J. *Thermosynthropha lipolytica* gen. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and long chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; 46:1131–37.
31. Know S, Song K, Hong W, Rhee J. Removal of water produced from lipase-catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. *Biotechnol Bioeng.* 1995; 46, 1-12.
32. López N. Inmobilizació de diferents lipàsics *Candida rugosa* i aplicació en la resolució de compostos quirals d'interés farmacèutic. Utilizació dels isoenzims Lip1, Lip2 i Lip3 purs. Máster Universitario. Universitat autònoma de Barcelona. Bellaterra. 2001; 104.
33. Sánchez A. Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa* aplicación a la resolución de compuesto a quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis para optar el grado de Doctor en Ingeniería Química. 1998. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
34. Cos O, Ramon R, Montesinos J, Valero F. A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess, biotechnology and bioengineering. 2006; 95(1): 145-54.
35. Pedroza A, Poutou R, Álvarez N. Estudio de la diversidad microbiana y metabólica. *Universitas Scientiarum* 1997; 2: 130-4.

36. Anguita J, Rodriguez-Aparicio L, Naharro G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 2411 – 17.
37. Lee K, Ellis A. Glycerophospholipid cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolyisin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 5382–93.
38. Algeciras N, Barrera R, Martínez M, Pedroza A, et al. Desarrollo de un sistema de biofiltración con bacterias proteolíticas y amilolíticas inmovilizadas utilizando subproductos del beneficio de café. *Journal of the Mexican Chemical Society.* México. 2002; 46(3): 271-276.
39. Sánchez-Porro C, Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracelular hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol.* 2003; 94: 295-300.
40. West P, Colwell R. Identification and classification of Vibrionaceae and overview. In *Vibrios in the environment.* Colwell, R.R. EE.UU. 1984; 258-363.
41. Amador-López R, Fernández-Redón E, Rodríguez-Montaño R. *Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria*, 2da Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, DF, 1993.
42. Martín B. Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares, estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Tesis para optar el grado de Doctor en Ingeniería Química. 2005. Universidad de Girona, Girona.
43. Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53 (1): 211-13.

44. Vitorino S, Neves E, Gaspar F, Figueiredo J, San Romao M, Suberin utilization by *Chrysonilia sitophila*: evidence for lipolytic enzymes production. *Ciencia Tec Vitiv*. 2007; 22(1): 1-4.
45. Gupta N, Rathi P, Gupta R. Simplified para-nitrofenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*. 2002; 311: 98-9.
46. Prim N, Sanchez M, Ruiz C, Pastor J, Díaz P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of molecular catálisis B: Enzymatic*. 2003; 22: 339-46.
47. Henne A, Schmitz R, Bomeke M, Gottschalk G, Daniel R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2000; 66(7): 3113-16.
48. Ciafardini G, Zullo B, Iride A. Lipase production by yeast from extra virgin olive oil. *Food microbiology*. 2006; 23: 60-7.
49. Ateslier Z, Metin K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38: 628-35.
50. Guisán J, Bastida A, Sabuquillo P, Armasen P, et al. A single step purification immobilization and hiperactivation of lipases via interfacial. Adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998; 58: 486-93.
51. Saad R. Production of lipase from *Aspergillus tamari* and its compatibility with commercial detergents. *Folia Microbiologica*. 1995; 40(3): 263-6.
52. Rogalska E, Ransac S, Verger R. Controlling lipase stereoselectivity via the surface pressure. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(2): 792-94.
53. Bourguet N, Torreton J, Galy O, Arondel V, Goutx M. Application of a specific and sensitive radiometric assay for microbial lipase activities in marine water

- samples from the Lagoon of Noumea. Applied and environmental microbiology. 2003; 69 (12): 7395-400.
54. Yaphe W. The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). Can J Microbiol. 1957; 3 (7): 987-93.
55. Gauthier G, Gauthier M. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* , and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45 (4): 755-61.
56. Madigan M, Martinko J, Parker J. Diversidad Procariótica: Archea. En: Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. (eds). Brock Microbiología de los Microorganismos. 10ma edición. Ed. Pearson-Prentice Hall. Madrid. 2003; 741-66.
57. Bowman JP, Mccammon SA, Brown M, Nichols D, Mcmeekin T. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63: 3068-3078.
58. Grossmann S, Gleitz M. Microbial responses to experimental sea ice formation: implications for the establishment of Antarctic sea ice communities. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 1993; 173: 273-89.
59. Cavicchioli R, Siddiqui K, Andrews D, Sowers K. Low- temperature extremophiles and their applications. Current Opinion in Biotechnology. 2002; 13: 253-61.
60. Deming J.W. Psicrófilos and polar regions current opinion in microbiology. 2002; 5: 301-09.
61. Margesin R, Feller G, Gerday C, Russell N. Cold-adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. En: The Bitton Ed.,

- Encyclopedia of Environmental Microbiology. G. John Wiley & Sons. EE.UU. 2002; 2: 871-85.
62. Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, Nature Reviews Microbiology. 2003; 1: 200-208.
63. Georlette D, Blaise V, Collins T, D'Amico S, Gratia E, Hoyoux A, Marx J, Sonan G, Feller G, Gerday C. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. FEMS Microbiology Reviews. 2004; 28: 25-42.
64. Costa-Ramos C, Rowley A. Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus*. Appl Environ Microbiol. 2004; 70 (2): 729-35.
65. Corpe WA. Microfouling: The role of primary film forming marine bacteria. Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling. R. F. Acker, Brown, B.F., DePalma, J.R., and Iverson, W.P. Evanston, Ill, Northwestern U.P. 1973; 598-609.
66. Pernthaler A, Pernthaler J. Growth patterns of two marine isolates: adaptations to substrate patchiness. Appl Environ Microbiol. 2001; 67 (9): 4077-83.
67. Holmstrom C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol Ecol. 1999; 30 (4): 285-93.
68. Akagawa-Matsushita M, Matsuo M, Koga Y, Yamasato K. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42 (4): 621-7.
69. Uhlinger D, White D. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. Appl Environ Microbiol. 1983; 45: 64-70.

70. Hoffman M, Decho A. Proteolytic enzymes in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology*. 2000; 23: 29-39.
71. Hsieh K, Lion L. Bioreactor for the study of defined interactions of toxic metals and biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 50 (5): 1155-61.
72. Bartlett D, Wright M, Silverman M. Variable expression of extracellular polysaccharide in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica* is controlled by genome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci. EE.UU.* 1988; 85: 3923-27.
73. Perkins-Balding D, Duval-Valentin G. Excision of IS 492 requires flanking target sequences and results in circle formation in *Pseudoalteromonas atlantica*. *J Bacteriol*. 1999; 181 (16): 4937-48.
74. Higgins B, Carpenter Ch, Karls A. Chromosomal context directs high-frequency precise excision of IS492 in *Pseudoalteromonas atlantica*. *Biological Sciences*. 2006; 104(6): 1901-1906.
75. Cai H, Brown R, Rivero-Hudec M. Effect of *Pseudoalteromonas atlantica* on the Corrosion of Aluminum Alloy 2024. 204th Meeting. The Electrochemical Society. 2003.
76. Anderson J. The use of tributyrin agar in dairy bacteriology. *Int. Mikrobiol. Kongress*, 1939; 3: 726-28.
77. Sandoval G, Marty A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 40: 390-393.
78. Moreno M, García M, Ventosa A, Mellado E. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease producing extreme halophile. *Microbiol Ecol*. 2009; 68: 59-71.

79. Gilham D, Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. 2005; 36: 139-147.
80. Ertugrul S, Donmez G, Takac S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*. 2007; 149: 720-724.
81. Xu S, Hu Y, Yuan A, Zhu B. Cloning, expression and characterization of a novel esterase from marine sediment microbial metagenomic library. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2010; 50(7): 891-896.
82. Vera J, Álvarez R, Murano E, Slebe JC, León O. Identification of a Marine Agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64 (11): 4378-83.
83. Prim N, Bofill C, Pastor FI, Díaz P. Esterase EstA6 from *Pseudomonas* sp. CR-611 is a novel member in the utmost conserved cluster of family VI bacterial lipolytic enzymes. *Biochimie*. 2006; 88(7): 859-67.
84. Kaiser P, Raina C, Parshad R, Johri S, et al. A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr Purif*. 2006; 45(2): 262-8.

IX. ANEXOS

ANEXO 1
MEDIOS DE CULTIVO

Agar LB (Luria-Bertani)

Triptona	10,0 g/L
Extracto de levadura	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Agar	15,0 g/L

Agar SW 5 % suplementado con Tributirina

Tributirina (Aldrich)	10,0 mL/L
Tritón (Merck)	1,0 mL/L
Extracto de levadura	2,0 g/L
Agar	15,0 g/L
SW (30 %)	166,6 mL/L
H ₂ O	823,4 mL/L

Medio LB (Luria-Bertani)

Triptona	10,0 g/L
Extracto de levadura	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L

Medio SW 5 % suplementado con Tributirina

Tributirina (Aldrich)	10,0 mL/L
Tritón (Merck)	1,0 mL/L
Extracto de levadura	2,0 g/L
SW (30 %)	166,6 mL/L
H ₂ O	823,4 mL/L

Stock de agua de sales al 30 %

Cloruro de sodio	240,0 g/L
Cloruro de magnesio hexahidratado	30,0 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	35,0 g/L
Cloruro de potasio	7,0 g/L
Bromuro de sodio	0,8 g/L
Bicarbonato de sodio	0,2 g/L
Cloruro de calcio dihidratado	0,5 g/L
Agua destilada	c.s.p. 1L

ANEXO 2
**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA
 ENZIMA LIPOLÍTICA**

Tabla 2: Resultados obtenidos a variación de parámetros para temperatura.

Parámetros de Temperatura	4 °C	20 °C	37 °C	45 °C
Tamaño del halo (cm)	0.3	1.3	0.8	0.4

Tabla 3: Resultados obtenidos a variación de parámetros para pH.

Parámetros de pH	5	7	8	9
Tamaño del halo (cm)	0.4	1.2	0.9	0.2

Tabla 4: Resultados obtenidos a variación de la concentración de sales.

Parámetros de Concentración de Sales	2.5	5	7.5	10	15	20
Tamaño del halo (cm)	0.3	1.4	0.9	0.4	0.1	0.0

ANEXO 3**CURVA PATRÓN PARA DETERMINACIÓN DE ρ -NITROFENOL**

Se realizó una solución de ρ -nitrofenol fosfato a una concentración de 200 $\mu\text{mol/mL}$ en buffer fosfato 25 mM pH 7. A partir del stock se prepararon soluciones de 10 a 160 $\mu\text{mol/mL}$ de ρ -nitrofenol en buffer fosfato 25 mM pH 7 volumen final de 1 mL. A continuación se procedió a leer en espectrofotómetro a 405 ηm utilizando como blanco la solución de trabajo con buffer fosfato 25 mM pH 7. Finalmente se realizó la curva patrón graficando absorbancia en función de la concentración de ρ -nitrofenol $\mu\text{mol/mL}$.

Tabla 5: Diluciones y reactivos utilizados para elaboración de la curva patrón para determinación de ρ -nitrofenol liberado.

DETERMINACIÓN DE ρ -NITROFENOL	Diluciones en mL									
	C blanco	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Solución Stock ρ -NF 200 $\mu\text{mol/mL}$	0,0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Solución de Trabajo	1,0	0,95	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2
TOTAL	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

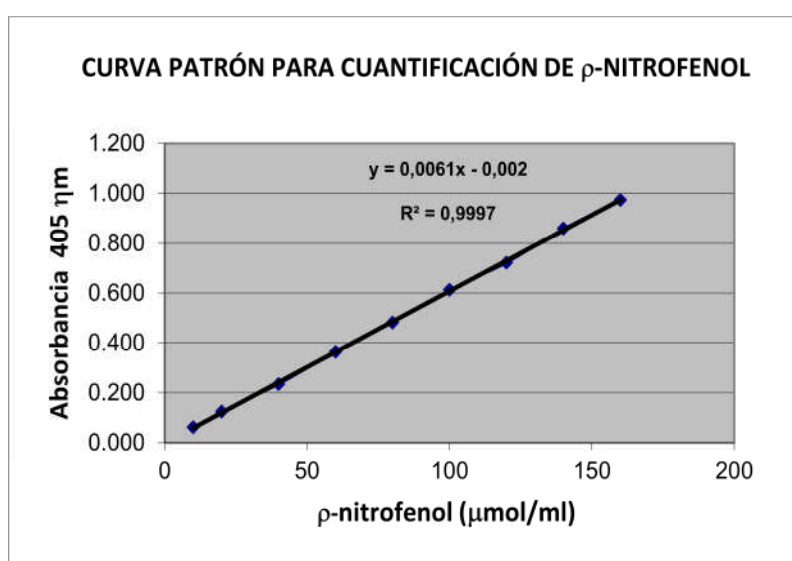


Figura 12: Gráfica de curva patrón para cuantificación de ρ -NF.

ANEXO 4**CURVA PATRÓN PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

Se realizó una solución de BSA a una concentración de 1 mg/mL en agua destilada. A partir del stock se hicieron diluciones con agua de 6,25; 12,50; 25,00; 37,50 y 50,00 $\mu\text{g/mL}$. Se agregó 0,02 mL de cada una de las diluciones y 1 mL del reactivo Bradford a cada tubo, dejándose reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió a leer en espectrofotómetro a 595 ηm utilizando como blanco agua y solución de reactivo Bradford.

Finalmente se realizó la curva patrón graficando absorbancia en función de la concentración de proteínas en $\mu\text{g/mL}$.

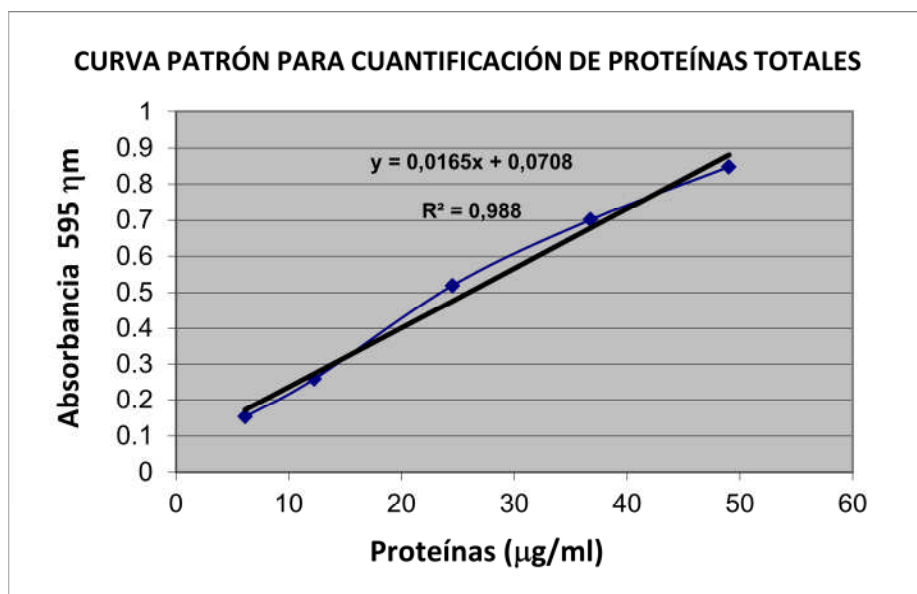


Figura 13: Gráfica de curva patrón para cuantificación de proteínas totales.