

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

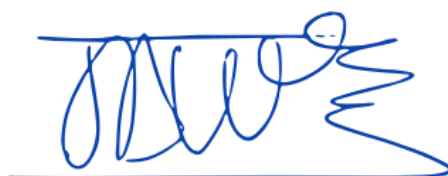
**Producción, extracción y caracterización de lipasas provenientes de la
levadura antártica *Guehomyces pullulans***

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

LUIS DAVID LASCANO DEMERA

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Luis David Lascano Demera ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end, positioned above a solid blue horizontal line.

Dr. Javier Carvajal Barriga

Director de la Disertación

Quito, 02 de julio de 2018

“No es la ciencia fetichizada la que descubre la realidad y menos la injusticia, tiene que ser una ciencia crítica”

-Enrique Dussel

“Dirán que pasó de moda la locura, dirán que la gente es mala y no merece; mas yo partiré soñando travesuras... acaso multiplicar panes y peces”

-Silvio Rodríguez

*Con todo mi amor,
A papá y mamá,
A mi hermana Angelita*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Neotropical de Investigación de la Biomasa (CNIB) y a mi director Dr. Javier Carvajal por entregarme el tema de tesis y abrirme las puertas del laboratorio.

A Patricia Portero y Alexandra Narváez por su amable ayuda y consejos.

A Berni, quien me brindó su sincera amistad dentro y fuera del laboratorio, acompañándome en mi labor. Su constante y sacrificado trabajo en el CNIB también hizo posible este trabajo.

A JuanFer, Migue y Daniel C, personas maravillosas y grandes amigos con quien tuve la suerte de encontrarme y forjar lazos con risas, canciones, pensamientos, anécdotas y experiencias que dieron sentido a mi trabajo. A Yeani y Mela, que siempre estuvieron atentas y comprometidas con el CNIB, brindando alegrías y consejos. Para mí, todos ustedes eran la esencia del laboratorio. Gracias por su acogida. A las tesisistas Dani V, Rena y Jenny, que de alguna u otra manera formaron parte en este camino.

A Chifle (Daniel Utreras), mi gran y mejor amigo desde el primer día en la U. Nos sentíamos “como en el colegio”. Sus ocurrencias y apoyo son invaluable, es un hermano para mi.

A Alicia C, su ayuda y enseñanzas siempre me guiaron cuando perdía el camino.

A Myriam y Edu, mi corazón lleno de gratitud e inmenso cariño. La solidaridad y el amor que me brindaron haciéndome parte de su hogar me fortaleció en todo momento.

Todo mi amor a mi Papá y a mi Mamá, esto es un símbolo de la vida y el amor que me entregan todos los días, de su esfuerzo por mi felicidad, por estar conmigo enseñándome y ayudándome, y por hacer de la familia refugio donde se comparte alegrías y tristezas. Para mi son ejemplo de verdadera grandeza. Los quiero mucho.

Y con broche de oro...A mi ñaña Angelita. Cuanta inteligencia, chispa y bondad. Hasta enojado o triste me haces reír, me escuchas y me muestras la otra cara de la moneda. Y cuando estamos alegres, somos imparables. Eres mi inspiración y mi alegría.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ΔG	Diferencia de energía libre
CLQCA	Colección de Levaduras Quito-Católica
EI	Índice Enzimático
<i>p</i> NPP	<i>para</i> -nitrofenil palmitato
<i>p</i> NP	<i>para</i> -nitrofenol
ϵ	Coefficiente de absorción molar
μM	Micromolar
U	Unidad de Enzima
A_{410}	Absorbancia medida a 410 nm
[S]	Concentración de sustrato
[S _E]	Concentración de sustrato estándar
ES	Complejo enzima-sustrato
[E _T]	Concentración de enzima total
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_{cat}	Constante catalítica
P	Producto formado
V_0	Velocidad de reacción
V_{max}	Velocidad máxima
BSA	Bovine Serum Albumin
Ser	Residuo serina
Asp	Residuo aspartato
His	Residuo histidina
Glu	Residuo Glutamato

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Enzimas microbianas.....	3
3.1.1. Aplicaciones de las enzimas microbianas.....	4
3.2. Lipasas: definición y características.....	4
3.2.1. Reacciones catalizadas por lipasas	5
3.2.2. Activación interfacial	5
3.2.3. Estructura	7
3.2.4. Cinética enzimática de lipasas	9
3.3. Fuentes de obtención de lipasas y aplicaciones.....	14
3.4. Enzimas de levaduras adaptadas al frío.....	15
3.5. Mercado mundial de enzimas	17
OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Cepa de levadura.....	20
4.2. Inducción a la producción de lipasas	20
4.3. Extracción y precipitación proteica.....	20
4.4. Cuantificación de proteínas	21
4.5. Análisis cualitativo de la producción de lipasas	21
4.6. Caracterización proteica por electroforesis SDS-PAGE.....	22
4.7. Cuantificación de la actividad enzimática de lipasas	22
4.7.1. Determinación de la concentración de para-nitrofenol (<i>p</i> NP).....	22
4.7.2. Determinación de la curva de progreso de lipasas	23

4.7.3. Cálculo de la velocidad de reacción	23
4.7.4. Cálculo de la actividad enzimática.....	24
4.8. Análisis cuantitativo de la producción de lipasas	24
4.9. Cinética enzimática.....	25
4.10. Análisis de la estabilidad térmica.....	26
4.11. Análisis del efecto del pH.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1. Inducción a la producción de lipasas	28
5.2. Obtección de lipasas por precipitación proteica.....	28
5.3. Determinación cualitativa de la actividad lipasa	28
5.4. Determinación del peso molecular de la lipasa	29
5.5. Cuantificación de la producción de lipasas	30
5.6. Cinética enzimática.....	33
5.7. Estabilidad térmica.....	35
5.8. Efecto del pH	36
6. CONCLUSIONES.....	38
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8. FIGURAS	48
9. TABLAS	54
10. ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sobrenadante extraído del medio de cultivo inductor. Se distingue una mezcla homogénea de color amarillo claro, debido a la degradación de los aceites por parte de las enzimas excretadas por la levadura48
- Figura 2.** Enzima parcialmente purificada. A. Se observa un precipitado blanco que corresponde al extracto proteico obtenido por salting-out con sulfato de amonio. B. Prueba de Bradford. La coloración azul indica la presencia de proteínas en la muestra.48
- Figura 3.** Detección de actividad lipasa en medio cromogénico. Se utilizaron los extractos proteicos obtenidos del medio inductor. A. Muestra concentrada (0.4 mg/mL). B. Muestra diluida en buffer (0.04 mg/mL). C. Muestra diluida en buffer (0.004 mg/mL). D. Buffer fosfato de sodio pH 7. E. Agua destilada. F. Muestra diluida en agua destilada (0.04 mg/mL). La formación de un anillo amarillo alrededor del pocillo A indica la actividad lipasa.49
- Figura 4.** Electroforesis SDS-PAGE de proteínas parcialmente purificadas. El peso molecular estimado para la lipasa fue entre 38-50 kDa. L. marcador de peso molecular, M1, M2 y M3 submuestras del extracto proteico49
- Figura 5.** Curvas de progreso en condiciones estándar para la lipasa de *Guehomyces pullulans* a diferentes concentraciones de sustrato. El avance de la reacción se siguió durante 30 minutos. Las concentraciones de sustrato (*p*NPP) utilizadas: $[S_1]= 7.9 \mu\text{M}$, $[S_2]=79 \mu\text{M}$, $[S_3]=400 \mu\text{M}$, $[S_E]= 790 \mu\text{M}$, $[S_4]= 1600 \mu\text{M}$. Las concentraciones $[S_2]$ y $[S_1]$ presentan el mismo comportamiento.50
- Figura 6.** Curva de progreso en condiciones estándar para la lipasa de *Guehomyces pullulans* producida en medio inductor con aceite de oliva. Las condiciones estándar son: 37°C, pH 7, concentración de sustrato (*p*NPP) estándar $[S_E]= 790 \mu\text{M}$. Se observa el avance de la reacción con velocidad $V_0 = 4.9 \mu\text{mol}/\text{min}$ y actividad enzimática 0.27 U/mL50

- Figura 7.** Cinética enzimática interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans*. La línea punteada representa el momento de activación interfacial a una concentración cercana a $400 \mu\text{M}$. Este punto indica la concentración micelar crítica.51
- Figura 8.** Representación doble recíproca Lineweaver-Burk de la cinética enzimática interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans* para todas las concentraciones de sustrato. La intersección con el eje x representa $-1/K_M$ y la intersección con el eje y representa $1/V_{\text{max}}$. La pendiente de la recta corresponde a K_M/V_{max}51
- Figura 9.** Representación doble recíproca Lineweaver-Burk de la cinética enzimática interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans* para tres concentraciones de sustrato. Las concentraciones utilizadas $[S_1]=7.9 \mu\text{M}$, $[S_2]=790 \mu\text{M}$ y $[S_3]=1600 \mu\text{M}$52
- Figura 10.** Ajuste alostérico-sigmoidal de la cinética interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans*.52
- Figura 11.** Efecto de la temperatura en la estabilidad térmica de la lipasa de *Guehomyces pullulans*. Se realizaron cuatro repeticiones. La temperatura óptima se encuentra en el rango de $40\text{-}50 \text{ }^\circ\text{C}$53
- Figura 12.** Efecto del pH en la actividad enzimática de la lipasa de *Guehomyces pullulans*. Se realizaron cuatro repeticiones. El valor óptimo de pH se situó en 8.0.53

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Velocidad inicial (V_0) y Actividad enzimática (U/L) en condiciones estándar de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* producida en medio inductor con aceite de oliva.54
- Tabla 2.** Velocidad inicial (V_0) de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* para cinco concentraciones de sustrato [S] en condiciones estándar (pH 7 y 37 °C).....54
- Tabla 3.** Parámetros cinéticos aparentes de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* ajustados al modelo Michaelis-Menten y Alostérico sigmoidal.....55
- Tabla 4.** Actividad enzimática de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* para distintos valores de temperatura.55
- Tabla 5.** Análisis de varianza de las actividades enzimáticas a distintas temperaturas56
- Tabla 6.** Prueba de Tukey para las actividades enzimáticas a distintas temperaturas56
- Tabla 7.** Actividad enzimática de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* para distintos valores de pH.56
- Tabla 8.** Análisis de varianza distintos valores de pH.57
- Tabla 9.** Prueba de Tukey para las actividades enzimáticas a distintos valores de pH.....57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Reacciones catalizadas por lipasas	58
Anexo 2. Estados fisicoquímicos de ésteres carboxílicos en medios acuosos. Todas las formas constituyen potenciales sustratos para lipasas.	59
Anexo 3. Actividades enzimáticas lipasa y esterasa en función de la concentración de sustrato. La actividad esterasa sigue la cinética de Michaelis-Menten, las lipasas presentan activación interfacial.	59
Anexo 4. Diagrama del plegamiento α/β hidrolasa de las lipasas	60
Anexo 5. Ataque nucleofílico en el sitio activo de lipasas.	61
Anexo 6. Mecanismo catalítico de lipasas.....	62
Anexo 7. Modelo cinético para el mecanismo de acción de lipasas en sustratos insolubles	63
Anexo 8. Aplicaciones de lipasas microbianas	63
Anexo 9. Curva estándar de <i>p</i> NP obtenida y utilizada en la construcción de curvas de progreso	64
Anexo 10. Esquema de la reacción catalizada por la lipasa usando <i>p</i> NPP como sustrato ..	64
Anexo 11. Curva estándar BSA obtenida y utilizada en la cuantificación de proteínas.	65

1. RESUMEN

Una de las aplicaciones más importantes en biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Las enzimas microbianas han ganado protagonismo por sus amplios usos en varios sectores industriales. Sin embargo, hasta el día de hoy, solo alrededor del 2% de los microorganismos conocidos se han probado como fuentes de enzimas. Uno de los grupos más importantes de enzimas es el conformado por las lipasas. Existe una demanda creciente de estos biocatalizadores debido a sus propiedades únicas y novedosas, tales como especificidad, estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura, selectividad quirál, acción en solventes orgánicos y la amplia gama de reacciones que pueden catalizar. Por este motivo, constituyen el más significativo grupo para aplicaciones biotecnológicas, entre ellas, la producción de biodiesel, fármacos enantiopuros, detergentes, etc. Las lipasas pueden ser producidas por varios microorganismos incluyendo levaduras, siendo principalmente obtenidas de *Candida rugosa*. En esta investigación, se buscó determinar la existencia de lipasas extracelulares de la levadura antártica *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073). Para ello, se realizó la producción, extracción y caracterización de la enzima. La actividad enzimática en condiciones estándar, usando en la inducción de lipasas aceite de oliva como sustrato, fue 268 U/L, valor que puede ser mejorado optimizando el medio de cultivo. Las condiciones óptimas de pH y temperatura determinadas en este estudio para la lipasa fueron 8.0 y 40°C, respectivamente. En cuanto a los parámetros cinéticos aparentes, se obtuvo un K_M de 3.7×10^{-4} M. Además, se detectó el fenómeno de catálisis interfacial en su cinética. En consecuencia, los resultados de este estudio deben considerarse como una base para futuras investigaciones y optimizaciones sobre la lipasa de *Guehomyces pullulans*.

Palabras clave: Enzimas, microorganismos, lipasas, levaduras, aplicaciones biotecnológicas, CLQCA, *Guehomyces pullulans*, actividad enzimática.

2. ABSTRACT

One of the most important applications in biotechnology is the production and use of enzymes. Currently, microbial enzymes have won global recognition for their extensive uses in various industrial sectors. However, until today only about 2% of the world's microorganisms have been tested as sources of enzymes. Lipases are the third most important category of enzymes. There is an increasing demand for these biocatalysts due to their unique and novel properties, such as specificity, stability of pH and temperature, chiral selectivity, action in organic solvents and the variety of reactions catalized. For this reason, constitute the most significant group for biotechnological applications, including the production of biodiesel, enantiopure drugs, detergents, etc. Lipases can be produced by several microorganisms including yeasts, being mainly obtained from *Candida rugosa*. In this research, we determine the existence of extracellular lipases from the Antarctic yeast *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073). For this, the production, extraction and characterization of the enzyme was carried out. The enzymatic activity under standard conditions, using olive oil as a substrate in the lipases induction, had a value of 268 U/L, which can be improved by optimizing the culture medium. The optimum conditions of pH and temperature for the lipase were 8.0 and 40°C respectively. Regarding the kinetic behavior, a K_M of 3.7×10^{-4} M was obtained. In addition, the phenomenon of interfacial catalysis was detected. Finally, this study constitutes a basis for future investigations and optimizations of *Guehomyces pullulans* lipase.

Key words: Enzymes, microorganisms, lipases, yeasts, biotechnological applications, CLQCA, *Guehomyces pullulans*, enzymatic activity.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ENZIMAS MICROBIANAS

Las enzimas son biocatalizadores que cumplen un rol esencial en el procesamiento de energía e información dentro de una célula, catalizando reacciones químicas que cumplen el Principio de Máxima Eficiencia Celular (Anbu, Gopinath, Chaulagain, y Lakshmipriya, 2017). Estructuralmente, son macromoléculas de naturaleza proteica y su función específica es acelerar reacciones disminuyendo la energía de activación sin alterar la diferencia de energía libre (ΔG) entre reactantes y productos (Berg, Tymoczko, y Stryer, 2014).

Los microorganismos han sido utilizados desde hace miles de años por las antiguas civilizaciones humanas. La primera aplicación industrial reportada fue la producción de bebidas alcohólicas de cebada, mediante el uso de levaduras, por Sumerios y Babilonios hace 6000 años a. C (Rajendra Singh, Kumar, Mittal, y Mehta, 2016). Actualmente, los microorganismos constituyen la fuente principal de enzimas por su facilidad de cultivo en grandes cantidades y cortos periodos de tiempo, además de estar sujetas a manipulaciones genéticas que permiten aumentar su producción. Igualmente, las enzimas microbianas reciben gran atención por su mayor actividad y estabilidad, en comparación con enzimas animales o vegetales. Por otra parte, algunos microorganismos han sufrido diversas adaptaciones que les permiten crecer y producir enzimas en condiciones adversas, lo cual conlleva a la producción de enzimas con características únicas (Li, Yang, Yang, Zhu, y Wang, 2012; Choi, Han, y Kim, 2015; Anbu et al., 2017).

Las levaduras, hongos unicelulares ascomicetos o basidiomicetos, son las principales fuentes de productos biotecnológicos en el mundo, excediendo en producción a otros microorganismos industriales. Entre los múltiples productos con potencial biotecnológico e industrial se encuentran las enzimas, como inulinasas, lactasas y lipasas, obtenidas de diferentes especies de levadura. Una de ellas es la levadura basidiomiceta *Guehomyces pullulans*, perteneciente al orden Cistofilobasidiales, la cual ha sido especialmente estudiada por la producción de la enzima β -galactosidasa, enzimas con actividad hidrolítica sobre la lactosa (Kurtzman, Fell, y Boekhout, 2011). La producción de lipasas por parte de *G. pullulans* fue reportada por Martorell et al. (2017), sin realizar caracterización de la enzima.

3.1.1. APLICACIONES DE LAS ENZIMAS MICROBIANAS

Una de las aplicaciones más comunes en biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Las enzimas microbianas han ganado reconocimiento global por sus usos en sectores industriales como alimento, agricultura, químicos, medicina y energía. Además, presentan ventajas sobre los catalizadores químicos más comunes, como son su mayor especificidad y selectividad (Li et al., 2012; Choi et al., 2015). Singh, Kumar, Mittal, y Mehta (2016) muestran, de forma resumida, la extensa aplicación de microorganismos en distintos bioprocesos para la obtención de varios productos industriales. Entre ellos está la industria láctea, que utiliza enzimas como proteasas, lipasas y lactasas, obtenidas de microorganismos como *Aspergillus* sp y *Bacillus subtilis* para la producción de quesos y leche. Otros ejemplos son: la industria de papel que emplea lipasas, amilasas y xilanasas de *Trichoderma reesei* y *Candida antarctica*; la industria de detergentes, la cual incorpora en sus productos enzimas como catalasas, celulasas, proteasas y lipasas. De la misma forma, la industria de manejo de residuos y producción de biocombustibles también se ha inclinado al uso de enzimas para aumentar eficiencia. Además, las enzimas microbianas se utilizan en el tratamiento de trastornos de salud asociados con la deficiencia de enzimas humanas causadas por problemas genéticos (Choi et al., 2015; Anbu et al., 2017).

3.2. LIPASAS: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

Las lipasas (EC 3.1.1.3: triacilglicerol acil hidrolasas) constituyen la tercera categoría más importante de las enzimas, después de las carbohidrasas y proteasas (Kavitha, 2016). Son enzimas ubicuas en la naturaleza, producidas por plantas, animales y microorganismos, incluyendo levaduras, hongos y bacterias (Bussamara et al., 2010; Treichel, de Oliveira, Mazutti, Di Luccio, y Oliveira, 2010). Bioquímicamente, son hidrolasas que actúan sobre sustratos emulsificados insolubles en agua. Catalizan la hidrólisis de los enlaces éster de triacilglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena larga (más de diez átomos de carbono), siendo los productos de la hidrólisis glicerol y ácidos grasos libres. Estas características marcan una diferencia con las esterases, las cuales actúan sobre sustratos solubles en agua, como ésteres simples compuestos por ácidos grasos de cadena corta (menos de 6 átomos de carbono) (R. Sharma, Chisti, Chand, y Banerjee, 2001; Lux, Valeriano, Corbellini, y Valente, 2007; Bussamara et al., 2010).

3.2.1. REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS

Las lipasas catalizan una amplia variedad de transformaciones químico, regio y estereoselectivas gracias a sus características únicas: especificidad de sustrato, especificidad regional y selectividad quiral (estereoselectivas). Por tal motivo, nuevas aplicaciones biotecnológicas se han establecido usando lipasas en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, farmacéuticos enantiopuros, agroquímicos, biosensores y compuestos saborizantes (R. Sharma et al., 2001; Shimada, Watanabe, Sugihara, y Tominaga, 2002; Tan, Lu, Nie, Deng, y Wang, 2010).

Además de la actividad hidrolítica sobre triacilglicéridos, las lipasas catalizan dos grupos de reacciones químicas en medios no acuosos: la esterificación y la transesterificación (véase anexo 1). La esterificación es el proceso en el cual se sintetiza un éster por la unión de un ácido graso y un alcohol. La transesterificación comprende las reacciones de interesterificación, acidólisis, alcoholólisis y aminólisis (Hasan, Shah, y Hameed, 2009; Damaso, Salum, Terzi, y Couri, 2013).

3.2.2. ACTIVACIÓN INTERFACIAL

Las lipasas se distinguen por una característica especial: son enzimas solubles en agua que actúan sobre sustratos insolubles y agregados (González, Hernández, y Martínez, 2010). Esta condición determina que operen unidas a interfases lípido-agua, generando un sistema de reacción heterogéneo difícil de explicar desde los conceptos y métodos de la enzimología (Reis, Holmberg, Watzke, Leser, y Miller, 2009).

A nivel molecular, la interfase consiste en un conjunto de dos capas adyacentes de moléculas ordenadas con diferente carácter hidrofóbico-hidrofílico (González et al., 2010). El fenómeno cinético de activación interfacial se demostró cuantitativamente en la lipasa pancreática porcina (PPE), la cual exhibía muy poca actividad cuando el sustrato (triacetina) estaba perfectamente solubilizado. Sin embargo, cuando se utilizaban concentraciones de triacetina por encima de su límite de solubilidad (sobre saturadas), se formaban emulsiones que eran hidrolizadas por la lipasa de una forma más eficiente (Sarda y Desnuelle, 1958).

La activación interfacial es el incremento de la actividad catalítica en presencia de sustratos insolubles y agregados (emulsiones y micelas), en donde se produce la formación de interfases lípido-agua (véase anexo 2). Bajo estas condiciones, la actividad de las lipasas se potencia en comparación con los mismos sustratos en soluciones monoméricas solubles (soluciones con concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica) (Verger, 1997; Reis et al., 2009; González et al., 2010).

A menudo, se ha tomado erróneamente la activación interfacial como indicador del aumento de la actividad catalítica de una enzima sobre un sustrato triacilglicérido, producido por emulsificación mecánica o en presencia de un agente tensoactivo. En tales casos, el aumento en la velocidad de reacción se debe simplemente a un aumento en la actividad interfacial (Verger, 1997).

La explicación del mecanismo de activación interfacial en las lipasas se ha centrado en dos modelos: el modelo de sustrato y el modelo enzimático (Reis et al., 2009). En el modelo enzimático, el fenómeno cinético de activación interfacial se explica por un cambio conformacional de la lipasa tras su adsorción en la interfaz lípido-agua (adsorción interfacial). La resolución de la estructura cristalina de la lipasa pancreática humana y fúngica, confirmó el cambio estructural y reveló que el sitio activo está cubierto por un bucle (“loop”) α - helicoidal anfipático denominado *lid*, es decir, una tapa que deja inaccesible el sitio activo para moléculas de sustrato (Verger, 1997; Reis et al., 2009; González et al., 2010; Guillén, 2012; Mercado-Malebrán, 2014).

Cuando la enzima entra en contacto con una interfase, la superficie proteica de la lipasa sufre una modificación en su ambiente dieléctrico, al potenciarse las interacciones electrostáticas. Ello posibilita que la cubierta del centro activo se desplace, provocando una reestructuración conformacional de la molécula que cambia la configuración de la lipasa de cerrada a abierta. Como resultado, el centro activo queda accesible, exponiendo una gran superficie hidrofóbica con los aminoácidos catalíticos correctamente orientados. Todo esto incrementa la afinidad de la enzima por sus sustratos lipídicos y contribuye a la estabilización del estado de transición durante el ciclo catalítico (Aloulou et al., 2006; Guillén, 2012).

Por otro lado, el modelo de sustrato sostiene que las explicaciones moleculares para el fenómeno de activación interfacial no deben limitarse al nivel estructural de la lipasa, sino que deben tomar en cuenta la dinámica de las estructuras multi-moleculares y las conformaciones interfaciales (“calidad interfacial”) de los lípidos utilizados como sustratos (Verger, 1997).

Este modelo enfatiza en las características fisicoquímicas del sustrato, las cuales contribuyen de manera significativa a la activación interfacial. Entre ellas, la mayor disponibilidad de sustrato y la orientación adecuada en la interfaz (Reis et al., 2009). Estas características se basan en el hecho de que, en el estado agregado, los triacilglicéridos exhiben un grado de ordenamiento elevado, que minimiza el número de estados conformacionales que pueden presentar estas mismas moléculas en solución acuosa (González et al., 2010). Limitar la reacción a una interfaz puede acelerar considerablemente la tasa de asociación sustrato-enzima, al disminuir la entropía a través de restricciones motoras, así como mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Reis et al., 2009). Entre otros parámetros fisicoquímicos, se ha postulado que el radio de curvatura de las emulsiones podría desempeñar un papel importante durante el acoplamiento interfacial de las lipasas y, por lo tanto, modular la actividad catalítica, a través de cambios conformacionales sutiles (Verger, 1997).

Finalmente, el comportamiento de las lipasas y el resultado de las reacciones enzimáticas se ha descrito a través de la "calidad de la interfase", siendo un término ambiguo y difícil de definir. En este aspecto, una variedad de fenómenos interfaciales tiene efecto tanto sobre las enzimas como sobre las reacciones. Entre ellos, la alta o baja tensión interfacial, las limitaciones cinéticas para la accesibilidad, distribución, orientación, compartimentación, agitación del sustrato, tensoactivos que afecten la interfase, influencia de los productos formados y área interfacial específica (cantidad de sustrato expuesto en la interfase accesible a la enzima) (Reis et al., 2009).

3.2.3. ESTRUCTURA

A pesar de las distintas reacciones que catalizan las lipasas, del tamaño, origen y secuencia de aminoácidos, todas conservan como estructura el plegamiento canónico α/β

hidrolasa, que es común a la mayoría de enzimas hidrolíticas (Barriuso, Vaquero, Prieto, y Martínez, 2016; Kavitha, 2016).

Este dominio estructural canónico consiste en ocho hojas β centrales, de las cuales siete se encuentran en forma paralela y una (β_2) de manera antiparalela. Estas estructuras están conectadas por secuencias polipeptídicas helicoidales, llamadas hélices α , que flanquean empaquetadas ambos lados de las hojas β . De esta manera, las estructuras β_1 y β_2 se unen entre sí de manera continua. La hoja β_2 se une con β_3 , pero de forma interrumpida por la hoja β_4 , que a su vez está conectada con β_3 mediante una α hélice. La hoja β_4 se conecta con β_5 también a través de una α hélice. Este último patrón se repite hasta la última hoja β , y la estructura finaliza con una α hélice que contiene el carboxilo terminal (véase anexo 4). Las lipasas se diferencian entre sí en la posición de las α hélice como también de los bucles que entran en contacto con el sitio activo (Gupta, Gupta, y Rathi, 2004; García Román, 2005; González et al., 2010; Mercado-Malebrán, 2014).

El sitio activo contiene la triada catalítica Ser105 (nucleófilo)-His224 (residuo básico)-Asp/Glu187 (residuo ácido). Dicha maquinaria catalítica está presente en todas las lipasas (siendo el residuo histidina altamente conservado), y constituyen la región electrofílica denominada cavidad oxianiónica. Además, como se mencionó, en casi todas las lipasas el sitio activo está cubierto por un bucle anfipático (*lid*) que se desplaza en presencia de una interfase (García Román, 2005; González et al., 2010; Kavitha, 2016).

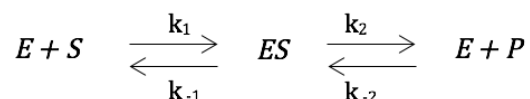
Por otra parte, el sitio activo contiene bolsillos que acomodan las cadenas acilo de sus sustratos. Estas hendiduras son denominadas *sn-1*, *sn-2*, *sn-3*. De este modo, la preferencia por el sustrato está determinada por el carácter hidrofóbico del sitio activo y el tamaño de los bolsillos (Mercado-Malebrán, 2014).

El mecanismo catalítico de la lipasa consta de tres pasos independientemente del ambiente en que se encuentre la enzima. Primero, la serina es activada por desprotonación, para lo cual son requeridos los residuos de histidina y aspartato. En consecuencia, el grupo hidroxilo (-OH) de la serina se potencia como nucleófilo y ataca el grupo carbonilo del sustrato (enlace éster), formando un intermediario tetraédrico acil-enzima y liberando un diacilglicérido. Los residuos de la cavidad oxianiónica contribuyen en la estabilización de la distribución de la carga y la reducción de la energía del estado fundamental del

intermediario. Finalmente, se produce un ataque sobre dicho complejo acil-enzima por parte de un reactivo nucleófilo (véase anexo 5). Dependiendo de la electronegatividad de moléculas que ocupen la interfase, el nucleófilo que desacila la enzima puede ser agua (H_2O), un alcohol ($R-OH$) o un diacilglicérido, obteniéndose un ácido carboxílico, un éster o un triglicérido respectivamente (véase anexo 6). En este punto, la enzima se libera y se regenera el sitio activo (Gupta et al., 2004; García Román, 2005; Reis et al., 2009; Mercado-Malebrán, 2014). El equilibrio entre la reacción directa (hidrólisis) o la inversa (síntesis) está determinado por la actividad del agua en medio de la reacción. Una cantidad pequeña de agua en el medio es adecuada para reacciones de síntesis (García Román, 2005).

3.2.4. CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LIPASAS

La cinética enzimática estudia las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas. En dichas reacciones, el sustrato S se transforma en producto P , formándose en primer lugar un complejo enzima-sustrato ES como intermediario necesario para la catálisis. Luego, el complejo da lugar a una molécula de producto y se libera la enzima. El complejo ES constituye la clave para entender el comportamiento cinético, del mismo modo que representa el punto de partida para la descripción de la catálisis, que se representa a continuación:



Donde k son las constantes de velocidad de formación del elemento respectivo. Es importante señalar que una sola molécula de enzima puede convertir varias moléculas de sustrato en producto. El número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima convierte a producto, por segundo, se conoce como número de recambio o constante catalítica ($k_{cat} = k_2$) (Lehninger, Nelson, y Cox, 2005; Berg et al., 2014).

La velocidad de reacción se define como la cantidad de sustrato que desaparece por unidad de tiempo, lo cual equivale al número de moles de producto que se forma por segundo (Berg et al., 2014). En este punto es necesario considerar que la reacción es reversible, es decir, moléculas de producto también pueden convertirse en moléculas de sustrato. Esto conlleva al problema de cómo cuantificar la velocidad de manera que se tome en cuenta solo

la reacción directa (k_2). La solución, es medir la velocidad en los instantes iniciales de la reacción, de manera que la reacción inversa (k_{-2}) pueda ignorarse porque la concentración de P es despreciable y por tanto la concentración de S puede considerarse constante. A medida que transcurre la reacción, la cantidad de producto aumenta con el tiempo, provocando el agotamiento del sustrato y el incremento de la reacción inversa, hasta llegar al equilibrio de la reacción, en donde no hay cambio neto en la concentración de S o P y, por tanto, la velocidad se hace cero. Si se mide la cantidad de producto formado en función de tiempo (curva de progreso) y la concentración de enzima es constante, la velocidad de reacción V_0 se determina a partir de la pendiente de la tangente de la curva en el origen (Lehninger et al., 2005; Berg et al., 2014).

Definida la velocidad de reacción, se la puede estudiar en función de la concentración de sustrato, valor que es ajustado por el investigador. El efecto de la variación de sustrato sobre la velocidad de reacción constituye el comportamiento cinético. Al representar gráficamente la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato $[S]$ se obtiene una hipérbola rectangular que es descrita por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

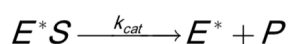
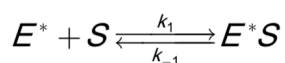
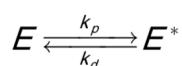
donde $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, y es tal que si $[S] = K_M \Rightarrow V_0 = \frac{V_{max}}{2}$; si $[S] \ll K_M \Rightarrow V_0 \approx \frac{V_{max}}{K_M} [S]$; si $[S] \gg K_M \Rightarrow V_0 \approx V_{max}$.

A partir esto se deduce que: a medida que $[S]$ crece, la velocidad de reacción V_0 aumenta tendiendo asintóticamente a una velocidad máxima, V_{max} . El incremento de la velocidad de reacción, cuando la concentración de sustrato aumenta, se debe a la formación de más producto al existir mayor cantidad de sustrato disponible, y por tanto más sitios activos ocupados. A valores bajos de $[S]$ hay moléculas de enzima libres y la velocidad de reacción es baja, directamente proporcional a la concentración de sustrato. Al crecer $[S]$, más moléculas de enzima se ocupan con sustrato y la velocidad crece, ya no proporcionalmente, sino en incrementos cada vez menores. Cuando $[S]$ es muy alto, habrá un déficit de moléculas de enzima (sitios activos) para enlazarse con el sustrato y la velocidad no crecerá más (V_{max}). En otras palabras, la totalidad de enzima disponible se encontrará unida al sustrato $[ES] = [E_T]$ y la adición de más sustrato no afectará la velocidad

(reacción de orden cero). En estas condiciones, se dice que la enzima está saturada. Por tanto, la V_{max} depende directamente de la concentración de enzima y del número de recambio antes definido ($k_{cat} = k_2$): $V_{max} = k_2[E_T]$. (Hill, Wyse, y Anderson, 2012; Berg et al., 2014; Worthington Biochemical Corporation, 2017).

Por otra parte, la constante de Michaelis-Menten K_M describe las propiedades de interacción enzima-sustrato y es independiente de la concentración de enzima. Uno de los datos que aporta la K_M es la fracción de centros activos ocupados por el sustrato (V_0/V_{max}). A partir de la ecuación de Michaelis-Menten se puede deducir que, a cantidades de sustrato igual a la K_M , están ocupados la mitad de los sitios activos de la enzima. Así, la K_M equivale a la concentración de sustrato donde la velocidad de reacción es la mitad de su valor máximo. ($V_0 = V_{max}/2$). Esto proporciona una medida de la concentración de sustrato necesaria para que tenga lugar una catálisis significativa. La segunda manera de entender el significado de la K_M se relaciona con el último punto mencionado: la afinidad de la enzima al sustrato. Cuando la K_M es grande, la disociación del complejo ES es alta, por tanto, la afinidad de la enzima al sustrato es baja. En este caso, la enzima necesita más concentración de sustrato para que exista una catálisis significativa ya que se disocia fácilmente del sustrato. En consecuencia, cuando la K_M es baja, la afinidad de la enzima es alta. Es decir, el ES se disocia con mayor dificultad y se requerirá menos sustrato para obtener una catálisis significativa (Lehninger et al., 2005; Hill et al., 2012; Berg et al., 2014; Worthington Biochemical Corporation, 2017).

Las lipasas poseen cinéticas que no corresponden exactamente al modelo de Michaelis-Menten. El motivo, es la característica única que presentan: el fenómeno de catálisis interfacial (Marangoni, 2003; García Román, 2005; Reis et al., 2009). El modelo de Verger-De Haas es la adaptación más simple del modelo Michaelis-Menten para la catálisis interfacial (Verger y De Haas, 1973):



Para que exista catálisis es necesario la presencia de interfases (emulsiones o micelas) orgánico-acuosa. La primera etapa del mecanismo de reacción es la adsorción de la enzima (E) a la interfase lípido-agua. La cinética de este proceso de unión se describe con las constantes de adsorción (k_p) y disociación (k_d). Al unirse a la interfaz, se produce la activación interfacial (comportamiento cinético) y la enzima adopta una conformación energéticamente más favorable (E^*). La enzima presente en la interfaz se une a una molécula de sustrato, lo que resulta en la formación del complejo enzima-sustrato (E^*S), análogo interfacial al de Michaelis-Menten. Después de un proceso catalítico bidimensional, se genera el producto (P^*) y se lo solubiliza en la fase acuosa (P) (véase anexo 7) (Marangoni, 2003; García Román, 2005; Reis et al., 2009).

Es importante recalcar que la catálisis interfacial solo ocurre cuando la concentración de sustrato excede el límite de solubilidad. Entonces, la reacción hidrolítica se incrementa drásticamente con el mismo sustrato presente en micelas o en gotas de emulsión (véase anexo 3). En este caso, el concepto de concentración de sustrato es bastante difícil de definir. La velocidad de reacción resulta independiente de la concentración molar de sustrato, pero dependiente del área interfacial específica de la emulsión, es decir, de la concentración de sustrato interfacial expuesto a la enzima (Marangoni, 2003; Reis et al., 2009).

Esto es evidente al utilizarse, en estudios cinéticos, dos emulsiones con diferente tamaño de gota, es decir, áreas interfaciales específicas distintas. La aplicación del modelo Michaelis-Menten en tal caso conduce a la obtención de dos K_M , lo cual carece de sentido al tratarse del mismo sustrato. Para resolver el problema, es necesario utilizar el área interfacial de la emulsión en lugar de la concentración de sustrato (García Román, 2005).

Sin embargo, es común ver reportes de K_M para enzimas interfaciales, a pesar que el modelo de Michaelis-Menten solo aplica a enzimas y sustratos solubles presentes en la misma fase. La K_M , como dimensión concentración-volumen, no tiene ningún significado para sustratos en interfaces, pues el aumento de la concentración de sustrato no implica el aumento de la velocidad de reacción si no existen interfases o si el área interfacial es pequeña. Estos deberían cuantificarse como moles por unidad de área. En este sentido, es más relevante el concepto de concentración de área interfacial o la cantidad de área interfacial por unidad de volumen (Marangoni, 2003; Reis et al., 2009).

Mediante el tratamiento cinético del modelo de catálisis interfacial, Verger–De Haas llegan a la siguiente expresión que describe la cinética de lipasas (monocapas y micelas):

$$r = \frac{k_{cat} E_0 S}{S + K_m^*} \times \frac{S \frac{I}{V}}{S \frac{I}{V} + \frac{k_d}{k_p} \cdot \frac{K_m^* \cdot S}{S + K_m^*}}$$

Esta ecuación posee la misma estructura que la clásica de Michaelis-Menten, pero las constantes V_{max} y K_M resultan una función compleja de otras constantes y de la concentración interfacial de sustrato, la cual depende de la naturaleza del sustrato y las características fisicoquímicas de la fase acuosa. E_0 representa la concentración total de la enzima, I el área interfacial total, V el volumen total de la emulsión y K_M^* la constante de Michaelis referida al complejo interfacial enzima sustrato (E*S) (Verger y De Haas, 1973; García Román, 2005).

Además del modelo de Verger-De Haas, varios trabajos se han realizado sobre la cinética enzimática de lipasas (Deems, Eaton, y Dennis, 1975; Tsai, Wu, y Chiang, 1991; Tsai y Chang, 1993; Jain, Gelb, Rogers, y Berg, 1995). Estudios más recientes proponen un análisis de la cinética enzimática interfacial mediante el modelo de Michaelis-Menten invertido, evaluando la cantidad de enzima requerida para saturar la interfaz del sustrato (Kari, Andersen, Borch, y Westh, 2017).

En general, todos los modelos cinéticos interfaciales toman en cuenta dos características fundamentales: la adsorción al sustrato y el área interfacial específica. Otros factores más complejos de incluir son los efectos del microambiente interfacial (reorganización molecular interfacial, segregación de productos insolubles que afectan la calidad interfacial, etc.). Además, prácticamente la totalidad de modelos e interpretaciones de catálisis enzimática interfacial contienen implícito el formalismo de Michaelis-Menten (Marangoni, 2003; García Román, 2005; Reis et al., 2009).

No obstante, en muchas ocasiones se adopta el uso de cinéticas de primer orden o la propia de Michaelis-Menten como simplificación de cinéticas mucho más complejas, originándose lo que se conocen como parámetros catalíticos aparentes (Sánchez Ferrer, 1998; Marangoni, 2003). En ese caso, se asume que el aumento de la concentración de

sustrato se refiere al aumento en el número de gotas de sustrato presentes en el sistema. Esto resulta en un incremento de la cantidad de área interfacial por unidad de volumen, lo que se traduce en una mayor velocidad de reacción (Marangoni, 2003)

Por otro lado, para todos los modelos cinéticos, la medición de la Actividad Enzimática (U/mL), cuantificada en Unidades de enzima (U), solo se puede realizar cuando se llega a las condiciones de V_{max} . Aquí la concentración de sustrato excede en gran medida la concentración de enzima y, en consecuencia, la velocidad no dependerá de la concentración de sustrato, pues no será un factor limitante (reacción de orden cero). (NC-IUB, 1979).

En estas circunstancias, cualquier cambio en la velocidad de reacción dependerá únicamente del nivel de enzima presente, pudiéndose efectuar comparaciones. Para estar seguros que una reacción es de orden cero, se deben realizar múltiples mediciones de la concentración de producto (o sustrato) hasta llegar a la velocidad máxima, asegurándose que haya una cantidad de sustrato suficiente para saturar la enzima a cualquier concentración que se encuentre (el doble de su K_M). Por tanto, la medición de la velocidad de reacción V_0 para evaluar cualquier concentración de enzima se realizará en condiciones de saturadas de sustrato. A partir de la velocidad medida, que será siempre la máxima, se podrá calcular la actividad enzimática (Schnell y Maini, 2000; Worthington Biochemical Corporation, 2017)

3.3. FUENTES DE OBTENCIÓN DE LIPASAS Y APLICACIONES

Las lipasas están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. Si bien, la primera fuente de obtención de las lipasas fue a partir del páncreas porcino, en la actualidad se obtienen vía fermentativa a partir de una amplia variedad de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, levaduras y hongos (R. Sharma et al., 2001; Treichel et al., 2010; Thakur, 2012).

Las lipasas vegetales no se usan comercialmente y las lipasas animales tienen la desventaja de contener en los extractos componentes indeseables, como virus, hormonas, etc. (Vakhlu y Kour, 2006). Por otra parte, las lipasas microbianas son el centro de atención debido a sus propiedades aplicadas como versatilidad, estabilidad, selectividad quiral, especificidad de sustrato y facilidad de producción en masa. Esto les confiere un enorme

potencial en varias aplicaciones biotecnológicas, por eso microorganismos como bacterias, hongos y levaduras son las principales fuentes de estas enzimas (R. Sharma et al., 2001; Jaeger y Eggert, 2002; Treichel et al., 2010).

Entre los microorganismos productores de lipasas más importantes comercialmente, y/o que exhiben propiedades con potenciales aplicaciones biotecnológicas, tenemos a: bacterias del género *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp; hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Geotrichum* sp.; y a las levaduras del género *Candida* sp., que incluyen *Candida rugosa* y *Candida antártica*, también a *Yarrowia lipolytica* y otras del género *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp. y *Trichosporon* sp. Por su alto desempeño y propiedades enzimáticas, los genes que codifican para lipasas de *Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Trichosporon* sp., y *Y. lipolytica* han sido clonados y sobre-expresados (Vakhlu y Kour, 2006; Treichel et al., 2010; D. Sharma, Sharma, y Shukla, 2011; Thakur, 2012).

Las aplicaciones biotecnológicas 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 dos amplias posibilidades: reacciones de hidrólisis y de síntesis (Sánchez Ferrer, 1998; García Román, 2005; D. Sharma et al., 2011). Entre las aplicaciones están el tratamiento de aguas residuales (acelerando la degradación de los desechos grasos), el procesamiento de grasas y aceites, aditivos para detergentes y formulaciones desengrasantes, procesamiento de alimentos (desarrollo de aromas característicos de productos lácteos, chocolate y repostería), síntesis de productos químicos y farmacéuticos finos (enantiopuros), fabricación de papel, agro-químicos y producción de cosméticos y biodiesel (obtención de ésteres de cadena corta y media) (véase anexo 8) (R. Sharma et al., 2001; Jaeger y Eggert, 2002; García Román, 2005; Hasan, Shah, y Hameed, 2006; D. Sharma et al., 2011; A. K. Singh y Mukhopadhyay, 2012; Thakur, 2012).

3.4. ENZIMAS DE LEVADURAS ADAPTADAS AL FRÍO

Los ecosistemas fríos representan una de las biosferas más grandes del mundo: el Ártico y la Antártida, la criosfera no polar y los océanos profundos cubren el 70% de la superficie de la Tierra (Szczena-Antczak, Kamińska, Florczak, y Turkiewicz, 2013; Baeza, Alcaíno, Cifuentes, Turchetti, y Buzzini, 2017). Los organismos psicrófilos y

psicrotolerantes (incluidas las levaduras) que colonizan estos hábitats fríos de forma permanente o temporal, han desarrollado una serie de adaptaciones fisiológicas para superar el efecto adverso de las bajas temperaturas. Entre ellos, la síntesis de enzimas activas en frío representa sin duda una característica clave de esta adaptación. Esto permite a los psicrófilos mostrar una temperatura de crecimiento mínima alrededor de 0°C , una óptima $\leq 15^{\circ}\text{C}$ y una temperatura de crecimiento máxima de 20°C . Por el contrario, los organismos psicrotolerantes crecen aproximadamente a 0°C , pero tienen un crecimiento óptimo $>20^{\circ}\text{C}$. Es decir, los organismos psicrotolerantes evolucionaron su fisiología para tolerar el frío, pero no están tan especializados como los psicrófilos (Baeza et al., 2017; Martorell, Ruberto, Fernández, Castellanos de Figueroa, y Mac Cormack, 2017).

Según Kavitha (2016) los organismos psicrófilos son menos utilizados en aplicaciones industriales. Para prosperar a bajas temperaturas, los psicrófilos poseen enzimas especialmente adaptadas y se denominan como enzimas activas en frío (cold-active enzymes). Estas son formas moleculares homólogas a las enzimas mesófilas. Entre ellas están amilasas, celulasas, proteasas, lipasas e isomerasas, entre otras (Kavitha, 2016; Baeza et al., 2017). Tanto las enzimas mesófilas como sus homólogas activas en frío, catalizan la misma reacción, pero difieren en detalles de su estructura y en sus propiedades funcionales (Hill et al., 2012).

La alta actividad de las enzimas activas en frío a bajas temperaturas en comparación con sus contrapartes mesófilas, está estrechamente correlacionado con una mayor plasticidad y flexibilidad de sus componentes estructurales tridimensionales, lo que mejora su capacidad para lograr los cambios conformacionales requeridos para acomodar sustratos macromoleculares y optimizar la catálisis a bajas temperaturas. A su vez, esto conduce al debilitamiento de las fuerzas intramoleculares, lo que da como resultado una estabilidad reducida hacia los agentes desnaturizantes (baja termoestabilidad) (Baeza et al., 2017)

Comparaciones estructurales de enzimas activas en frío con sus homólogos mesófilos y termófilos confirman que solo se requieren pequeñas modificaciones estructurales para convertir una enzima mesófila o termófila en su homólogo activo en frío correspondiente. Usualmente, estas difieren en pocas posiciones de aminoácidos, lo cual explica cómo las especies pueden evolucionar diferentes homólogos de enzimas. Además, los cambios en las posiciones de aminoácidos se ubican afuera del sitio de unión al sustrato, por lo que la

estructura del sitio activo es constante o casi constante. Esto explica por qué todos los homólogos catalizan la misma reacción. Estas modificaciones conllevan una disminución de la densidad de cargas en la superficie de la enzima y un aumento de la densidad de residuos hidrofóbicos expuestos al solvente. En consecuencia, los cambios afectan la función de la enzima alterando propiedades como la flexibilidad molecular, pero no propiedades del sitio catalítico per se (Hill et al., 2012; Kavitha, 2016; Baeza et al., 2017).

La mejor eficiencia catalítica de las enzimas activas en frío a bajas temperaturas, consecuencia de los cambios estructurales mencionados, resulta en una serie de estrategias como: la mejora de la afinidad al sustrato, es decir, una disminución de la constante de Michaelis (K_M) y el incremento en el valor de K_{cat} . Si bien el K_M es inferior en las enzimas activas en frío, esto solo sucede a temperaturas bajas, en comparación con sus homólogas mesófilas. Cuando las enzimas actúan en sus respectivas temperaturas óptimas, el K_M o la afinidad al sustrato se mantienen iguales. Por otro lado, la constante catalítica K_{cat} mide el número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima es capaz de convertir en producto por unidad de tiempo. Su incremento refleja una mayor capacidad intrínseca para acelerar las reacciones, un atributo que ayuda a compensar los efectos de la disminución de la reacción de las bajas temperaturas (Hill et al., 2012; Baeza et al., 2017).

En cuanto a lipasas activas en frío, la capacidad de producirlas se encuentra muy extendida entre las levaduras que viven en ambientes fríos en todo el mundo. La más estudiada y utilizada es la lipasa A y B de *Candida antarctica*. La lipasa activa en frío puede emplearse, debido a su alta eficacia catalítica y especificidad única, a bajas y moderadas temperaturas, para procesos biotecnológicos o industriales. Estos incluyen su uso como catalizador para la síntesis orgánica de compuestos inestables a baja temperatura (Joseph, Shrivastava, y Ramteke, 2012).

3.5. MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS

Actualmente, se usan de forma comercial aproximadamente 200 tipos de enzimas microbianas de 4000 enzimas conocidas. Sin embargo, solo alrededor de 20 enzimas se producen a una escala verdaderamente industrial. El costo de producción de la enzima purificada es un obstáculo primario para su implementación comercial, pues el 80% del costo

final se asocia con purificación e inmovilización (Eby y Peretti, 2015). La producción de enzimas ha estado relativamente concentrada en algunas naciones desarrolladas ubicadas en Dinamarca, Suiza, Alemania, los Países Bajos y Estados Unidos (Li et al., 2012; Choi et al., 2015).

La demanda mundial de enzimas es satisfecha por unos 12 productores principales y 400 proveedores menores. Casi el 75% de las enzimas totales son producidas por tres empresas principales de enzimas: Novozymes, con sede en Dinamarca, DuPont, con sede en los Estados Unidos y Roche, con sede en Suiza. Debido al avance de la manipulación genética, diseño computarizado y varias técnicas moleculares, aproximadamente el 90% de las enzimas industriales son versiones recombinantes (R. Sharma et al., 2001; Hasan et al., 2006; Liu y Kokare, 2017)

Alrededor del 2% de los microorganismos del mundo se han probado como fuentes de enzimas (Hasan et al., 2006). Esta cifra permite entender la extensa búsqueda e investigación que se puede llevar a cabo para descubrir y caracterizar nuevas enzimas para su uso en el mejoramiento de la calidad de vida de la humanidad. Sin embargo, frente al indiscutible monopolio industrial de las enzimas, países como Ecuador y otros en Latinoamérica, enfrentan el problema del biopiratero. La búsqueda de genes, plantas, animales, conocimientos ancestrales e incluso microorganismos, que en última instancia otorgarían ganancias multimillonarias a tales empresas, pretenden justificar el saqueo de la biodiversidad de países desprotegidos por leyes. La solución es la implementación de un modelo que permita la investigación local de su patrimonio, respaldada en políticas coherentes que direccionen el beneficio de los resultados para sus propias poblaciones (Paz Y Miño y Lopez Cortez, 2014; Paz y Miño, 2018).

OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar la lipasa producida por la levadura antártica *Guehomyces pullulans*.

ESPECÍFICOS

- Producir lipasas en medio inductor líquido utilizando la levadura antártica *Guehomyces pullulans*

- Caracterizar cualitativa y cuantitativamente la actividad de lipasas obtenidas de *Guehomyces pullulans*

- Determinar la cinética de la enzima obtenida

- Determinar el pH y temperatura óptimos para la actividad de la lipasa obtenida

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CEPA DE LEVAUDURA

La levadura *Guehomyces pullulans* cepa CLQCA-ANT-073 fue seleccionada entre cinco aislados independientes de levaduras antárticas que fueron previamente escogidas por poseer un alto índice enzimático (EI) en cuanto a la actividad lipasa/esterasa. Esta selección se basó en el screening de 49 aislados independientes que incluyen 7 especies de levaduras antárticas.

4.2. INDUCCIÓN A LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS

La biomasa de la levadura de *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073), cultivada en medio YM agar (Yeast Malt agar) por 5 días a 25°C, fue inoculada en un medio inductor líquido compuesto por: 0.2% de glucosa, 0.5% de peptona, 0.01% de MgSO₄, 0.1% % de K₂HPO₄, 2% de aceite de oliva. A este medio base propuesto por Bussamara et al. (2010) se aplicaron las modificaciones sugeridas por Dhiman y Chapadgaonkar (2013), las cuales consisten en la adición de goma arábica al 5%. El pH fue ajustado a 5.0 y el medio de cultivo se esterilizó mediante autoclavado a 121°C durante 15 minutos. El cultivo de levadura, en volumen de 50 mL, se incubó con agitación a 200 RPM y 20°C por 40 días.

4.3. EXTRACCIÓN Y PRECIPITACIÓN PROTEICA

Para la purificación parcial de lipasas, se utilizó la técnica empleada por Joseph, Shrivastava y Ramteke (2012). El sobrenadante se obtuvo del medio inductor por centrifugación a 4°C y 14000 RPM. Posteriormente, concentró la enzima mediante *salting-out* de proteínas utilizando una solución de sulfato de amonio al 75%. A continuación, las muestras fueron incubadas por 5 horas a 4°C. Una vez precipitadas las proteínas, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en buffer fosfato 50 mM, pH 7 y se almacenó a -30° C para su posterior uso (Kumar, Kikon, Upadhyay, Kanwar, y Gupta, 2005; Bussamara et al., 2010; Joseph et al., 2012; Bae, Kwon, Kim, Hou, y Kim, 2014).

4.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría mediante el Método de Bradford (1976). El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente manera: se disolvió 100 mg de Coomassie Blue G250 en 50 mL de etanol 95%. A continuación, se adicionaron 100 mL de ácido fosfórico 85% y se diluyó la solución resultante en 1 L con agua destilada (García y Vázquez, 1998). La cuantificación se realizó tomando 100 μ L de muestra obtenida de la extracción proteica, y 1 mL de reactivo de Bradford. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por dos minutos y se procedió a medir la absorbancia a 595 nm. La curva de calibración se preparó con 7 diluciones de BSA (Bovine Serum Albumin) en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL. Mediante una regresión lineal se determinaron las respectivas concentraciones.

4.5. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS

Se empleó el método cromogénico descrito por Nath y Hindumathy (2012) y reportado también por Singh, Gupta, Goswami y Gupta (2016), el cual detecta la actividad lipasa por el viraje en el pH al acidificarse el medio. El medio cromogénico se compone por: 0.01 % Rojo fenol, 1% aceite de oliva, CaCl_2 10mN, 2% Agar. El pH fue ajustado con NaOH 0.1 M a 8.0 (coloración fucsia-roja) y se esterilizó mediante autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se dispensó en placas Petri (Rajni Singh, Gupta, Goswami, y Gupta, 2006; Nath y Hindumathy, 2012).

En la placa Petri con el medio cromogénico se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro con un sacabocados estéril; en ellos se adicionaron volúmenes de 100 μ L de las muestras proteicas obtenidas en el apartado 4.3, en las concentraciones: 0.4, 0.04 y 0.004 mg/mL (diluciones en buffer fosfato pH 7), 0.04 mg/mL (dilución en agua); y como controles agua y buffer fosfato. Finalmente, la placa se incubó a 30°C por 2 horas y 30 minutos.

4.6. CARACTERIZACIÓN PROTEICA POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La determinación de pesos moleculares del extracto proteico se llevó a cabo mediante una electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturalizantes. La electroforesis se realizó en una cámara ENDURO™ PAGE System, de acuerdo con el protocolo descrito por Laemli (1970) y siguiendo el procedimiento estándar recomendado por el fabricante. Las proteínas fueron visualizadas con tinción Coomassie Brilliant Blue y examinadas mediante el software libre GelAnalyzer.

4.7. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LIPASAS

4.7.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PARANITROFENOL (*p*NP)

Se prepararon 10 soluciones de *p*NP en concentraciones de 5-50 $\mu\text{mol/L}$ en buffer fosfato 50 mM, pH 7. Para ello, se partió de una solución madre de 0.5 mM de *p*NP. Luego, se midió la absorbancia A_{410} de las soluciones frente un blanco (buffer fosfato 50 mM, pH 7). La curva estándar se construyó mediante regresión lineal de la A_{410} medida vs la concentración de *p*NP en $\mu\text{mol/L}$. A partir de la curva, se calculó el coeficiente de absorción molar con la siguiente ecuación (Eq.1):

$$A = \varepsilon \times b \times c \quad \text{Eq. 1}$$

Donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorción molar, b es la longitud de trayectoria y c es la concentración de *p*NP. La longitud de trayectoria utilizada fue 1 cm, siendo ε el coeficiente angular de la recta de la curva estándar (pendiente de la recta). Las unidades de ε son $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Damaso et al., 2013).

4.7.2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE PROGRESO DE LIPASAS

La actividad enzimática de las lipasas fue determinada por espectrofotometría, usando *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como sustrato. Este método colorimétrico se basa en la cuantificación de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado cuando se hidroliza el *p*NPP (Wrolstad et al., 2005; Bussamara et al., 2010). Para los ensayos de actividad enzimática se prepararon tres soluciones base: la Solución A, la Solución B y la Solución C. La primera contenía el sustrato para lipasa y la segunda el buffer para llevar a cabo la reacción. La Solución A se preparó diluyendo el *p*NPP en isopropanol, a una concentración estándar de 3 mg/mL. La Solución B estaba compuesta por: 4.4 mg/mL del surfactante Tritón X-100 y 1.1 mg/mL de goma arábiga en buffer fosfato 50 mM (Bussamara et al., 2010; Damaso et al., 2013).

La Solución C se preparó con la Solución B previamente calentada a 45°C, y la adición lenta y bajo agitación de la Solución A en proporción 1:10. Para comenzar la reacción, se mezcló 0.9 mL de la Solución C precalentada por dos minutos y 0.1 mL de la lipasa (extracto proteico en concentración 30 µg/mL). Luego, la mezcla se agitó en vórtex por 10 segundos. Como blanco se utilizó 0.9 mL de la Solución C y 0.1 mL de buffer fosfato 50 mM, pH 7.0 (solución en la cual se encontraba la enzima) (Damaso et al., 2013; Mercado-Malebrán, 2014).

Los ensayos se efectuaron midiendo la absorbancia (A_{410}) de la mezcla de reacción en un espectrofotómetro durante 30 minutos. La primera medición se realizó al minuto de iniciada la reacción, la segunda a los dos minutos y a partir de entonces cada dos minutos. Las concentraciones se hallaron a partir de la A_{410} utilizando la curva estándar de *p*NP. Posteriormente, se construyó la curva de progreso graficando concentración de producto (*p*NP) vs tiempo (Wrolstad et al., 2005; Bussamara et al., 2010).

4.7.3. CÁLCULO DE LA VELOCIDAD DE REACCIÓN

La velocidad de reacción (V_0) se calculó estimando la pendiente de la curva de progreso en el intervalo de 0-6 minutos del total 30 minutos que duró la reacción. Aquí la concentración de producto liberado es una función lineal del tiempo (García Román, 2005;

Wrolstad et al., 2005). La velocidad de reacción se calculó con la ecuación 2. Las unidades utilizadas fueron $\mu\text{mol}/\text{min}$.

$$ac = pendiente = \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} \quad \text{Eq. 2}$$

4.7.4. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se midió en Unidades de Enzima. Una Unidad de Lipasa (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*NP por minuto en las condiciones experimentales deseadas (Hasan et al., 2009; Bussamara et al., 2010; Damaso et al., 2013). Una vez estimada la velocidad de reacción, la actividad se calculó por medio de la ecuación 3:

$$Actividad \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(ac \times d \times 10^4)}{\epsilon} \quad \text{Eq. 3}$$

Donde *ac* es la velocidad de reacción (coeficiente angular), *d* es el factor de dilución de la enzima, ϵ es el coeficiente de absorción molar y 10^4 es el factor de corrección para obtener el valor de ϵ en μmoles , proporcionar la actividad en 1 mL (volumen de reacción) e introducir en el cálculo el volumen de lipasa añadido (100 μL) (Damaso et al., 2013).

4.8. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS

El análisis de la cantidad de enzimas producidas en el medio inductor se realizó cuantificando la actividad enzimática a la concentración estándar de $[\text{S}_E] = 790 \mu\text{M}$ (se procede según el apartado 4.7.2). La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos en condiciones estándar de pH y temperatura (7.0 y 37°C). Se hicieron 5 repeticiones. Posteriormente, se construyó la curva de progreso y se calculó la velocidad de reacción (Eq.2) y la actividad enzimática en U/L (Eq.3).

4.9. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática de la lipasa se examinó estudiando los cambios de velocidad en respuesta a cambios de concentración de sustrato. Se utilizaron diferentes concentraciones de sustrato [S] que incluyen: 7.9, 79, 400, 790 y 1600 μM y se procedió como el apartado 4.7.2 a las concentraciones de Solución A antes mencionadas. El ensayo de actividad enzimática para cada concentración se efectuó en un periodo de 30 minutos en condiciones de ensayo estándar: 37°C y pH 7. Se realizaron 3 repeticiones.

Se construyeron cinco curvas de progreso y se determinó la velocidad de reacción V_0 (Eq.2) para cada una. Posteriormente, se elaboró la curva cinética graficando las velocidades en función de sus respectivas concentraciones de sustrato. Para hallar los parámetros aparentes (K_M y V_{max}), se adoptó la cinética de Michaelis-Menten y su linealización bajo el método de Lineaweaver-Burk (Eq.4):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Eq. 4}$$

Donde V_0 es la velocidad de reacción, K_M es la constante de Michaelis-Menten, V_{max} es la velocidad máxima de reacción y S es la concentración de sustrato. La linealización de la curva se realizó usando los dobles recíprocos de las cinco concentraciones de sustrato [S] y sus respectivas velocidades de reacción (V_0). Luego, se elaboró la gráfica $\frac{1}{S}$ vs $\frac{1}{V_0}$ y se determinó la ecuación de la recta. Esta ecuación se ajustó a la función lineal (Eq.5):

$$y = mx + b \quad \text{Eq. 5}$$

Siendo m la pendiente de la recta obtenida en la linealización, se tiene de Eq. 4 que (Eq.6):

$$m = \frac{K_M}{V_{max}} \quad \text{Eq. 6}$$

Despejando la K_M se tiene (Eq.6.1):

$$K_M = mV_{max} \quad \text{Eq. 6.1}$$

Para la estimación de la V_{max} , se partió de la ordenada en el origen b (Eq.7):

$$b = \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Eq. 7}$$

Despejando la V_{max} se tiene (Eq7.1):

$$V_{max} = \frac{1}{b} \quad \text{Eq. 7.1}$$

Para la obtención de la K_M se reemplazó Eq.7.1 en Eq.6.1, obteniendo (Eq.8):

$$K_M = \frac{m}{b} \quad \text{Eq. 8}$$

Los parámetros aparentes, estimados con las Ecuaciones 7.1 y 8 en base a la ecuación de la recta obtenida en la linealización, se calcularon a partir de dos conjuntos de datos. El primer conjunto se conformó por los valores de las cinco $[S]$ y sus respectivas velocidades de reacción (V_0). En el segundo conjunto, se omitieron los datos de $[S_2]=79 \mu\text{M}$ y $[S_3]=400 \mu\text{M}$, los cuales correspondían al intervalo anterior a la adsorción al sustrato y activación interfacial. Finalmente, se empleó el software GraphPad Prism 7.0 para estimar los parámetros cinéticos aparentes ajustados al modelo alostérico-sigmoidal.

4.10. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA

La estabilidad térmica de la lipasa se determinó midiendo la actividad residual de la enzima luego de incubar 0.1 mL de solución enzimática por 1 hora a distintas temperaturas:

30°C, 40°C, 50°C y 60°C en ausencia de sustrato. La actividad residual de cada muestra fue posteriormente evaluada a 50 °C y pH 7 durante 30 minutos (Bussamara et al., 2010; Juntachai, Oura, y Kajiwara, 2011). Se utilizó la concentración de sustrato estándar $[S_E]=790 \mu\text{M}$ para todos los ensayos de actividad residual, según el apartado 4.7.2.

Se realizaron de 4 repeticiones para cada ensayo. Posteriormente, se calculó la velocidad de reacción y la actividad promedio. A partir de los datos obtenidos, se construyó una gráfica con la actividad relativa en función de la temperatura. En los análisis estadísticos, se realizó un ANOVA en DCA para muestras desiguales y una prueba de Tukey.

4.11. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL pH

El pH óptimo se determinó cuantificando la actividad enzimática con diferentes pH: 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 y 10.0. Este rango de pH es utilizado para evaluar la actividad lipídica en función del pH. De ser requerido se pueden incorporar más puntos (Bussamara et al., 2010; Juntachai et al., 2011). Los diferentes pH se ajustaron en el buffer fosfato de la Solución B según el apartado 4.7.2. Se realizaron 4 repeticiones a temperatura de 37°C y concentración de sustrato estándar $[S_E]=790 \mu\text{M}$ durante 30 minutos. Luego, se calcularon los valores de velocidad y actividad enzimática. A partir de los datos obtenidos, se construyó una gráfica con la actividad relativa en función del pH. En los análisis estadísticos, se realizó un ANOVA en DCA para muestras desiguales y una prueba de Tukey.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. INDUCCIÓN A LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS

El sobrenadante extraído (Fig. 1) posterior a los 40 días de incubación de *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073) en el medio inductor, tuvo la apariencia de una mezcla homogénea de color amarillo claro. Esta observación empírica sugiere la degradación del aceite de oliva por parte de lipasas extracelulares, las cuales son inducidas principalmente en presencia de grasas o aceite en el medio de cultivo (R. Sharma et al., 2001; Lux et al., 2007). No obstante, es necesaria una confirmación mediante pruebas bioquímicas. Las levaduras productoras de lipasas tienen la capacidad de producir la enzima unida a la célula o de secretarla libre en el medio (Hadeball, 1991); por tanto, la mayoría de lipasas son extracelulares (Vakhlu y Kour, 2006).

5.2. OBTECIÓN DE LIPASAS POR PRECIPITACIÓN PROTEICA

Se obtuvo un extracto proteico mediante la precipitación con sulfato de amonio (Fig 2A). La prueba de Bradford demostró que la muestra contenía proteínas en concentraciones de 0.30-0.40 mg/mL (Fig 2B). Las lipasas, por su naturaleza proteica, pueden ser separadas de los demás componentes del sobrenadante por medio de una precipitación de proteínas; sin embargo, su purificación total de otras proteínas, emplea métodos más complejos y no siempre es requerida para mediciones de actividad enzimática (Joseph et al., 2012).

5.3. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD LIPASA

La presencia de lipasas en el extracto proteico se determinó por el método cromogénico. Al final del periodo de incubación, la muestra proteica más concentrada (0.4 mg/mL) presentó un anillo amarillo de un 1 cm de diámetro alrededor del pocillo (Fig 3A). Las muestras diluidas en buffer fosfato (0.04 y 0.004 mg/mL) presentaron un halo menor, difuminado y casi imperceptible (Fig 3B y 3C). La dilución de la muestra en agua no presentó la formación del anillo (Fig 3F). Por lo tanto, los resultados muestran que el uso de un buffer, en este caso buffer fosfato a pH 7, favoreció la actividad enzimática, debido que

mayoría de lipasas trabajan en un rango óptimo de pH entre 7.0 y 8.0 (R. Sharma et al., 2001). Por otro lado, en el caso de las muestras control no hubo formación del halo (Fig 3D y 3E), descartando cualquier interferencia en la reacción.

El medio cromogénico evidenció la presencia de actividad de lipasas. El rojo fenol del medio toma la coloración amarilla cuando el pH es ácido indicando la presencia de lipasas en el extracto. La acidificación es provocada por la liberación de ácidos grasos del aceite de oliva, a causa de la hidrólisis enzimática del enlace éster del triacilglicérido. La disociación de protones H^+ del grupo ácido carboxílico libre se detectó colorimétricamente por el viraje de rojo a amarillo (Nath y Hindumathy, 2012).

Existen sustratos usualmente empleados para la detección de lipasas, como Tweens (ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitano), trioleína y tributirina. Sin embargo, éstos no diferencian entre la actividad lipasa y esterasa. Por este motivo, el sustrato a escoger es muy importante para determinar la naturaleza de la enzima. El método de detección empleado en este estudio utiliza aceite de oliva como sustrato para detectar lipasas, pues estas actúan sobre triacilglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga (Plou et al., 1998; Rajni Singh et al., 2006).

5.4. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA LIPASA

Mediante una electroforesis SDS-PAGE se estimó el peso molecular de las lipasas contenidas en el extracto proteico al comparar con la escalera de pesos moleculares. En el gel de electroforesis desnaturizante se observan 7 bandas, de las cuales 3 se encuentran en el rango entre 38 y 50 kDa aproximadamente, según el software GelAnalyzer (Fig 4). Además, estas últimas son bandas más intensas en relación a las otras, lo cual indica mayor concentración proteica. En bibliografía se reporta que la mayoría de lipasas de levaduras son glicoproteínas monoméricas con un peso molecular que varía entre ~33 a ~65 kDa (Vakhlu y Kour, 2006), sugiriendo que al menos una de las proteínas obtenidas en este estudio podría corresponder a una lipasa con un peso molecular entre 38 y 50 kDa.

Es necesario señalar que el extracto proteico no es la enzima totalmente purificada. En consecuencia, puede existir un consorcio heterogéneo de lipasas (distintas formas de la

lipasa) que son visualizadas en el gel como bandas entre 38 y 50 kDa. Más del 50% de las levaduras reportadas como productoras de lipasas producen la enzima en forma de varias isoenzimas, la producción de ellas está determinada por las condiciones de cultivo, que influyen tanto en la producción, como en las modificaciones post-transcripcionales del patrón de formación de las múltiples formas de lipasa. Además, estas no varían tanto en su peso molecular como en su glicosilación proteica (R. Sharma et al., 2001; Vakhlu y Kour, 2006). Berg et al (2014) menciona que gran parte de lo aprendido hasta ahora sobre enzimas procede de este tipo de experimentos, denominados *estudios en masa*.

5.5. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS

El análisis de la cantidad de enzima producida por *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073) en el medio inductor se cuantificó en términos de actividad enzimática (U/L) (Treichel et al., 2010). En la Figura 5 se muestra la curva de progreso medida en condiciones estándar con velocidad de reacción $V_0 = 4.9 \mu\text{mol}/\text{min}$. La actividad enzimática se determinó en 0.27 U/mL (Tabla 1). Este valor hace referencia a la cantidad de enzima activa producida por unidad de volumen en el medio utilizado. Por otra parte, la concentración de sustrato utilizada (790 μM) es estandarizada para los ensayos de actividad lipolítica, suficiente para saturar cualquier concentración de enzima y poder estimar la actividad de la lipasa, que será proporcional a la cantidad de enzima presente (Worthington Biochemical Corporation, 2017).

La actividad lipolítica en el líquido sobrenadante del cultivo depende de la cantidad de lipasa presente y de su actividad. La cantidad de lipasa presente, en un momento dado, depende de la diferencia entre la enzima producida y destruida. Además, la producción es una función del crecimiento microbiano, la producción y excreción de la enzima por célula y por minuto (Jonsson y Snygg, 1974).

En los estudios realizados sobre la producción de lipasas (Rapp y Backhaus, 1992; Cardenas et al., 2001; Bussamara et al., 2010; A. K. Singh y Mukhopadhyay, 2012; Thakur, 2012) se distingue: actividades enzimáticas en medios de cultivo optimizados y en medios de cultivo no optimizados. La actividad obtenida de 0.27 U/mL para la lipasa de *G. pullulans* proviene de un medio no optimizado. Este valor se ubica en la categoría con mayor actividad

(96-300 U/L) al comparar con los alcanzados en el estudio de Bussamara et al. (2010), donde reportan actividades enzimáticas entre 0.002-0.3 U/mL para 29 aislados de levadura en medios inductores no optimizados. Además, también es superior a las reportadas por Rapp y Backhaus (1992) para 15 aislados de levaduras en medios no optimizados, las cuales están en el rango de 0.002-0.15 U/L.

Otros estudios reportan actividades superiores a la obtenida en medios no optimizados: 0.75 U/mL y 3.64 U/mL (*Rhodotorula araucariae*), correspondientes a la actividad en dos sustratos distintos: aceite de oliva y tributirina respectivamente (Cardenas et al., 2001). Esto evidencia la posibilidad de aumentar significativamente la actividad enzimática cambiando el sustrato en el medio inductor (Hadeball, 1991; Muralidhar, Chirumamila, Marchant, y Nigam, 2001; Fickers, Nicaud, Gaillardin, Destain, y Thonart, 2004).

Sin embargo, en medios de cultivo optimizados, se logra incrementar significativamente la actividad enzimática. Por ejemplo, *Candida rugosa* puede aumentar su actividad de 20-40 U/mL a 117 U/mL mediante varios procesos de optimización. (Tan, Zhang, Wang, Ying, y Deng, 2003).

Estudios iniciales de *Candida rugosa*, catalogada como la mejor productora de lipasas, analizaban el efecto combinatorio de distintas fuentes de carbono en la actividad enzimática para su optimización. Los resultados mostraron actividades entre 0.1-0.7 U/mL (Dalmau, Montesinos, Lotti, y Casas, 2000). Al contrastar con la actividad alcanzada en esta investigación para la lipasa de *G. pullulans* (0.27 U/mL), esta se encuentra dentro del rango mencionado, indicando la posibilidad que, mediante varios procesos de optimización, *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073) podría aumentar su producción de lipasas tal como sucedió con *C. rugosa* en medios optimizados.

Las formas de optimización abarcan cambios en los factores que influyen la producción de lipasas, tales como: la composición del medio (fuente de carbono y nitrógeno), pH, presencia de activadores e inhibidores que afecten el crecimiento celular y la producción de lipasas, agentes que afecten la interfase, procesos de fermentación, etc. (Hadeball, 1991; R. Sharma et al., 2001; Dhiman y Chapadgaonkar, 2013).

Otro elemento influyente en la producción de lipasas es el tiempo de incubación y la temperatura. La tasa de crecimiento microbiano depende en gran medida de estos dos factores, lo que afecta la producción de la lipasa (Park, Kim, Bae, Hou, y Kim, 2013). En este estudio, *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073) fue incubada durante 960 horas (40 días) a 20° C, tiempo donde se detectó alta concentración de proteínas. Los tiempos de incubación reportados en la literatura se encuentran en el rango de 24 a 180 horas, dependiendo del método de cultivo, el microorganismo y las formas de optimización (A. K. Singh y Mukhopadhyay, 2012). Sin embargo, en el caso de levaduras adaptadas al frío los tiempos de incubación se alargan: 240, 348 y 624 horas con temperaturas de 15-30 °C, mostrando actividades altas a 15°C y 20°C (Joseph et al., 2012; Park et al., 2013; Bae et al., 2014).

Las cepas antárticas tienen tiempos largos de generación: 2-10 h en ausencia de estrés celular. Aunque a temperaturas más altas (> 20 °C) el tiempo de generación se acorta, esto induce el estrés celular, lo que conduce a una baja densidad de crecimiento celular y baja producción de enzimas extracelulares (Park et al., 2013).

La incubación de la levadura en el medio inductor más allá del tiempo óptimo resulta en una disminución rápida en el rendimiento de la lipasa, lo que posiblemente ocurrió en el caso de *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073). Esta reducción en el rendimiento después de un período óptimo probablemente se deba al agotamiento de los nutrientes disponibles para las células (Joseph et al., 2012). El tiempo óptimo de incubación para la producción máxima de lipasas puede alterarse modificando las condiciones nutricionales que influyen su crecimiento celular (Park et al., 2013).

Guehomyces pullulans fue recientemente reportada como productora de lipasas en una bioprospección de 102 aislados de levaduras antárticas en el cual se determinaron dos aislados psicotolerantes y un aislado psicrófilo (Martorell et al., 2017). No obstante, no existe información adicional en la literatura sobre los factores y condiciones que controlan su biosíntesis y secreción, es decir, las condiciones óptimas de cultivo para la producción enzimática. Por tal motivo, los resultados obtenidos en esta investigación deben considerarse como una base para mejorar la producción de lipasa de *Guehomyces pullulans* en posteriores estudios de optimización.

5.6. CINÉTICA ENZIMÁTICA

En la construcción de la curva cinética de la lipasa de *G. pullulans* se obtuvieron cinco curvas de progreso que se muestran en la Figura 6 y sus respectivas V_0 medidas en condiciones estándar (Tabla 2). En la Figura 6 se observa la diferencia en el avance de la reacción a distintas concentraciones de sustrato. Para las concentraciones más bajas, $[S_1]$ y $[S_2]$, las curvas de progreso presentan similar comportamiento y sus V_0 no difieren debido al fenómeno de activación interfacial (Tabla 2). Aunque normalmente el equilibrio para cada curva de progreso se alcanza a diferentes niveles, en las lipasas, esta condición se cumple desde una determinada concentración de sustrato: cuando ésta ha excedido el límite de solubilidad (Marangoni, 2003; Reis et al., 2009). Por ello, para las concentraciones $[S_1]$ y $[S_2]$ las curvas de progreso llegan al equilibrio a un mismo nivel y con poco producto formado a pesar de tener concentraciones distintas. En cambio, las curvas de progreso con las concentraciones $[S_E]$ y $[S_4]$ poseen V_0 mayores (Tabla 2), con niveles de equilibrio más altos que en $[S_1]$ y $[S_2]$ y diferentes entre sí, pues el límite de solubilidad fue superado. No obstante, a pesar de que $[S_4]$ es mayor que $[S_E]$, el equilibrio de $[S_4]$ se alcanzó a un nivel inferior al de $[S_E]$ (Fig. 6). Muy probablemente, la razón de este hecho son los cambios en el tiempo de la calidad interfacial, los cuales afectan la catálisis interfacial y, por consiguiente, a la generación de producto. Sin embargo, estos fenómenos han sido poco estudiados por su complejidad (Straathof, 2003; Reis et al., 2009).

La curva cinética obtenida para la lipasa de *G. pullulans* se muestra en la Figura 7. En ella se observa la presencia del fenómeno de activación y catálisis interfacial como ocurre en la mayoría de lipasas (Verger, 1997; Sánchez Ferrer, 1998; R. Sharma et al., 2001; Reis et al., 2009). En la cinética interfacial obtenida la velocidad de reacción aumenta a partir de $[S_3]=400 \mu\text{M}$, definiéndose este valor como un aproximado a la concentración micelar crítica. Desde este punto, la velocidad incrementa con la concentración de sustrato, el cual, en el caso de la cinética interfacial, se refiere al aumento en el número de gotas de sustrato presentes en el sistema (Marangoni, 2003).

Los parámetros cinéticos calculados (K_M y V_{max}) se muestran en la Tabla 3. Estos se obtuvieron ajustando la curva cinética interfacial (Fig. 7) al modelo de Michaelis-Menten mediante la linealización por el método de Lineweaver-Burk (Fig. 8 y 9). También se realizó el ajuste al modelo alostérico sigmoidal (Fig. 10). En la linealización se trabajó con dos

grupos de resultados: el primero, contiene todas las concentraciones de sustrato y sus respectivas velocidades de reacción (Fig. 8). El segundo, omite $[S_2]$ y $[S_3]$ como mecanismo de ajuste al modelo de Michaelis-Menten (Fig. 9). En la primera linealización se obtuvo un $R^2 = 0.5$, mientras que en la segunda linealización se llegó a un $R^2 \approx 1$. Por esta razón, los parámetros cinéticos calculados con la linealización 1 se descartaron. El bajo R^2 en la primera linealización indica que la cinética obtenida no se ajusta correctamente al modelo de Michaelis-Menten y la incorporación de más puntos no conduciría a mejorar el ajuste, pues la tendencia está definida. Esto confirma la cinética interfacial propia de una lipasa. Por otra parte, el ajuste alostérico sigmoidal tuvo un R^2 alto como en la segunda linealización (Figura 10); sin embargo, el cálculo de V_{max} , a partir de este modelo, igualó la velocidad máxima obtenida experimentalmente (Tabla 2 y 3). Es decir, la V_{max} experimental llegó a la asíntota que representa V_{max} matemáticamente. Empíricamente esto es imposible. Cuando la curva cinética muestra que la enzima alcanza la asíntota de V_{max} , es una gráfica ilusoria (Berg et al., 2014).

Por tanto, la segunda linealización resultó la mejor para expresar los parámetros cinéticos, siendo estos: $K_M = 3.68 \times 10^{-4}$ M y $V_{max} = 6.7$ $\mu\text{mol}/\text{min}$ (Tabla 3). Comparado con las lipasas más importantes de levaduras, como la lipasa de *Pichia linyferdii* Y-7723 reportada con un K_M de 1.68×10^{-3} M (Bae et al., 2014), el valor de K_M obtenido para la lipasa de *G. pullulans* es mucho menor. El bajo valor de K_M indica que la afinidad de la enzima de *G. pullulans* con respecto al sustrato es relativamente alta. Por otro lado, es similar a la K_M de la lipasa B de *Candida rugosa*, cuyo K_M es 4.2×10^{-4} M (Pereira, De Castro, De Moraes, y Zanin, 2001). Con respecto a la lipasa de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 cuyo K_M reportado es 2.2×10^{-5} M (Sathish Yadav et al., 2011), y a la lipasa A de *C. rugosa* con un K_M de 3.92×10^{-5} M (González et al., 2010), el K_M obtenido para la lipasa de *G. pullulans* es mayor. En este caso, la afinidad al sustrato de la lipasa de *G. pullulans* es relativamente menor a las lipasas de estas levaduras. Sin embargo, se encuentra dentro del rango ($10^{-1} \sim 10^{-5}$) de la mayoría de lipasas industriales (Bae et al., 2014). En consecuencia, este resultado sugiere que la lipasa de *G. pullulans* (CLQCA-ANT-073) tendría potencial uso industrial. En cuanto a la V_{max} , ésta depende de la concentración de enzima utilizada, por tanto, es variable y no se puede comparar. Tampoco se determinó K_{cat} debido a que se desconoce la concentración de enzima total $[E_T]$ al tratarse de una enzima no purificada.

Es importante tener en cuenta que para obtener parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) ajustados exactamente a la cinética interfacial, se debe incluir en el modelo el tamaño de gota y su área interfacial. Un factor que influye de forma determinante en la hidrólisis enzimática, en emulsión acuosa, es su área interfacial específica, que viene determinada por la distribución de tamaños de gota en la emulsión. Cuanto mayor sea el área interfacial de la emulsión, mayor será la superficie que queda expuesta a la enzima, lo cual favorece la acción de ésta. Por esta razón, para estudiar la cinética lipídica, resulta de gran utilidad conocer la distribución de tamaños de gota de las emulsiones, así como el área interfacial de las mismas. Sin embargo, estas mediciones requieren de equipo más especializado (difractómetro de luz láser). De otra manera, se pueden realizar ajustes a modelos más simples como en la mayoría de estudios, para obtener los denominados parámetros aparentes (Marangoni, 2003; García Román, 2005).

5.7. ESTABILIDAD TÉRMICA

La temperatura es un parámetro que se encuentra estrechamente relacionado a la capacidad catalítica de la enzima. El aumento de temperatura incrementa las vibraciones de las partículas, lo cual se traduce en el incremento de la velocidad del movimiento browniano de las moléculas, con lo que las interacciones entre una enzima y sustrato son más probables. En este aspecto, la velocidad de la mayoría de reacciones aumenta. Por otro lado, cuando la temperatura incrementa por encima de cierto punto, los enlaces débiles que mantienen la estructura tridimensional de la enzima no son lo suficientemente fuertes para soportar la agitación térmica y esta pierde la estructura (desnaturalización) (Lehninger et al., 2005; Berg et al., 2014). La estabilidad térmica o termoestabilidad es la resistencia a esta desnaturalización, la cual depende las características de flexibilidad de la enzima y de su estructura (Mercado-Malebrán, 2014).

La actividad de la lipasa de *G. pullulans* se evaluó después de su incubación en amplio rango de temperaturas 30°C - 60°C (Tabla 4). Las diferencias en la actividad fueron significativas para las diferentes temperaturas estudiadas (Tabla 5). En la Figura 11, se muestra el efecto de la temperatura en la estabilidad térmica de la lipasa, con máxima actividad a 40°C. A 50°C la enzima retiene el 80% de su actividad máxima. En cambio, a

30°C y 60°C la lipasa solo retiene el 45%. Por tanto, la temperatura óptima de estabilidad para la lipasa se definió en el rango de 40 °C - 50 °C (Tabla 6).

Este rango coincide con la mayoría de lipasas microbianas, las cuales muestran alta actividad a temperaturas entre 30 y 50 °C, con una actividad máxima alrededor de los 40 °C (Joseph et al., 2012; Park et al., 2013; Kavitha, 2016). A pesar que el aislado de *G. pullulans* proviene de la Antártida, la enzima presentó relativamente alta termoestabilidad (40-50°C), en comparación con la lipasa activa en frío de *Pichia lynchii* Y-7723, la cual presenta estabilidad en un rango de 5-30 °C (Bae et al., 2014), y con la lipasa de *Candida rugosa*, cuya estabilidad térmica está en el rango de 35-40°C (Vakhlu y Kour, 2006). Comúnmente, las lipasas activas en frío exhiben una actividad alta a bajas temperaturas (0-20 °C), pero termoestabilidad reducida. (Bae et al., 2014; Kavitha, 2016). Por otro lado, las lipasas altamente termoestables muestran valores de temperatura óptima de 50-75°C (González et al., 2010; D. Sharma et al., 2011). Esto descarta a la lipasa de *G. pullulans* como activa en frío, pero demuestra su mayor termoestabilidad. En consecuencia, la temperatura óptima de la lipasa de *G. pullulans* (40-50°C) es altamente favorable, ya que al ser termoestable hasta los 50°C requiere relativamente menos energía de activación que las altamente termoestables y, a su vez, es suficientemente alta para propiciar menores riesgos de contaminación microbiana en procesos industriales (Pereira et al., 2001; Hasan et al., 2006).

5.8. EFECTO DEL pH

En muchos casos la actividad enzimática también varía con el pH, es decir, la concentración de protones (H^+) en el entorno. Ciertos aminoácidos que constituyen las proteínas de la enzima contienen grupos ionizables. Estos grupos presentan cargas positivas o negativas en función de la concentración de protones en el medio. Una enzima, para ser funcional, puede depender de la ionización de ciertos residuos en su centro activo. El cambio en el pH da como resultado un cambio en las cargas de las cadenas laterales de aminoácidos de una proteína, seguidas de posibles cambios conformacionales del sitio activo de la enzima, relacionado con sus propiedades catalíticas (Bae et al., 2014; Berg et al., 2014).

La actividad de la lipasa de *G. pullulans* se obtuvo para un rango de pH de 6.0-10.0 (Tabla 7). Los resultados de actividad enzimática mostraron diferencias significativas para los distintos valores de pH, lo cual indica la dependencia de la lipasa del pH (Tabla 8). En

la Figura 12, se muestra el efecto del pH en la actividad enzimática de la lipasa, con una actividad máxima a pH 8.0. Sin embargo, a pH neutro la enzima aún retiene el 83% de su actividad máxima. Por otro lado, a pH 6.0 y 9.0 la enzima solo retiene el 36 y 42% respectivamente. La mayor pérdida de actividad se registró a un pH de 10.0, donde la enzima retuvo el 10% de su actividad máxima. El pH óptimo se definió en 8.0 (Tabla 9).

La mayoría de las lipasas reportadas en la literatura tienen actividad óptima a valores de pH neutros o ligeramente básicos, como es el caso de las lipasas de *C. rugosa*, cuyos valores óptimos de 7.8 se asemejan a los obtenidos en este estudio para la lipasa de *G. pullulans* (R. Sharma et al., 2001; Vakhlu y Kour, 2006; Bussamara et al., 2010). Se ha propuesto que esta tendencia podría deberse a una repulsión electrostática entre el sitio activo cargado negativamente de la lipasa y los ácidos grasos ionizados a pH alcalino, lo que conduce a una liberación rápida de los productos de la reacción de la lipólisis de la interfaz (Reis et al., 2009).

6. CONCLUSIONES

La producción de lipasas de *Guehomyces pullulans* (CLQCA-ANT-073), en medio inductor con aceite de oliva, fue significativa considerando que se trataba de un medio no optimizado. Sin embargo, se puede mejorar en gran medida la producción de lipasas mediante procesos de optimización variando nutrientes, tiempo de incubación, pH y temperatura.

Este estudio constituye una base necesaria para posteriores trabajos sobre optimización en la producción de lipasas por parte de *Guehomyces pullulans*.

El extracto enzimático obtenido, probablemente contiene varias formas de lipasa, lo cual da lugar a estudios posteriores para su purificación total.

La cinética de la lipasa de *Guehomyces pullulans* presentó el fenómeno de activación y catálisis interfacial; por tanto, el área interfacial específica constituye un factor para mejorar la velocidad de la catálisis.

Los parámetros cinéticos de la lipasa de *Guehomyces pullulans* son comparables a las lipasas más importantes de otras levaduras y muestran la potencialidad de la enzima para posibles usos industriales.

La lipasa parcialmente purificada de *Guehomyces pullulans* mostró una dependencia significativa del pH y temperatura para lograr una actividad enzimática máxima.

Si bien la levadura *Guehomyces pullulans* fue recientemente catalogada como productora de lipasas, este estudio es el primero que realiza una caracterización de su enzima.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aloulou, Ahmed, Rodriguez, Jorge A., Fernandez, Sylvie, van Oosterhout, Dirk, Puccinelli, Delphine, y Carrière, Frédéric. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi:10.1016/j.bbailip.2006.06.009
- Anbu, Periasamy, Gopinath, Subash C. B., Chaulagain, Bidur Prasad, y Lakshmi Priya, Thangavel. (2017). Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. *BioMed Research International*, 2017. doi:10.1155/2017/2195808
- Bae, Jae Han, Kwon, Mi Hyun, Kim, In Hwan, Hou, Ching T., y Kim, Hak Ryul. (2014). Purification and characterization of a cold-active lipase from *Pichia lynnferdii* Y-7723: pH-dependant activity deviation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(5), 851-857. doi:10.1007/s12257-014-0300-5
- Baeza, Marcelo, Alcaíno, Jennifer, Cifuentes, Víctor, Turchetti, Benedetta, y Buzzini, Pietro. (2017). Cold-active enzymes from cold-adapted yeasts. En *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* (pp. 297-324). doi:10.1007/978-3-319-58829-2_10
- Barriuso, Jorge, Vaquero, María Eugenia, Prieto, Alicia, y Martínez, María Jesús. (2016). Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.05.004
- Berg, J. Mark, Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2014). *Biochemistry A Short Course. Biochemistry textbook* (Segunda.). Barcelona: Editorial Reverté. doi:10.1016/S0300-9084(98)80081-3
- Bussamara, Roberta, Fuentesfria, Alexandre Meneghello, Oliveira, Eder Silva de, Broetto, Leonardo, Simcikova, Michaela, Valente, Patricia, ... Vainstein, Marilene Henning. (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, 101(1), 268-275. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.063

- Cardenas, Fernando, Alvarez, Emilio, De Castro-Alvarez, Maria Soledad, Sanchez-Montero, Jose Maria, Valmaseda, Manuel, Elson, Steve W., y Sinisterra, Jose Vicente. (2001). Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 14(4-6), 111-123. doi:10.1016/S1381-1177(00)00244-7
- Choi, Jung Min, Han, Sang Soo, y Kim, Hak Sung. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014
- Dalmau, E., Montesinos, J. ..., Lotti, M., y Casas, C. (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), 657-663. doi:10.1016/S0141-0229(00)00156-3
- Damaso, M. C. T., Salum, T. F. C., Terzi, S. D. ..., y Couri, S. (2013). *Assay Methods for Lipase Activity. Methods to Determine Enzymatic Activity*, (Bentham.). Rio de Janeiro.
- Deems, R. A., Eaton, B. R., y Dennis, E. A. (1975). Kinetic analysis of phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 250(23), 9013-9020.
- Dhiman, Sonia, y Chapadgaonkar, Shilpa S. (2013). Optimization of lipase production medium for a bacterial isolate. *International Journal of ChemTech Research*, 5(6), 2837-2843.
- Eby, J. M., y Peretti, S. W. (2015). Performance in synthetic applications of a yeast surface display-based biocatalyst. *RSC Advances*, 5(39), 30425-30432. doi:10.1039/C5RA04039F
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., y Thonart, P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 742-749. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02190.x

- García, Humberto, y Vázquez, Rafael. (1998). Cuantificación Proteínas: una revisión. *Revista de Biotecnología UNAM*, 3, 77-78.
- García Román, Miguel. (2005). *Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones o/w. Aplicación a formulaciones detergentes*. Universidad de Granada. España.
- González, Jorge, Hernández, Jairo Rodríguez, y Martínez, Alberto Del Monte. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 124-140. Recuperado de: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574/38075>
- Guillén, Marina. (2012). Caracterización, inmovilización y aplicación en biocatálisis de la lipasa en *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*, 205.
- Gupta, R., Gupta, N., y Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-004-1568-8
- Hadeball, W. (1991). Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from yeasts. *Engineering in Life Sciences*, 11(2), 159-167. doi:<https://doi.org/10.1002/abio.370110217>
- Hasan, Fariha, Shah, Aamer Ali, y Hameed, Abdul. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Hasan, Fariha, Shah, Aamer Ali, y Hameed, Abdul. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.001
- Hill, Richard W., Wyse, Gordon a., y Anderson, Margaret. (2012). *Animal Physiology* (Third Edit.). Sunderland-Massachusetts: Sinauer Associates.

- Jaeger, Karl Erich, y Eggert, Thorsten. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/S0958-1669(02)00341-5
- Jain, Mahendra Kumar, Gelb, Michael H., Rogers, Joseph, y Berg, Otto G. (1995). Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A2. *Methods in Enzymology*, 249(C), 567-614. doi:10.1016/0076-6879(95)49049-3
- Jonsson, U., y Snygg, B. G. (1974). Lipase Production and Activity as a Function of Incubation Time, pH and Temperature of Four Lipolytic Micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 37, 671-681. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1974.tb00482.x
- Joseph, Babu, Shrivastava, Nitisha, y Ramteke, Pramod W. (2012). Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: Isolation, partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(1), 137-144. doi:10.1016/j.jgeb.2012.02.001
- Juntachai, Weerapong, Oura, Takahiro, y Kajiwara, Susumu. (2011). Purification and characterization of a secretory lipolytic enzyme, MgLIP2, from *Malassezia globosa*. *Microbiology*, 157(12), 3492-3499. doi:10.1099/mic.0.054528-0
- Kari, Jeppe, Andersen, Morten, Borch, Kim, y Westh, Peter. (2017). An Inverse Michaelis-Menten Approach for Interfacial Enzyme Kinetics. *ACS Catalysis*, 7(7), 4904-4914. doi:10.1021/acscatal.7b00838
- Kavitha, M. (2016). Cold active lipases – an update. *Frontiers in Life Science*, 9(3), 226-238. doi:10.1080/21553769.2016.1209134
- Kumar, Satyendra, Kikon, Khyodano, Upadhyay, Ashutosh, Kanwar, Shamsheer S., y Gupta, Reena. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 38-44. doi:10.1016/j.pep.2004.12.010

- Kurtzman, Cletus P., Fell, Jack W., y Boekhout, Teun. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study. The Yeasts* (5ta edició., Vol. 3). Londres: Elsevier.
- Lehninger, Albert, Nelson, David, y Cox, Michael. (2005). *Principles of Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology Education*. doi:10.1002/bmb.2005.494033010419
- Li, Shuang, Yang, Xiaofeng, Yang, Shuai, Zhu, Muzi, y Wang, Xiaoning. (2012). Technology Prospecting On Enzymes: Application, Marketing And Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. doi:10.5936/csbj.201209017
- Liu, Xiangyang, y Kokare, Chandrakant. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. En *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (pp. 267-298). doi:10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X
- Lux, Luiza, Valeriano, Lock, Corbellini, Antonio, y Valente, Patrícia. (2007). Lipases produced by yeasts: powerful biocatalysts for industrial purposes. *Tecno-lógica*, 11(2), 18-25. Recuperado de: <http://www.oalib.com/paper/2206707#.VBCbJv15NCA>
- Marangoni, Alejandro G. (2003). Interfacial Enzymes. *Enzyme Kinetics*, 121-128. doi:10.1002/0471267295.ch10
- Martorell, María Martha, Ruberto, Lucas Adolfo Mauro, Fernández, Pablo Marcelo, Castellanos de Figueroa, Lucía Inés, y Mac Cormack, Walter Patricio. (2017). Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of Basic Microbiology*, 57(6), 504-516. doi:10.1002/jobm.201700021
- Mercado-Malebrán, Francesca. (2014). *Modelamiento estructural y caracterización de una lipasa activa a bajas temperaturas mediante ingeniería de proteínas*. Universidad de Chile. Recuperado de <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/129840>

- Muralidhar, R. V., Chirumamila, R. R., Marchant, R., y Nigam, P. (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 9(1), 17-23. doi:10.1016/S1369-703X(01)00117-6
- Nath, Meenakshi, y Hindumathy, C. K. (2012). Isolation , Optimization and Purification. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 1(3), 239-246.
- NC-IUB. (1979). Units of enzyme activity. *European Journal of Biochemistry*, 97, 319-320. doi:10.1111/j.1432-1033.1979.tb13116.x
- Park, Sun Young, Kim, Ji Yeon, Bae, Jae Han, Hou, Ching T., y Kim, Hak Ryul. (2013). Optimization of culture conditions for production of a novel cold-active lipase from *Pichia lynnferdii* NRRL Y-7723. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(4), 882-886. doi:10.1021/jf304919y
- Paz y Miño, César. (2018). *Caprichos de los Genes*. Quito-Ecuador: Ediciones Abya-Yala.
- Paz Y Miño, Cesar, y Lopez Cortez, Abdres. (2014). Genetica Molecular y Citogenética Humana. En *Genetica Molecular y Citogenetica Humana Fundamentos Aplicaciones e investigacines en el Ecuador*. (pp. 2-408).
- Pereira, Ernandes, De Castro, Heizir, De Moraes, Flávio, y Zanin, Gisella. (2001). Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 91-93, 739-752. doi:10.1007/978-1-4612-0217-2_62
- Plou, F. J., Ferrer, M., Nueiro, O. M., Calvo, M. V, Alcalde, M., Reyes, F., y Ballesteros, A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques*, 12(3), 183-186. doi:Doi 10.1023/A:1008809105270
- Rapp, Peter, y Backhaus, Silke. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(11), 938-943. doi:10.1016/0141-0229(92)90059-W

- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., y Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. doi:10.1016/j.cis.2008.06.001
- Sánchez Ferrer, Antonio. (1998). *Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por Candida rugosa. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Sarda, L., y Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 30(3), 513-521. doi:10.1016/0006-3002(58)90097-0
- Sathish Yadav, K. N., Adsul, M. G., Bastawde, K. B., Jadhav, D. D., Thulasiram, H. V., y Gokhale, D. V. (2011). Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*, 102(22), 10663-10670. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.013
- Schnell, S., y Maini, P. K. (2000). Enzyme kinetics at high enzyme concentration. *Bulletin of Mathematical Biology*. doi:10.1006/bulm.1999.0163
- Sharma, D., Sharma, B., y Shukla, A. K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology*. doi:10.3923/biotech.2011.23.40
- Sharma, Rohit, Chisti, Yusuf, Chand, Uttam, y Banerjee, Uttam Chand. (2001). Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662. doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6
- Shimada, Yuji, Watanabe, Yomi, Sugihara, Akio, y Tominaga, Yoshio. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. doi:10.1016/S1381-1177(02)00020-6
- Singh, Abhishek Kumar, y Mukhopadhyay, Mausumi. (2012). Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. doi:10.1007/s12010-011-9444-3

- Singh, Rajendra, Kumar, Manoj, Mittal, Anshumali, y Mehta, Praveen Kumar. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. doi:10.1007/s13205-016-0485-8
- Singh, Rajni, Gupta, Namita, Goswami, Vineet Kumar, y Gupta, Rani. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(6), 679-682. doi:10.1007/s00253-005-0138-z
- Straathof, Adrie J. J. (2003). Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces. *Biotechnology and bioengineering*, 83(4), 371-5. doi:10.1002/bit.10688
- Szczesna-Antczak, Mirosława, Kamińska, Janina, Florczak, Tomasz, y Turkiewicz, Marianna. (2013). Cold-active yeast lipases: Recent issues and future prospects. En *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance* (pp. 353-375). doi:10.1007/978-3-642-39681-6_16
- Tan, Tianwei, Lu, Jike, Nie, Kaili, Deng, Li, y Wang, Fang. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.012
- Tan, Tianwei, Zhang, Mu, Wang, Bingwu, Ying, Chunhua, y Deng, Li. (2003). Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, 39(4), 459-465. doi:10.1016/S0032-9592(03)00091-8
- Thakur, Sumita. (2012). Lipases, Its sources, Properties and Applications: A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 3(7), 1-29.
- Treichel, Helen, de Oliveira, D??bora, Mazutti, Marcio A., Di Luccio, Marco, y Oliveira, J. Vladimir. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-009-0202-2
- Tsai, Shau-Wei -W, y Chang, Chun-Sheng -S. (1993). Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of lipids in biphasic organic—aqueous systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 57(2), 147-154. doi:10.1002/jctb.280570209

- Tsai, Shau-Wei -W, Wu, Guang-Huei -H, y Chiang, Chen-Li -L. (1991). Kinetics of enzymatic hydrolysis of olive oil in biphasic organic-aqueous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(7), 761-766. doi:10.1002/bit.260380710
- Vakhlu, Jyoti, y Kour, Avneet. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi:10.2225/vol9-issue1-fulltext-9
- Verger, Robert. (1997). «Interfacial activation» of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*. doi:10.1016/S0167-7799(96)10064-0
- Verger, Robert, y De Haas, Gerard H. (1973). Enzyme reactions in a membrane model 1: A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 10(2), 127-136. doi:10.1016/0009-3084(73)90009-1
- Worthington Biochemical Corporation. (2017). Introduction to Enzymes. *Worthington Biochemical Corporation*. Recuperado de: <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/Enzymes.pdf>
- Wrolstad, Ronald E., Acree, Terry E., Decker, Eric A., Penner, Michael H., Reid, David S., Schwartz, Steven J., ... Sporns, Peter. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry: water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates. Handbook of Food Analytical Chemistry* (Vol. 1-2). doi:10.1002/0471709085

8. FIGURAS

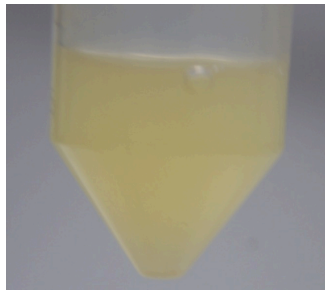


Figura 1. Sobrenadante extraído del medio de cultivo inductor. Se distingue una mezcla homogénea de color amarillo claro, debido a la degradación de los aceites por parte de las enzimas excretadas por la levadura

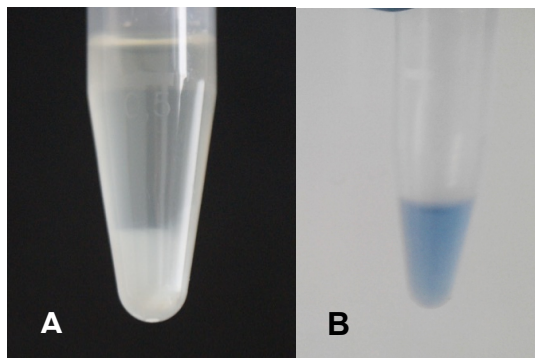


Figura 2. Enzima parcialmente purificada. A. Se observa un precipitado blanco que corresponde al extracto proteico obtenido por *salting-out* con sulfato de amonio. B. Prueba de Bradford. La coloración azul indica la presencia de proteínas en la muestra.

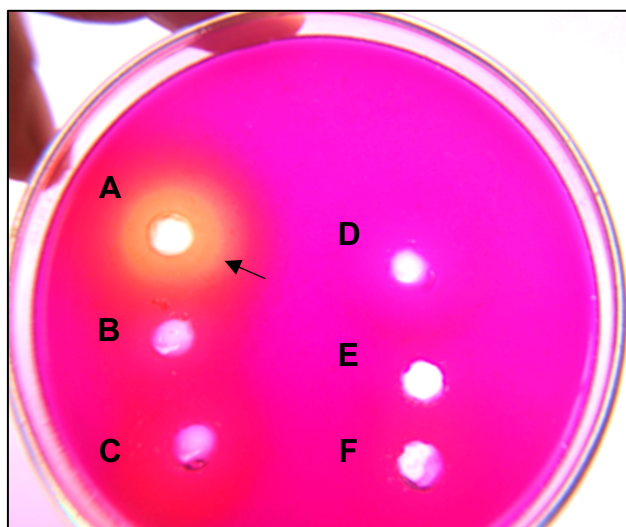


Figura 3. Detección de actividad lipasa en medio cromogénico. Se utilizaron los extractos proteicos obtenidos del medio inductor. A. Muestra concentrada (0.4 mg/mL). B. Muestra diluida en buffer (0.04 mg/mL). C. Muestra diluida en buffer (0.004 mg/mL). D. Buffer fosfato de sodio pH 7. E. Agua destilada. F. Muestra diluida en agua destilada (0.04 mg/mL). La formación de un anillo amarillo alrededor del pocillo A indica la actividad lipasa.

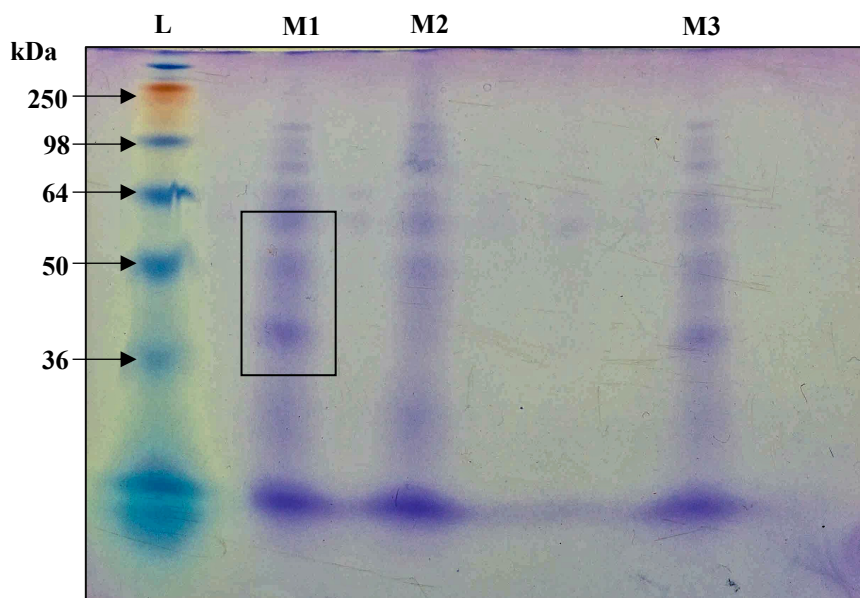


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas parcialmente purificadas. El peso molecular estimado para la lipasa fue entre 38-50 kDa. L. marcador de peso molecular, M1, M2 y M3 submuestras del extracto proteico

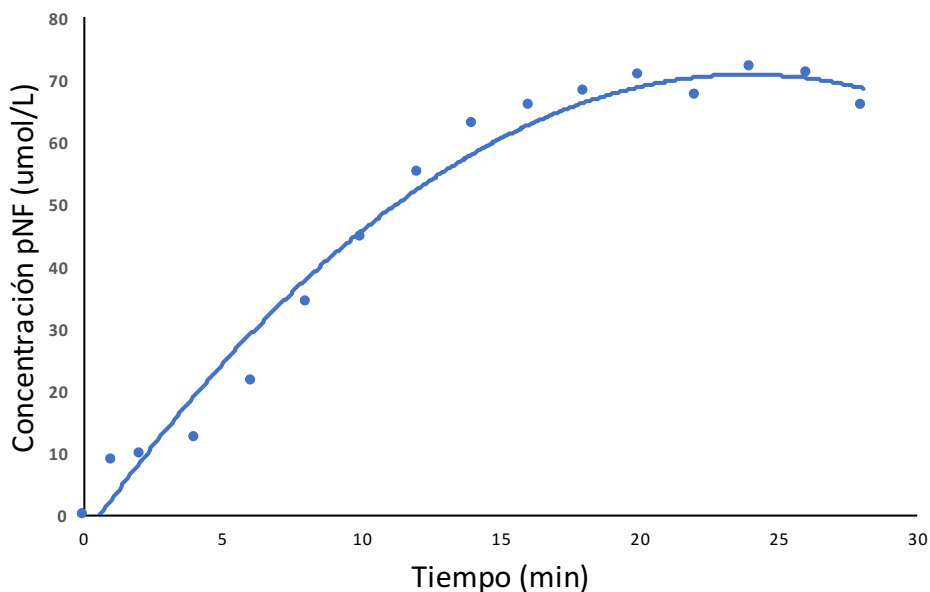


Figura 6. Curva de progreso en condiciones estándar para la lipasa de *Guehomyces pullulans* producida en medio inductor con aceite de oliva. Las condiciones estándar son: 37°C, pH 7, concentración de sustrato (*p*NPP) estándar $[S_E]= 790 \mu\text{M}$. Se observa el avance de la reacción con velocidad $V_0 = 4.9 \mu\text{mol}/\text{min}$ y actividad enzimática 0.27 U/mL

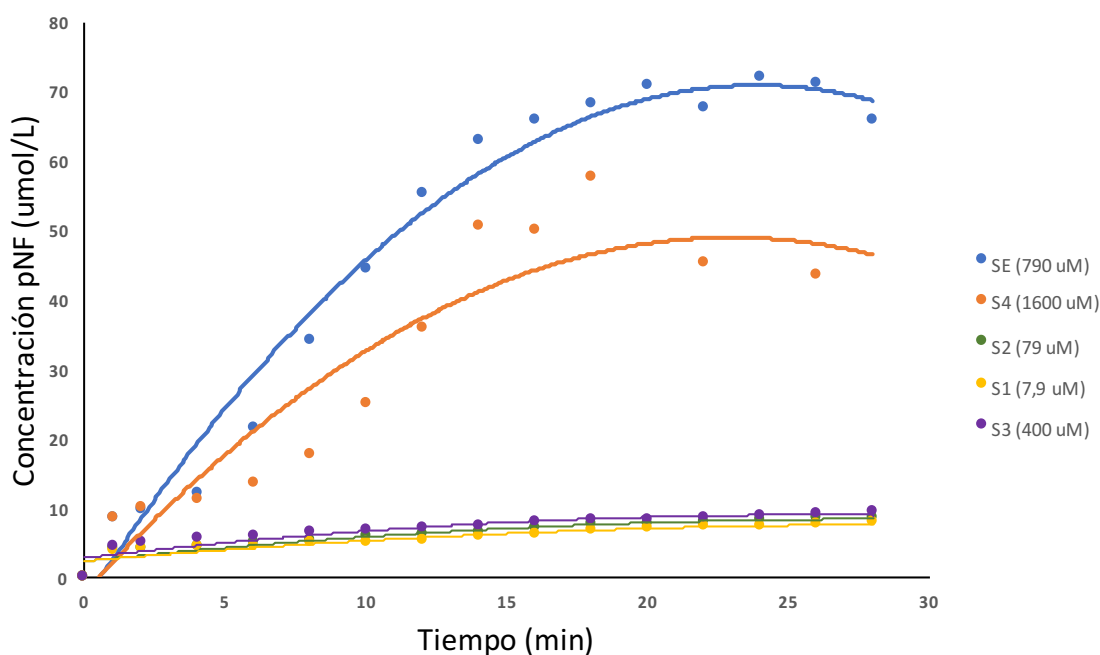


Figura 5. Curvas de progreso en condiciones estándar para la lipasa de *Guehomyces pullulans* a diferentes concentraciones de sustrato. El avance de la reacción se siguió durante 30 minutos. Las concentraciones de sustrato (*p*NPP) utilizadas: $[S_1]= 7.9 \mu\text{M}$, $[S_2]=79 \mu\text{M}$, $[S_3]=400 \mu\text{M}$, $[S_E]= 790 \mu\text{M}$, $[S_4]= 1600 \mu\text{M}$. Las concentraciones $[S_2]$ y $[S_1]$ presentan el mismo comportamiento.

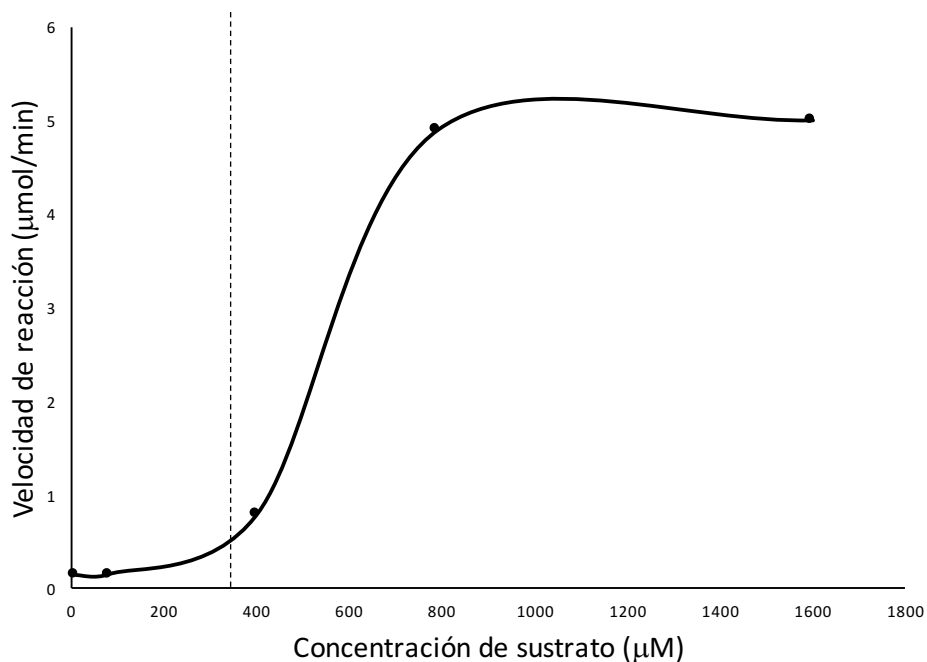


Figura 7. Cinética enzimática interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans*. La línea punteada representa el momento de activación interfacial a una concentración cercana a 400 μM . Este punto indica la concentración micelar crítica.

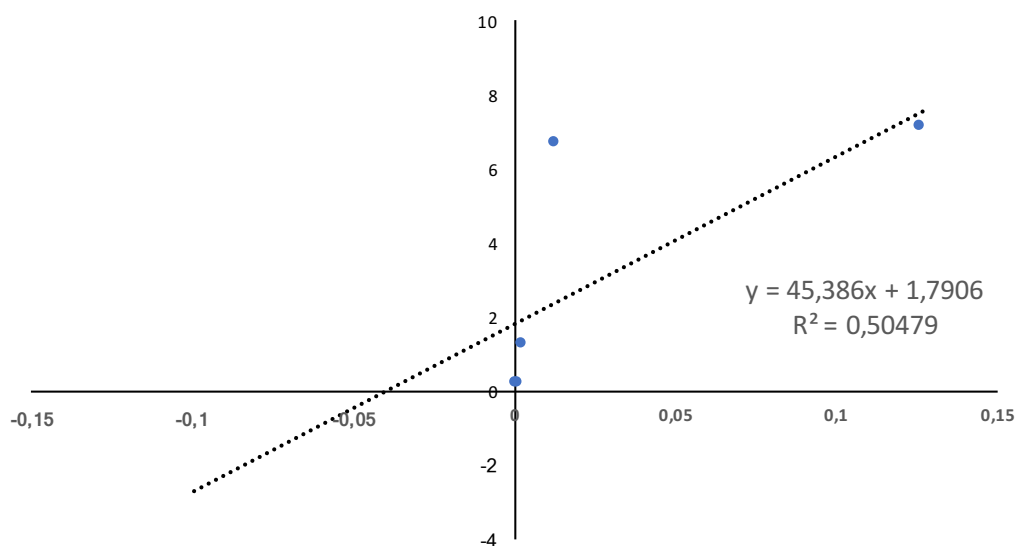


Figura 8. Representación doble recíproca Lineweaver-Burk de la cinética enzimática interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans* para todas las concentraciones de sustrato. La intersección con el eje x representa $-1/K_M$ y la intersección con el eje y representa $1/V_{\text{max}}$. La pendiente de la recta corresponde a K_M/V_{max} .

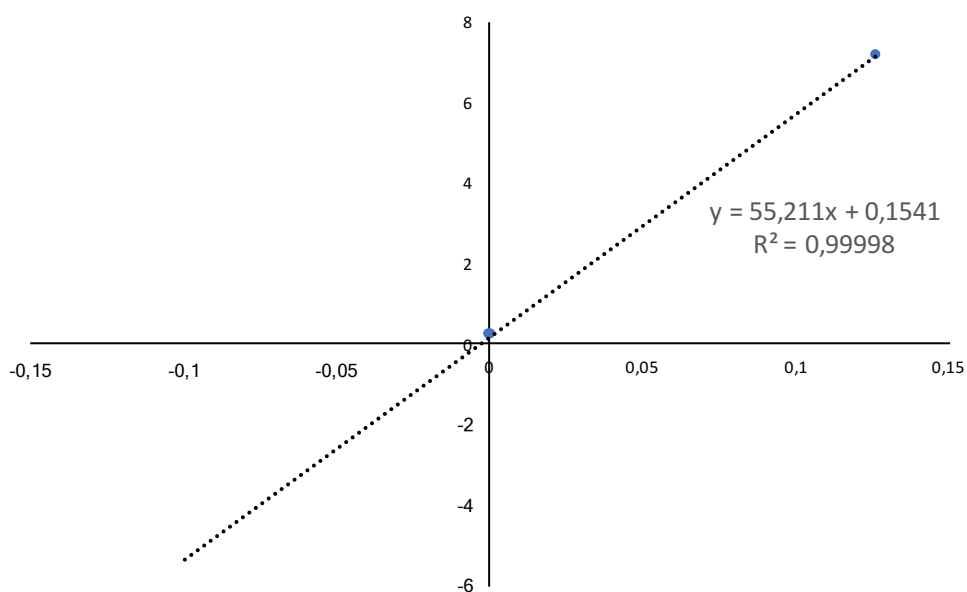


Figura 9. Representación doble recíproca Lineweaver-Burk de la cinética enzimática interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans* para tres concentraciones de sustrato. Las concentraciones utilizadas $[S_1]=7.9 \mu\text{M}$, $[S_2]=790 \mu\text{M}$ y $[S_3]=1600 \mu\text{M}$

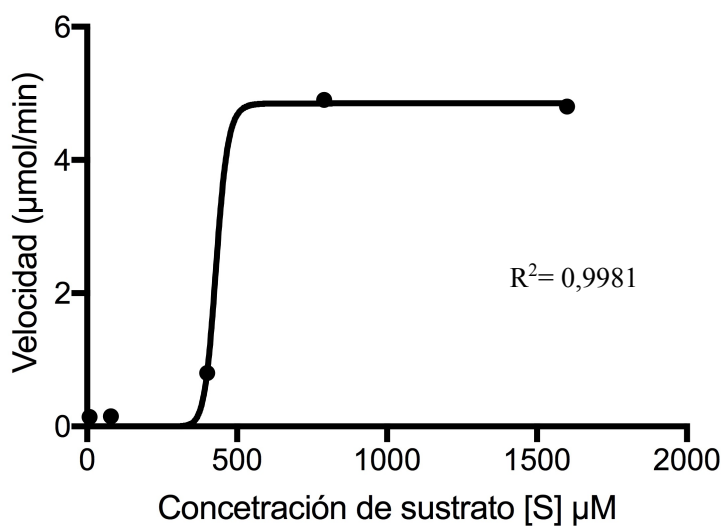


Figura 10. Ajuste alostérico-sigmoidal de la cinética interfacial de la lipasa de *Guehomyces pullulans*.

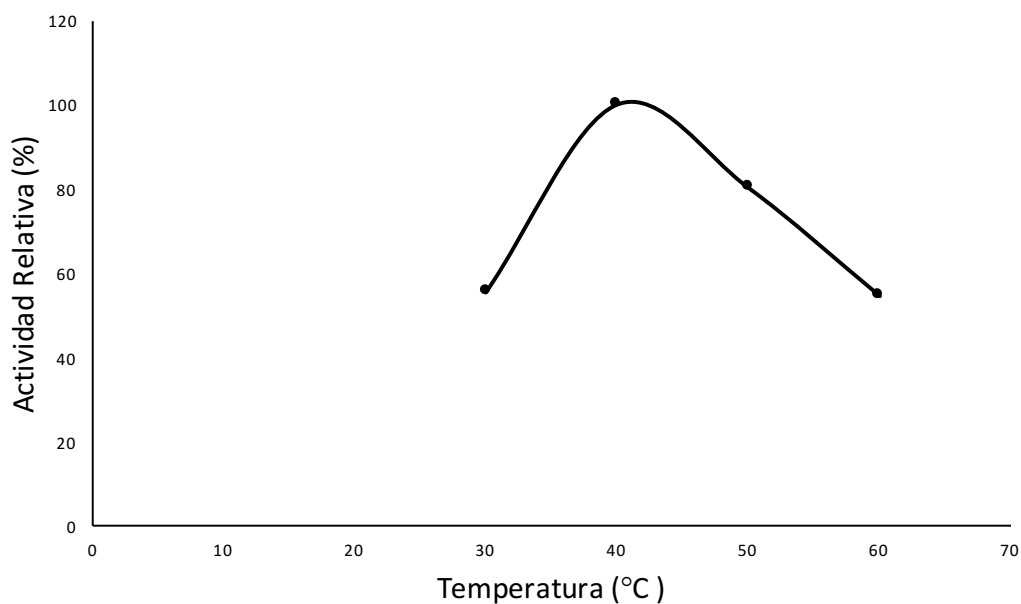


Figura 11. Efecto de la temperatura en la estabilidad térmica de la lipasa de *Guehomyces pullulans*. Se realizaron cuatro repeticiones. La temperatura óptima se encuentra en el rango de 40-50 °C.

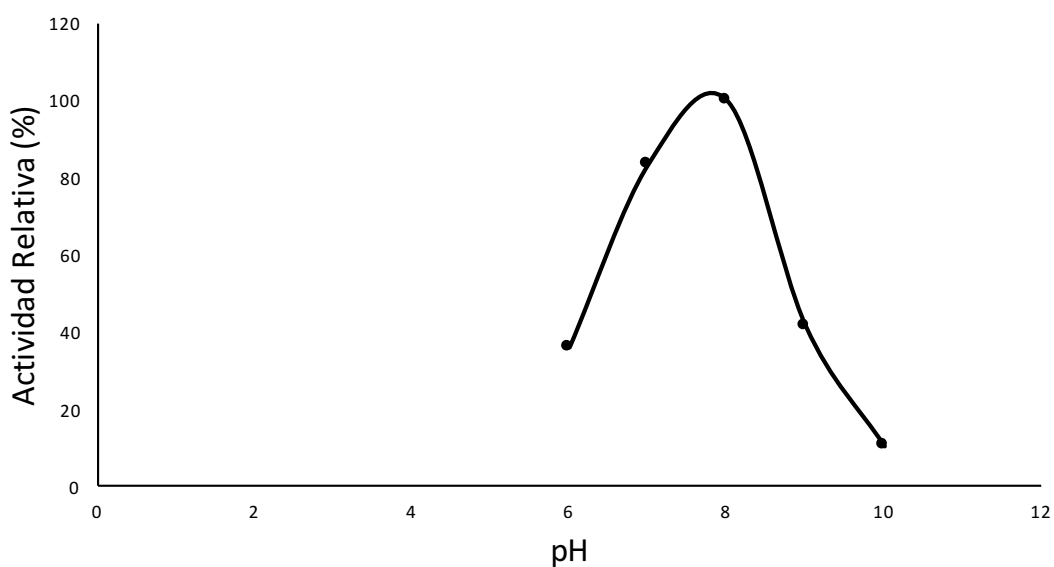


Figura 12. Efecto del pH en la actividad enzimática de la lipasa de *Guehomyces pullulans*. Se realizaron cuatro repeticiones. El valor óptimo de pH se situó en 8.0.

9. TABLAS

Tabla 1. Velocidad de reacción (V_0) y Actividad enzimática (U/L) en condiciones estándar de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* producida en medio inductor con aceite de oliva.

	V_0 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Act (U/L)
Repetición		
1	5.3	288.3
2	4.76	258
3	5.576	303
4	4.97	270.6
5	4.05	220.35
Promedio	4.9	268.05

Condiciones estándar: pH 7. Temperatura 37°C Concentración sustrato $[S_E]= 790 \mu\text{M}$.

Tabla 2. Velocidad de reacción (V_0) de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* para cinco concentraciones de sustrato $[S]$ en condiciones estándar (pH 7 y 37 °C).

Concentración de sustrato $[S]$ μM	V_0 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Dobles recíprocos*		
		$[1/S]$ μM	$1/V_0$	
$[S_1]$	7.9	0.14	0.12658	7.143
$[S_2]$	79	0.15	0.01266	6.667
$[S_3]$	400	0.8	0.00250	1.250
$[S_E]$	790	4.9	0.00127	0.204
$[S_4]$	1600	5.0	0.00063	0.20

*Dobles recíprocos utilizados en la linealización Lineweaver-Burk

Tabla 3. Parámetros cinéticos aparentes de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* ajustados al modelo Michaelis-Menten y Alostérico sigmoidal

Constantes aparentes			
	Michaelis-Menten		Alostérica-Sigmoidal
	Linealización 1	Linealización 2*	
K_M	2.5 x 10 ⁻⁵ M	3.68 x 10⁻⁴ M	4.3 x 10 ⁻⁴ M
V_{max}	0.56	6.7	4.85

*Este modelo tuvo el mayor R²

Tabla 4. Actividad enzimática de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* para distintos valores de temperatura.

Actividad Enzimática (U/L)						
Temperatura (°C)	Repeticiones				Promedio	Act. Relativa (%)
	1	2	3	4		
30	107.07	101.09	100	86.96	98.78	55.69
40	190.22	190.22	168.22	160.87	177.383	100
50	146	168.48	113.04		142.507	80.34
60	105.43	82.07	104.35		97.283	54.84

Los valores de actividad enzimática corresponden a la actividad residual luego de la incubación a las distintas temperaturas

Tabla 5. Análisis de varianza de las actividades enzimáticas a distintas temperaturas

ANOVA-Actividad Enzimática					
	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.
Entre grupos*	16558,395	3	5519,465	19,682	,000
Dentro de grupos	2804,331	10	280,433		
Total	19362,727	13			

*Componentes de varianza: 84.31% entre grupos de temperatura y 15.69 % dentro de los grupos.

Tabla 6. Prueba de Tukey para las actividades enzimáticas a distintas temperaturas

Actividad Tukey HSD ^{a,b}		Subconjunto alfa = 0.05	
Temperatura (°C)	N	1	2
60	3	97.2833	
30	4	98.7800	
50	3		142.5067
40	4		177.3825
Sig.		,999	,085

Tabla 7. Actividad enzimática de la lipasa extracelular de *Guehomyces pullulans* para distintos valores de pH.

Actividad Enzimática (U/L)							
pH	Repeticiones					Promedio	Act. Relativa %
	1	2	3	4	5		
6.0	101.09	105.98	127.72	150		121.20	36.14
7.0	288.3	258	303	270.6	220.35	268.05	83.5
8.0	294.02	370.65	341.3			335.32	100
9.0	135.87	157.61	125			139.49	41.6
10.0	53.26	23.37	29.35			35.33	10.54

Tabla 8. Análisis de varianza distintos valores de pH.

ANOVA-Actividad Enzimática					
	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.
Entre grupos*	192037,726	4	48009,432	65,321	,000
Dentro de grupos	9554,712	13	734,978		
Total	201592,439	17			

*Componentes de varianza: 94.76% entre grupos de pH y 5.24% dentro de los grupos

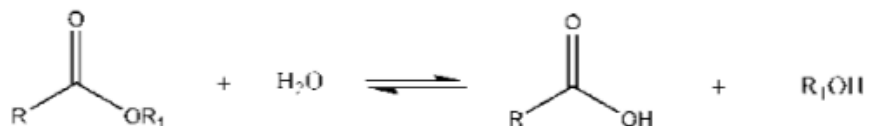
Tabla 9. Prueba de Tukey para las actividades enzimáticas a distintos valores de pH.

Actividad Tukey HSD ^{a,b}		Subconjunto alfa = 0.05			
pH	N	1	2	3	4
10.0	3	35.3267			
6.0	4		121.0175		
9.0	3		139.4933		
7.0	5			268.0500	
8.0	3				335.3233
Sig.		1,000	,894	1,000	1,000

10.ANEXOS

Anexo 1. Reacciones catalizadas por lipasas

Hydrolysis Reaction



Esterification Reaction



Transesterification Reactions

Alcohololise



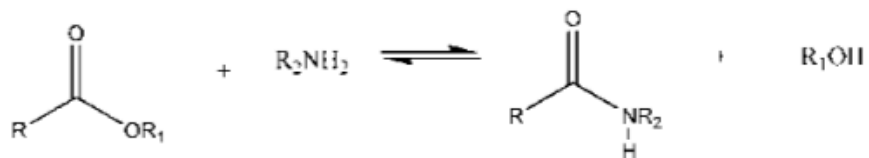
Acidolysis



Interesterification

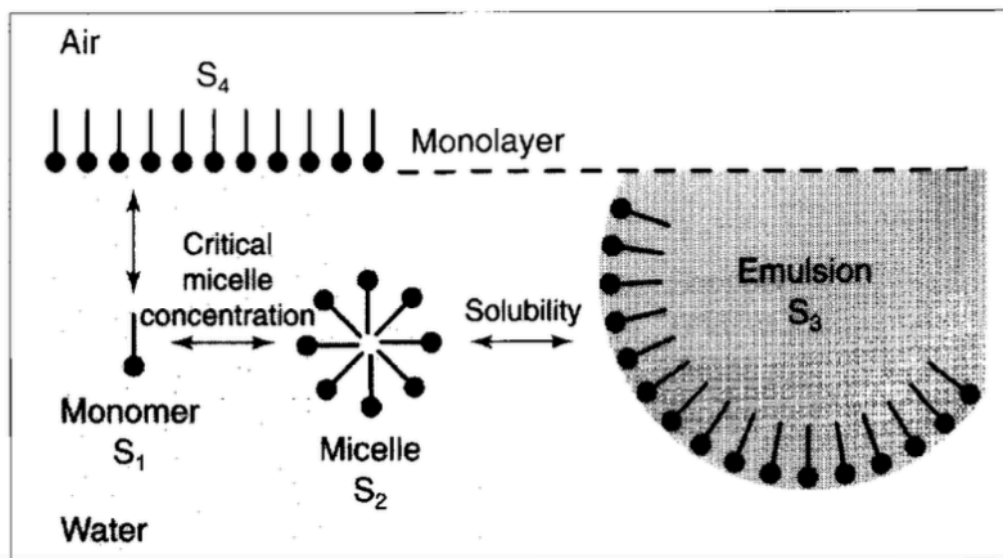


Aminolysis



Fuente: Damaso et al. (2013)

Anexo 2. Estados fisicoquímicos de ésteres carboxílicos en medios acuosos. Todas las formas constituyen potenciales sustratos para lipasas.



Fuente: Verger (1997)

Anexo 3. Actividades enzimáticas lipasa y esterasa en función de la concentración de sustrato. La actividad esterasa sigue la cinética de Michaelis-Menten, las lipasas presentan activación interfacial.

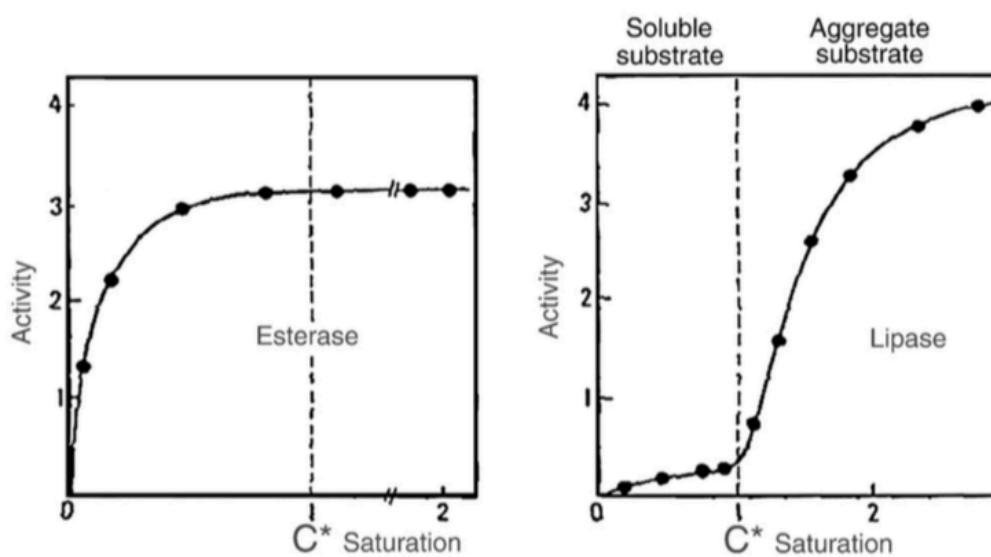
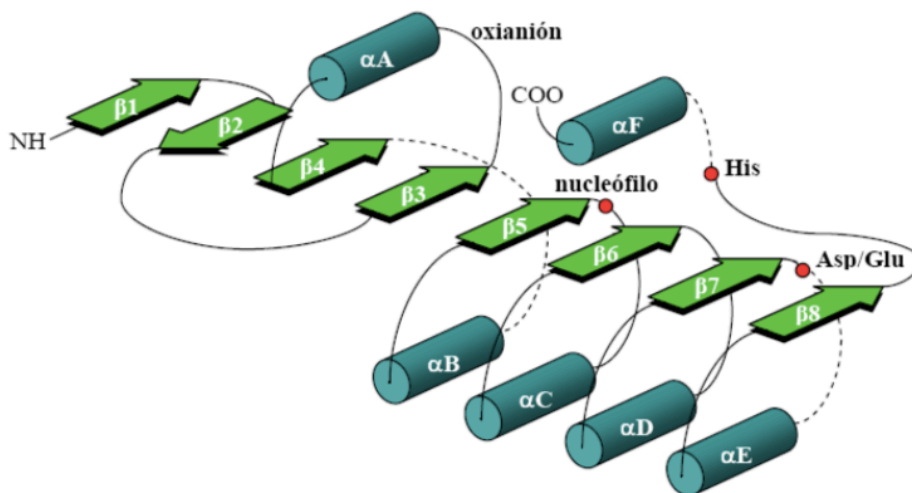
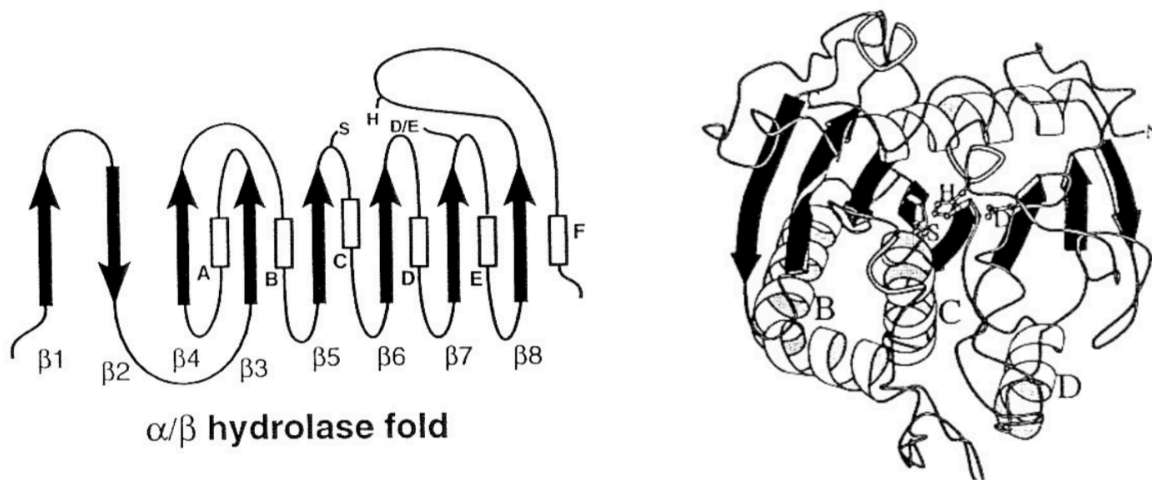


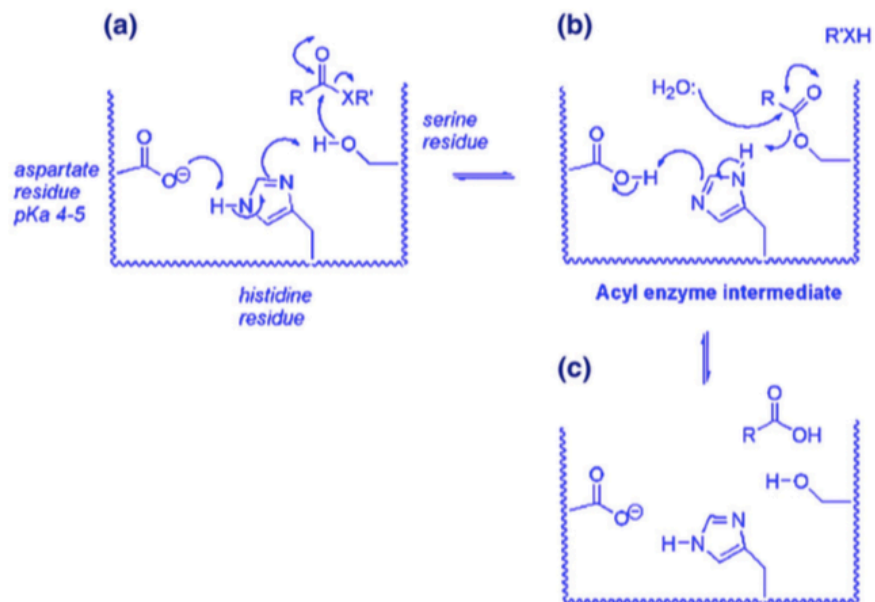
Fig. 2. Hydrolysis of triacetin by pancreatic lipase and esterase as a function of substrate concentration (redrawn from ref. [20]).

Fuente: Reis et al. (2009)

Anexo 4. Diagrama del plegamiento α/β hidrolasa de las lipasas



Fuente: García Román (2005) y Mercado-Malebrán (2014).

Anexo 5. Ataque nucleofílico en el sitio activo de lipasas.

Fuente: Reis et al. (2009)

Anexo 6. Mecanismo catalítico de lipasas

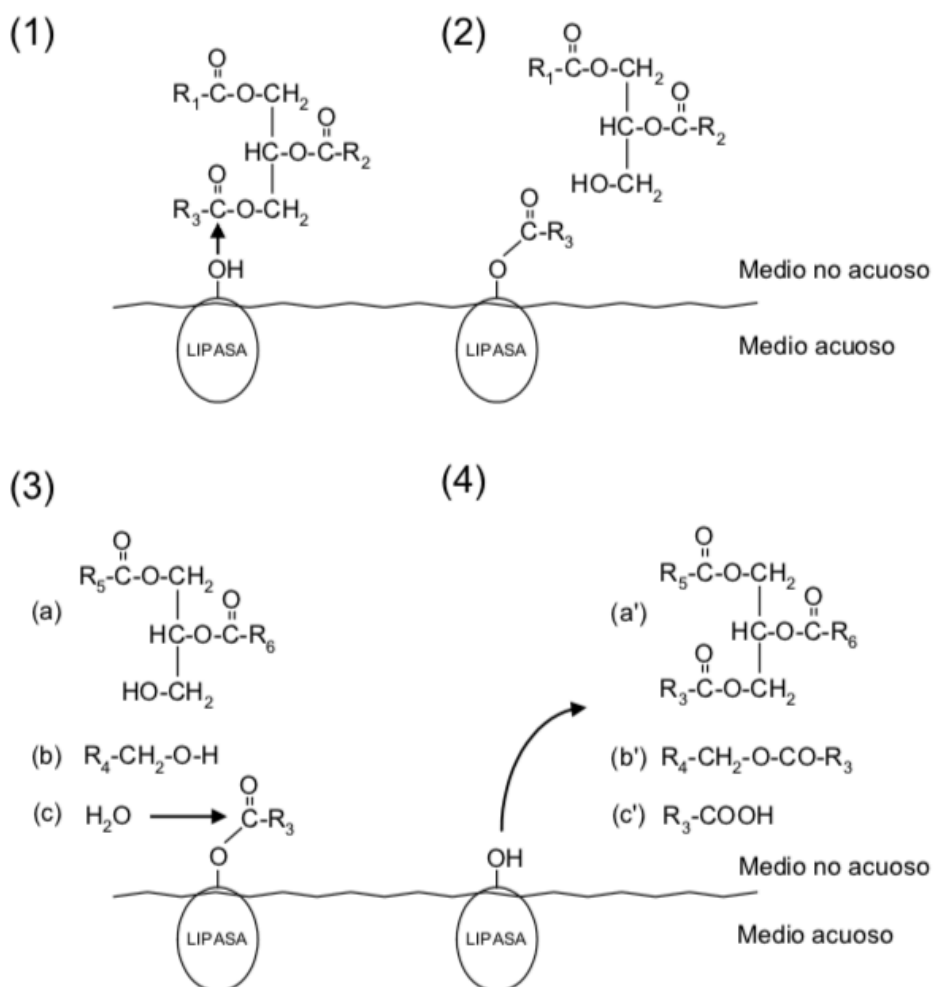
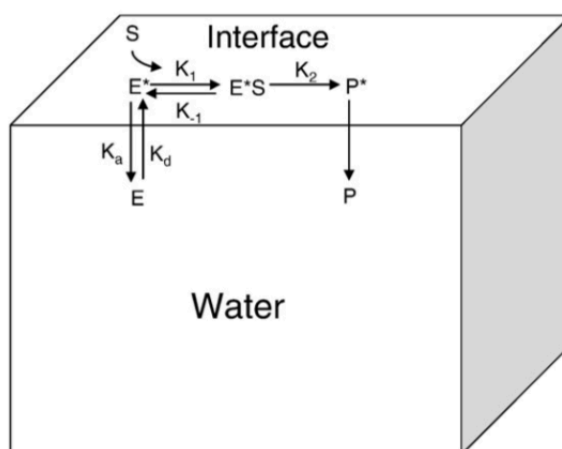


Figura 2.5. Etapas de una reacción catalizada por lipasas: (1) Ataque nucleofílico sobre un átomo de carbono del grupo carbonilo de un triglicérido, (2) formación de un complejo acil-enzima y un alcohol o diglicérido, (3) ataque de reactivos nucleófilos, como un diglicérido (a), un alcohol (b) o agua (c), y (4) liberación de los respectivos productos de los ataques nucleofílicos: un triglicérido (a'), un éster (b') o un ácido carboxílico (c'). Reproducido de Camacho-Páez (2000).

Fuente: García Román (2005)

Anexo 7. Modelo cinético para el mecanismo de acción de lipasas en sustratos insolubles



Fuente: Reis et al. (2009)

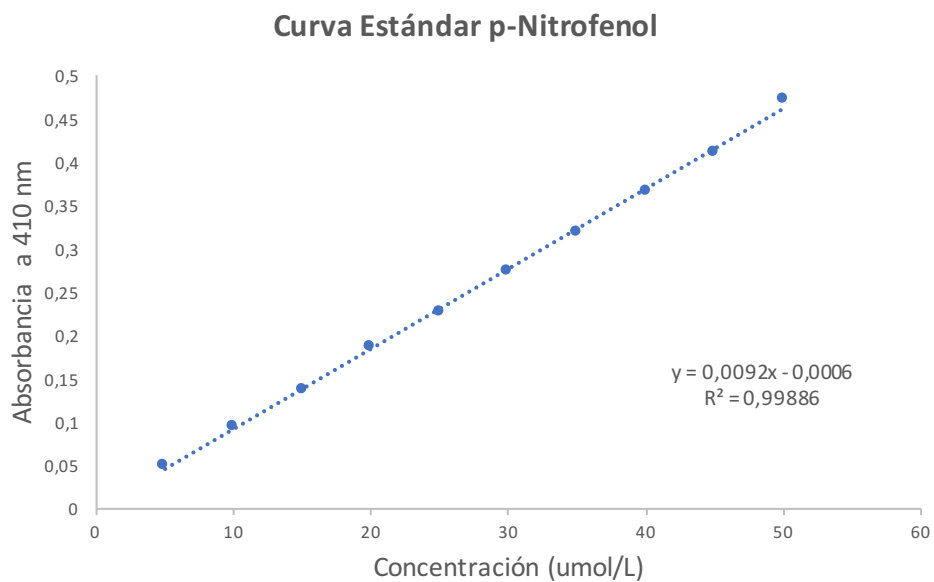
Anexo 8. Aplicaciones de lipasas microbianas

Table 2
Industrial applications of microbial lipases (Vulfson, 1994)

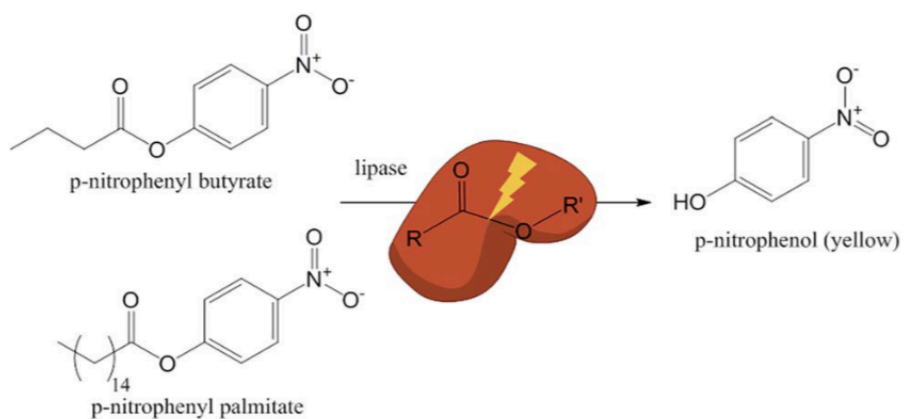
Industry	Action	Product or application
Detergents	Hydrolysis of fats	Removal of oil stains from fabrics
Dairy foods	Hydrolysis of milk fat, cheese ripening, modification of butter fat	Development of flavoring agents in milk, cheese, and butter
Bakery foods	Flavor improvement	Shelf-life prolongation
Beverages	Improved aroma	Beverages
Food dressings	Quality improvement	Mayonnaise, dressings, and whippings
Health foods	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavor development	Meat and fish products; fat removal
Fats and oils	Transesterification; hydrolysis	Cocoa butter, margarine, fatty acids, glycerol, mono-, and diglycerides
Chemicals	Enantioselectivity, synthesis	Chiral building blocks, chemicals
Pharmaceuticals	Transesterification, hydrolysis	Specialty lipids, digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifiers, moisturizers
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper with improved quality
Cleaning	Hydrolysis	Removal of fats

Fuente: Sharma et al., (2001)

Anexo 9. Curva estándar de *p*NP obtenida y utilizada en la construcción de curvas de progreso



Anexo 10. Esquema de la reacción catalizada por la lipasa usando *p*NPP como sustrato



Fuente: Eby y Peretti (2015)

Anexo 11. Curva estándar BSA obtenida y utilizada en la cuantificación de proteínas.